

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 985 493**

51 Int. Cl.:

C07C 309/04 (2006.01)

C07C 239/20 (2006.01)

A61P 17/00 (2006.01)

A61P 17/10 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.05.2012** **E 19167006 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.07.2024** **EP 3574908**

54 Título: **Composición farmacéutica para administración oral que comprende sales cristalinas de amida del ácido (4S,4aS,5aR,12aS)-4-dimetilamino-3,10,12,12a-tetrahidroxi-7-[(metoxi(metil)amino)-metil]-1,11-dioxo-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-octahidro-naftacen-2-carboxílico**

30 Prioridad:
12.05.2011 US 201161485179 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
06.11.2024

73 Titular/es:
ALMIRALL LLC (50.0%)
101 Lindenwood Drive, Suite 400
Malvern, PA 19355, US y
ALLERGAN PHARMACEUTICALS
INTERNATIONAL LIMITED (50.0%)

72 Inventor/es:
COULTER, CATHERINE;
JOHNSTON, SEAN M. y
SEYEDI, FARZANEH

74 Agente/Representante:
BERTRÁN VALLS, Silvia

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 985 493 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composición farmacéutica para administración oral que comprende sales cristalinas de amida del ácido (4S,4aS,5aR,12aS)-4-dimetilamino-3,10,12,12a-tetrahidroxi-7-[(metoxi(metil)amino)-metil]-1,11-dioxo-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-octahidro-naftacen-2-carboxílico

Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

Esta solicitud reivindica el beneficio de prioridad de la solicitud provisional estadounidense n.º 61/485.179, presentada el 12 de mayo de 2011.

Campo de la invención

La presente divulgación se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden sales de *mono*-clorhidrato, *mono*-mesilato y *mono*-sulfato cristalinas de amida del ácido (4S,4aS,5aR,12aS)-4-dimetilamino-3,10,12,12a-tetrahidroxi-7-[(metoxi(metil)amino)-metil]-1,11-dioxo-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-octahidro-naftacen-2-carboxílico para administración oral.

Antecedentes de la invención

Las tetraciclinas son antibióticos “de amplio espectro” conocidos y se han usado ampliamente para propósitos terapéuticos. Se ha encontrado que las tetraciclinas son muy eficaces farmacológicamente contra *Rickettsiae*; varias bacterias Gram positivas y Gram negativas; y los agentes responsables del linfogranuloma venéreo, conjuntivitis de inclusión y psitacosis. El primer uso de los antibióticos de tetraciclina se remonta a 1948. Pueden encontrarse ejemplos de composiciones de tetraciclina y análogos de tetraciclina farmacéuticamente activas en las patentes estadounidenses n.ºs 2.980.584; 2.990.331; 3.062.717; 3.165.531; 3.454.697; 3.557.280; 3.674.859; 3.957.980; 4.018.889; 4.024.272; y 4.126.680. Las tetraciclinas también pueden usarse para tratar trastornos inflamatorios de la piel, incluyendo dermatitis, psoriasis, pioderma gangrenoso, acné y rosácea.

El acné vulgar, también denominado acné, es tanto un trastorno inflamatorio de la piel como una infección bacteriana. Es un trastorno que resulta de las hormonas que afectan las glándulas sebáceas, lo que conduce a poros obstruidos y brotes de lesiones, o granos. El acné es la enfermedad de la piel más común en Estados Unidos, afectando a casi 17 millones de personas. El acné grave puede conducir a desfiguración, y cicatrización permanente.

El acné se describe como un trastorno de las unidades pilosebáceas (PSU). Encontradas en la mayor parte del cuerpo, las PSU consisten en glándulas sebáceas, que producen una sustancia oleosa que se vacía normalmente en la superficie de la piel a través de la abertura del folículo, también denominada poro. Cuando el poro se obstruye, la mezcla de aceite y células permite a las bacterias que viven normalmente en la piel crecer en los folículos obstruidos, que producen sustancias químicas y enzimas y atraen glóbulos blancos que provocan inflamación. El folículo obstruido se descompone, el sebo, las células muertas de la piel y las bacterias se diseminan en los tejidos próximos, conduciendo a lesiones o granos.

El acné se trata comúnmente con antibióticos sistémicos, incluyendo tetraciclinas, para reducir el crecimiento de bacterias. Se cree que la eficacia se debe a un efecto sobre *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*) así como las propiedades antiinflamatorias intrínsecas de estos antibióticos. *Propionibacterium acnes* es una bacteria (bacilo) Gram positiva anaerobia normalmente aerotolerante de crecimiento relativamente lento que está ligada al acné. Se sabe que las tetraciclinas son eficaces para destruir *P. acnes* y otras bacterias y se han usado para tratar acné debido a sus propiedades antibacterianas y antiinflamatorias.

La rosácea es un trastorno de la piel caracterizado por enrojecimiento facial, que afecta principalmente a individuos con ascendencia del noroeste de Europa. Los síntomas tempranos de la rosácea incluyen enrojecimiento en la barbilla, nariz, piel o frente; pequeños vasos sanguíneos visibles en la cara; bultos o granos en la cara; y ojos llorosos e irritados. Aunque las causas de la rosácea no se entienden bien, comúnmente se recetan antibióticos sistémicos tales como las tetraciclinas para el tratamiento de la rosácea, debido a sus propiedades tanto antiinflamatorias como antibacterianas.

Después de que el amplio uso de tetraciclinas tanto para enfermedades graves como leves condujera a la resistencia a estos antibióticos, se desarrollaron compuestos de tetraciclina sustituida para tratar infecciones bacterianas, inflamación, neoplasias y otras afecciones. El término “compuesto de tetraciclina” incluye muchos compuestos con una estructura de anillo similar a tetraciclina. Los ejemplos de estos compuestos de tetraciclina incluyen: clortetraciclina, doxiciclina, minociclina, oxitetraciclina, demeclociclina, metaciclina, sanciclina, quelocardina, rolitetraciclina, limeciclina, apiciclina; clomociclina, guameciclina, megluciclina, mepilciclina, penimepiciclina, pipaciclina, etamociclina, penimociclina. Por ejemplo, se han divulgado compuestos de tetraciclina sustituida en los documentos WO 2008/079339 y WO 2008/079363.

Un compuesto de tetraciclina sustituida es amida del ácido (4S,4aS,5aR,12aS)-4-dimetilamino-3,10,12,12a-tetrahidroxi-7-[(metoxi(metil)amino)-metil]-1,11-dioxo-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-octahidro-naftacen-2-carboxílico, descrito en las publicaciones de solicitud de patente estadounidense n.ºs 2008/0312193 y 2010/0305072. La base libre de este compuesto ha demostrado ser inestable para su uso como principio farmacéutico activo. Además, aunque los expertos en la técnica han intentado sintetizar una sal de este compuesto previamente, sólo se han producido sales amorfas y estas sales amorfas han demostrado sólo estabilidad mejorada mínima con respecto a la base libre. Por consiguiente, existe la necesidad en la técnica de estabilidad mejorada de este compuesto de tetraciclina sustituida. El documento US 2010/113399 A1 se refiere a formas cristalinas de (4S,4aS,5aR,12aS)-4-7-bis(dimetilamino)-9-[[[(2,2-dimetilpropil)amino]metil]-3,10,12,12a-tetrahidroxi-1,11-dioxo-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-octahidrotetracen-2-carboxamida (9-(2,2-dimetil-propil-aminometil)-minociclina).

La presente invención se refiere a una composición farmacéutica para administración oral de las sales de *mono*-clorhidrato, *mono*-mesilato y *mono*-sulfato cristalinas nuevas de amida del ácido (4S,4aS,5aR,12aS)-4-dimetilamino-3,10,12,12a-tetrahidroxi-7-[(metoxi(metil)amino)-metil]-1,11-dioxo-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-octahidro-naftacen-2-carboxílico, que presentan una estabilidad superior con respecto a la base libre y a las sales previamente conocidas de la misma. Esto es un avance significativo en el estado de la técnica. A continuación, se hará referencia al contenido que acaba de divulgarse y/o que forma parte de la divulgación. Tal contenido puede incluir contenido no abarcado por la invención y, por tanto, no se encuentra en el alcance de protección previsto, que se define únicamente por el alcance de las reivindicaciones adjuntas. En particular, la invención no debe incluir ningún método de tratamiento del cuerpo humano o animal, ni siquiera si la memoria descriptiva divulgó o implicó tal contenido.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende una sal cristalina de amida del ácido (4S,4aS,5aR,12aS)-4-dimetilamino-3,10,12,12a-tetrahidroxi-7-[(metoxi(metil)amino)-metil]-1,11-dioxo-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-octahidro-naftacen-2-carboxílico, en la que la sal se selecciona de un grupo que consiste en *mono*-clorhidrato, *mono*-mesilato y *mono*-sulfato y en la que la composición farmacéutica es para administración oral. En una realización determinada de la presente divulgación, la sal cristalina es sustancialmente pura. Una realización se refiere a la composición farmacéutica que comprende la sal de *mono*-clorhidrato cristalina de amida del ácido (4S,4aS,5aR,12aS)-4-dimetilamino-3,10,12,12a-tetrahidroxi-7-[(metoxi(metil)amino)-metil]-1,11-dioxo-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-octahidro-naftacen-2-carboxílico. En una realización determinada de la presente divulgación, la sal de *mono*-clorhidrato cristalina tiene un patrón de difracción de rayos X de polvo (XRPD) sustancialmente tal como se ilustra en la figura 1 después de la síntesis de la sal cristalina, y, en una realización preferida, tiene picos característicos en el patrón de XRPD a un ángulo de difracción de grados 2-theta que aparecen al menos a aproximadamente 13,4, aproximadamente 20,5 y aproximadamente 23,3. En realizaciones adicionales de la presente divulgación, la sal de *mono*-clorhidrato cristalina tiene una curva de calorimetría de barrido diferencial (DSC) sustancialmente tal como se ilustra en la figura 2 después de la síntesis, y una curva de análisis termogravimétrico (TGA) sustancialmente tal como se ilustra en la figura 3 después de la síntesis. En otra realización de la presente divulgación, la sal de *mono*-clorhidrato cristalina tiene un contenido de isómero β a los 0 días de aproximadamente el 0,1 por ciento de área de pico (a continuación en el presente documento denominado “% de área de pico”) a aproximadamente el 7,0% de área de pico, tal como se mide mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).

Otras realizaciones de la invención se refieren a la composición farmacéutica que comprende una sal de *mono*-mesilato cristalina y una sal de *mono*-sulfato cristalina de amida del ácido (4S,4aS,5aR,12aS)-4-dimetilamino-3,10,12,12a-tetrahidroxi-7-[(metoxi(metil)amino)-metil]-1,11-dioxo-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-octahidro-naftacen-2-carboxílico. En una realización determinada de la presente divulgación, la sal de *mono*-mesilato cristalina tiene un patrón de XRPD sustancialmente tal como se ilustra en la figura 4 después de la síntesis de la sal cristalina, y, en una realización preferida, tiene picos característicos en el patrón de XRPD a un ángulo de difracción de grados 2-theta que aparecen al menos a aproximadamente 9, aproximadamente 15 y aproximadamente 23,8. En realizaciones adicionales de la presente divulgación, la sal de *mono*-mesilato cristalina tiene una curva de DSC sustancialmente tal como se ilustra en la figura 5 después de la síntesis, y una curva de TGA sustancialmente tal como se ilustra en la figura 6 después de la síntesis.

En una realización determinada de la presente divulgación, la sal de *mono*-sulfato cristalina tiene un patrón de XRPD sustancialmente tal como se ilustra en la figura 7 después de la síntesis de la sal cristalina, y, en una realización preferida, tiene picos característicos en el patrón de XRPD a un ángulo de difracción de grados 2-theta que aparecen al menos a aproximadamente 15, aproximadamente 17,8 y aproximadamente 23,5. En realizaciones adicionales de la presente divulgación, la sal de *mono*-sulfato cristalina tiene una curva de DSC sustancialmente tal como se ilustra en la figura 8 después de la síntesis, y una curva de TGA sustancialmente tal como se ilustra en la figura 9 después de la síntesis.

En realizaciones preferidas de la presente divulgación, la sal de *mono*-mesilato cristalina tiene un contenido de isómero β a los 0 días de aproximadamente el 2,0% de área de pico a aproximadamente el 10,0% de área de pico, tal como se mide mediante HPLC, y la sal de *mono*-sulfato cristalina tiene un contenido de isómero β a los 0 días de aproximadamente el 3,0% de área de pico a aproximadamente el 26,0% de área de pico, tal como se mide mediante

HPLC.

La presente invención se refiere además a una composición farmacéutica que comprende una sal de *mono*-clorhidrato cristalina, sal de *mono*-mesilato cristalina o sal de *mono*-sulfato cristalina de amida del ácido (4S,4aS,5aR,12aS)-4-dimetilamino-3,10,12,12a-tetrahidroxi-7-[(metoxi(metil)amino)-metil]-1,11-dioxo-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-octahidro-naftacen-2-carboxílico y un excipiente farmacéuticamente aceptable, en la que la composición farmacéutica es para administración oral. En una realización, la composición farmacéutica se usa para tratar acné. En otra realización, la composición farmacéutica se usa para tratar rosácea.

Breve descripción de las figuras

La figura 1 muestra análisis de difracción de rayos X de polvo (XRPD) de sal de *mono*-clorhidrato cristalina de amida del ácido (4S,4aS,5aR,12aS)-4-dimetilamino-3,10,12,12a-tetrahidroxi-7-[(metoxi(metil)amino)-metil]-1,11-dioxo-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-octahidro-naftacen-2-carboxílico después de la síntesis y después del almacenamiento durante 7 días a 40°C y el 75% de humedad relativa (HR).

La figura 2 es una curva de calorimetría diferencial de barrido (DSC) de sal de *mono*-clorhidrato cristalina de amida del ácido (4S,4aS,5aR,12aS)-4-dimetilamino-3,10,12,12a-tetrahidroxi-7-[(metoxi(metil)amino)-metil]-1,11-dioxo-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-octahidro-naftacen-2-carboxílico después de la síntesis.

La figura 3 es una curva de análisis termogravimétrico (TGA) de sal de *mono*-clorhidrato cristalina de amida del ácido (4S,4aS,5aR,12aS)-4-dimetilamino-3,10,12,12a-tetrahidroxi-7-[(metoxi(metil)amino)-metil]-1,11-dioxo-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-octahidro-naftacen-2-carboxílico después de la síntesis.

La figura 4 muestra análisis de XRPD de sal de *mono*-mesilato cristalina de amida del ácido (4S,4aS,5aR,12aS)-4-dimetilamino-3,10,12,12a-tetrahidroxi-7-[(metoxi(metil)amino)-metil]-1,11-dioxo-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-octahidro-naftacen-2-carboxílico después de la síntesis y después del almacenamiento durante 7 días a 40°C y el 75% de HR.

La figura 5 es una curva de DSC de sal de *mono*-mesilato cristalina de amida del ácido (4S,4aS,5aR,12aS)-4-dimetilamino-3,10,12,12a-tetrahidroxi-7-[(metoxi(metil)amino)-metil]-1,11-dioxo-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-octahidro-naftacen-2-carboxílico después de la síntesis.

La figura 6 es una TGA de sal de *mono*-mesilato cristalina de amida del ácido (4S,4aS,5aR,12aS)-4-dimetilamino-3,10,12,12a-tetrahidroxi-7-[(metoxi(metil)amino)-metil]-1,11-dioxo-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-octahidro-naftacen-2-carboxílico después de la síntesis.

La figura 7 muestra análisis de XRPD de sal de *mono*-sulfato cristalina de amida del ácido (4S,4aS,5aR,12aS)-4-dimetilamino-3,10,12,12a-tetrahidroxi-7-[(metoxi(metil)amino)-metil]-1,11-dioxo-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-octahidro-naftacen-2-carboxílico después de la síntesis y después del almacenamiento durante 7 días a 40°C y el 75% de HR.

La figura 8 es una curva de DSC de sal de *mono*-sulfato cristalina de amida del ácido (4S,4aS,5aR,12aS)-4-dimetilamino-3,10,12,12a-tetrahidroxi-7-[(metoxi(metil)amino)-metil]-1,11-dioxo-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-octahidro-naftacen-2-carboxílico después de la síntesis.

La figura 9 es una TGA de sal de *mono*-sulfato cristalina de amida del ácido (4S,4aS,5aR,12aS)-4-dimetilamino-3,10,12,12a-tetrahidroxi-7-[(metoxi(metil)amino)-metil]-1,11-dioxo-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-octahidro-naftacen-2-carboxílico después de la síntesis.

La figura 10 muestra análisis de XRPD de sal de *bis*-clorhidrato amorfa de amida del ácido (4S,4aS,5aR,12aS)-4-dimetilamino-3,10,12,12a-tetrahidroxi-7-[(metoxi(metil)amino)-metil]-1,11-dioxo-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-octahidro-naftacen-2-carboxílico.

La figura 11 es una curva de TGA y curva de DSC superpuestas de sal de *bis*-clorhidrato amorfa de amida del ácido (4S,4aS,5aR,12aS)-4-dimetilamino-3,10,12,12a-tetrahidroxi-7-[(metoxi(metil)amino)-metil]-1,11-dioxo-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-octahidro-naftacen-2-carboxílico.

Descripción detallada de la invención

Sales cristalinas

En el presente documento se divulgan sales cristalinas nuevas de amida del ácido (4S,4aS,5aR,12aS)-4-dimetilamino-3,10,12,12a-tetrahidroxi-7-[(metoxi(metil)amino)-metil]-1,11-dioxo-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-octahidro-naftacen-2-carboxílico. Tras mucha experimentación y descubrimiento, los inventores determinaron las formas de sal estables y preferidas de amida del ácido (4S,4aS,5aR,12aS)-4-dimetilamino-3,10,12,12a-tetrahidroxi-7-[(metoxi(metil)amino)-metil]-1,11-dioxo-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-octahidro-naftacen-2-carboxílico, que pueden usarse como principio activo farmacéutico en una composición farmacéutica. La presente divulgación enseña cómo elaborar

estas sales cristalinas nuevas y sus beneficios superiores con respecto a la base libre de amida del ácido (4S,4aS,5aR,12aS)-4-dimetilamino-3,10,12,12a-tetrahidroxi-7-[(metoxi(metil)amino)-metil]-1,11-dioxo-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-octahidro-naftacen-2-carboxílico y sales previamente conocidas de la misma.

5 Por tanto, una realización de la presente divulgación es una sal cristalina de amida del ácido (4S,4aS,5aR,12aS)-4-dimetilamino-3,10,12,12a-tetrahidroxi-7-[(metoxi(metil)amino)-metil]-1,11-dioxo-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-octahidro-naftacen-2-carboxílico, en la que la sal se selecciona de un grupo que consiste en *mono*-clorhidrato, *mono*-mesilato y *mono*-sulfato.

10 En una realización preferida de la presente divulgación, la sal cristalina es sustancialmente pura. Una sal cristalina sustancialmente pura contiene menos de aproximadamente el 10% de área de pico y, preferiblemente, menos de aproximadamente el 4% de área de pico, contenido de impurezas total, tal como se mide mediante HPLC. En una realización más preferida de la presente divulgación, la sal cristalina está sustancialmente libre de una sal amorfa. Preferiblemente, menos de aproximadamente el 8% de área de pico de sal amorfa está presente, más
15 preferiblemente, menos de aproximadamente el 5% de área de pico de sal amorfa está presente, y todavía más preferiblemente, menos de aproximadamente el 3% de área de pico de sal amorfa está presente.

Tal como se usa en el presente documento en referencia al porcentaje de área de pico de contenido de impurezas, el término "aproximadamente" generalmente significa dentro del 10 por ciento, por ejemplo, dentro del 5 por ciento
20 de un valor o intervalo dado.

El término "cristalino" tal como se usa en el presente documento se refiere a compuestos en un estado sólido que tienen una disposición interna tridimensional de repetición y periódica de átomos, iones o moléculas característica de los cristales. El término cristalino no significa necesariamente que el compuesto existe como cristal, sino que tiene
25 esta disposición estructural interna de tipo cristal. El término "amorfo" tal como se usa en el presente documento se refiere a compuestos que carecen de una estructura cristalina: sin patrón de repetición, únicamente orden de corto intervalo, extensamente desordenados.

Las sales cristalinas de amida del ácido (4S,4aS,5aR,12aS)-4-dimetilamino-3,10,12,12a-tetrahidroxi-7-
30 [(metoxi(metil)amino)-metil]-1,11-dioxo-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-octahidro-naftacen-2-carboxílico pueden usarse para tratar, prevenir o de otro modo mejorar infecciones bacterianas, víricas, parasitarias y fúngicas; cáncer (por ejemplo, cánceres de próstata, mama, colon, melanoma de pulmón y linfoma) y otros trastornos caracterizados por proliferación celular no deseada; artritis; osteoporosis; diabetes; accidente cerebrovascular; infarto agudo de miocardio; aneurisma aórtico; enfermedades neurodegenerativas y otras afecciones para las que se ha encontrado
35 que los compuestos de tetraciclina son activos (véase, por ejemplo, las patentes estadounidenses n.ºs 5.789.395; 5.834.450; 6.277.061; y 5.532.227, cada una de las cuales se incorpora expresamente en el presente documento como referencia). Además, las sales de la presente divulgación pueden usarse para prevenir o controlar enfermedades de mamíferos y veterinarias importantes tales como infecciones por rickettsias, infecciones de transmisión sexual, infecciones de las vías respiratorias, infecciones bacterianas, infecciones oftálmicas, carbunco;
40 pueden servir como terapia en amebiasis intestinal aguda, acné, y enfermedad de Lyme; y pueden usarse para profilaxis de malaria y similares. Preferiblemente, las sales cristalinas de la presente divulgación pueden usarse para tratar infecciones bacterianas y trastornos inflamatorios de la piel, que incluyen, sin limitación, eccema, dermatitis, psoriasis, pioderma gangrenoso, acné y rosácea. En una realización, las sales cristalinas de la presente divulgación pueden usarse para tratar acné y/o rosácea. Por ejemplo, las sales cristalinas de la presente divulgación pueden
45 usarse para tratar acné. Los ejemplos no limitativos de infecciones bacterianas que pueden tratarse mediante las sales de la presente divulgación incluyen infecciones con organismos Gram positivos *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes* o *Clostridium difficile*.

Una determinada realización de la presente divulgación es la sal de *mono*-clorhidrato cristalina de amida del ácido
50 (4S,4aS,5aR,12aS)-4-dimetilamino-3,10,12,12a-tetrahidroxi-7-[(metoxi(metil)amino)-metil]-1,11-dioxo-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-octahidro-naftacen-2-carboxílico.

El término "sal de *mono*-clorhidrato" tal como se usa en el presente documento se refiere a un compuesto iónico que resulta de la reacción de neutralización de un ácido y una base. El compuesto iónico (en el presente documento, HCl) se compone de un catión y un anión de modo que el compuesto es neutro.
55

Los métodos generales para analizar sales cristalinas incluyen análisis cristalino mediante difracción de rayos X de polvo (XRPD), calorimetría diferencial de barrido (DSC) y análisis termogravimétrico (TGA).

60 Se recogió el análisis de XRPD tal como se divulga en el presente documento en un difractómetro AXS C2 GADDS de Bruker usando radiación Cu K α (40 kV, 40 mA), platinas XYZ automatizadas, microscopio láser de vídeo para autoposicionamiento de muestras y un detector de área bidimensional HiStar. La óptica de rayos X consistía en un único espejo multicapa Göbel acoplado con un colimador de orificios de 0,3 mm. El software usado para la recogida de datos fue GADDS para WNT 4.1.16 y se analizaron y presentaron los datos usando Diffrac Plus EVA v 9.0.0.2 o v
65 13.0.0.2. Se analizaron las muestras en condiciones ambientales como especímenes de placa plana usando polvo según se recibió. Aproximadamente 1-2 mg de la muestra se presionaron ligeramente en un portaobjetos de vidrio

para obtener una superficie plana. Las muestras analizadas en condiciones no ambientales se montaron en una oblea de silicio con un compuesto conductor del calor. Entonces se calentó la muestra hasta la temperatura apropiada a aproximadamente $20^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$ y posteriormente se mantuvo de manera isotérmica durante aproximadamente 1 minuto antes de que se iniciara la recogida de datos.

En determinadas realizaciones de la presente divulgación, la sal de *mono*-clorhidrato cristalina de amida del ácido (4S,4aS,5aR,12aS)-4-dimetilamino-3,10,12,12a-tetrahidroxi-7-[(metoxi(metil)amino)-metil]-1,11-dioxo-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-octahidro-naftacen-2-carboxílico tiene un patrón de XRPD sustancialmente tal como se ilustra en la figura 1 después de la síntesis de la sal cristalina.

El término "patrón de XRPD" tal como se usa en el presente documento se refiere a la representación gráfica de los datos recogidos mediante análisis de XRPD. El análisis de XRPD es una técnica usada para caracterizar la estructura cristalográfica, el tamaño y la orientación preferida en muestras sólidas en polvo o policristalinas. Esta difracción también se usa para caracterizar mezclas sólidas heterogéneas para determinar el porcentaje de compuestos cristalinos presentes y puede proporcionar información estructural sobre materiales desconocidos.

Los términos "sustancialmente" y "aproximadamente" tal como se usan en el presente documento en referencia a un patrón de XRPD se refieren al patrón de XRPD en el que aparece(n) un(os) pico(s) indicado(s) dentro de 0,2 grados 2-theta, incluyendo dentro de 0,1 grados 2-theta de un valor 2-theta dado.

En una realización preferida de la presente divulgación, la sal de *mono*-clorhidrato cristalina tiene picos característicos a un ángulo de difracción de grados 2-theta que aparecen al menos a aproximadamente 13,4, aproximadamente 20,5 y aproximadamente 23,3, tal como se mide mediante XRPD. En una realización más preferida de la presente divulgación, la sal de *mono*-clorhidrato cristalina tiene picos característicos a un ángulo de difracción de grados 2-theta que aparecen al menos a aproximadamente 9,5, aproximadamente 13,4, aproximadamente 15,5, aproximadamente 20,5 y aproximadamente 23,3, tal como se mide mediante XRPD, y todavía más preferible, la sal de *mono*-clorhidrato cristalina tiene picos característicos a un ángulo de difracción de grados 2-theta que aparecen al menos a aproximadamente 9,5, aproximadamente 13,4, aproximadamente 15,5, aproximadamente 16,6, aproximadamente 19,2, aproximadamente 20,5, aproximadamente 22,2, y aproximadamente 23,3.

El término "pico característico" tal como se usa en el presente documento se refiere a un pico en el patrón de XRPD que tiene una intensidad de al menos el 20%, más preferiblemente el 40% mayor que el ruido de referencia.

Se usan análisis de TGA y DSC para medir el comportamiento térmico y pueden usarse para distinguir entre polimorfos. Una forma polimórfica pueden presentar comportamiento térmico diferente al del material amorfo u otra forma polimórfica.

Se recogió el análisis de DSC tal como se divulga en el presente documento en un aparato Q2000 de TA Instruments equipado con un inyector automático de 50 posiciones. El instrumento se calibró para la energía y temperatura usando indio certificado. La calibración para la capacidad térmica se llevó a cabo usando zafiro. Normalmente, se calentaron 0,5-3,0 mg de cada muestra, en una cuba de aluminio con orificios, a $10^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$ desde 25°C hasta 250°C . Se mantuvo una purga de nitrógeno a $50\text{ ml}.\text{min}^{-1}$ sobre la muestra. El software de control del instrumento usado fue Advantage para Q Series v2.8.0.392 y Thermal Advantage v4.8.3 y los datos se analizaron usando Universal Analysis v4.4A.

DSC es una técnica termoanalítica en la que la diferencia en la cantidad de calor requerido para aumentar la temperatura de una muestra y una referencia se mide en función de la temperatura. Puede usarse DSC para medir varias propiedades características de una muestra, permitiendo la observación de acontecimientos de cristalización. Específicamente, con DSC, es posible observar pequeños cambios de energía que se producen como transiciones de materia desde un cristal sólido hasta uno líquido y desde un cristal líquido hasta un líquido isotrópico. La presencia de acontecimientos en la curva de DSC puede usarse para evaluar la estabilidad del compuesto, así como la presencia de solvatos o hidratos.

TGA se usa para determinar cambios en el peso en relación con cambios en la temperatura, lo que puede revelar degradación del compuesto y la presencia de solvatos o hidratos. El análisis de TGA tal como se divulga en el presente documento se recogió en un aparato para TGA Q500 de TA Instruments equipado con un inyector automático de 16 posiciones. Se calibró la temperatura del instrumento usando alumel y níquel certificados. Normalmente, se cargaron 5-30 mg de cada muestra en un crisol de platino tarado y cuba de aluminio para DSC y se calentaron a $10^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$ desde temperatura ambiente hasta 300°C . Se mantuvo una purga de nitrógeno a $60\text{ ml}.\text{min}^{-1}$ sobre la muestra. El software de análisis de los datos y control del instrumento fue Advantage para Q Series v2.8.0.392 y Thermal Advantage v4.8.3 y los datos se analizaron usando Universal Analysis v4.4A.

En una realización determinada de la presente divulgación, la sal de *mono*-clorhidrato cristalina de amida del ácido (4S,4aS,5aR,12aS)-4-dimetilamino-3,10,12,12a-tetrahidroxi-7-[(metoxi(metil)amino)-metil]-1,11-dioxo-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-octahidro-naftacen-2-carboxílico presenta una curva de DSC sustancialmente tal como se

ilustra en la figura 2. Preferiblemente, la sal de *mono*-clorhidrato cristalina analizada por DSC no presenta acontecimientos hasta la degradación de la sal cristalina.

El término “acontecimientos” tal como se usa en el presente documento se refiere a un cambio en la muestra asociado con absorción (endotérmica) o evolución (exotérmica) de calor lo que provoca un cambio en el flujo de calor diferencial que se registra como un pico en el termograma. Tales cambios en la muestra incluyen descomposición, degradación, y cambio de forma o morfología, solvato o hidrato. La ausencia de cualquier acontecimiento indica que el compuesto es estable y está en una forma de baja energía.

El término “sustancialmente,” tal como se usa en el presente documento en referencia a la curva de DSC significa que la curva de DSC muestra un(os) pico(s) dentro de 1°C, incluyendo dentro de 0,5°C de una temperatura dada.

En una realización determinada de la presente divulgación, la sal de *mono*-clorhidrato cristalina de amida del ácido (4S,4aS,5aR,12aS)-4-dimetilamino-3,10,12,12a-tetrahidroxi-7-[(metoxi(metil)amino)-metil]-1,11-dioxo-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-octahidro-naftacen-2-carboxílico presenta una curva de TGA sustancialmente tal como se ilustra en la figura 3. Preferiblemente, la sal de *mono*-clorhidrato cristalina analizada mediante TGA presenta una pérdida de peso de aproximadamente el 1% a aproximadamente el 5% desde aproximadamente 30°C hasta aproximadamente 200°C y una pérdida de peso de aproximadamente el 12% a aproximadamente el 16% desde aproximadamente 200°C hasta aproximadamente 250°C y, más preferiblemente, una pérdida de peso de aproximadamente el 3% desde aproximadamente 30°C hasta aproximadamente 200°C y una pérdida de peso de aproximadamente 14% a aproximadamente el 15% desde aproximadamente 200°C hasta aproximadamente 250°C.

El término “sustancialmente,” tal como se usa en el presente documento en referencia a la curva de TGA significa que la curva muestra un porcentaje de pérdida de peso dentro del 1%, incluyendo dentro del 0,5% de un valor dado en relación con un cambio de temperatura.

En determinadas realizaciones de la presente divulgación, la sal de *mono*-clorhidrato cristalina de amida del ácido (4S,4aS,5aR,12aS)-4-dimetilamino-3,10,12,12a-tetrahidroxi-7-[(metoxi(metil)amino)-metil]-1,11-dioxo-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-octahidro-naftacen-2-carboxílico es estable durante al menos 4 meses, y más preferiblemente durante al menos 6 meses.

El término “estable” y “estabilidad” tal como se usa en el presente documento se refiere tanto a la forma física como a la pureza química de la sal. “La sal” tal como se usa en el presente documento se refiere a las sales de *mono*-clorhidrato, *mono*-mesilato y *mono*-sulfato cristalinas divulgadas de la presente invención.

Una medida de la estabilidad de la forma física de la sal es la higroscopicidad, que es la propensión de una sustancia para absorber o adsorber moléculas de agua del medio circundante. Cuando la humedad puede promover la degradación, la sal es estable si no es higroscópica o es ligeramente higroscópica por encima del 70% de humedad relativa (HR). En realizaciones preferidas, la sal no es higroscópica o es ligeramente higroscópica por encima del 80% de HR, y en realizaciones más preferidas, la sal no es higroscópica o es ligeramente higroscópica al 90% de HR. “No higroscópico o ligeramente higroscópico” tal como se usa en el presente documento se refiere a un compuesto a aproximadamente 40°C y a una HR de aproximadamente el 75%, existiendo sobre aproximadamente el 80% p/p en forma cristalina sólida, preferiblemente sobre aproximadamente el 90% p/p en forma cristalina sólida, que absorbe menos del 10% p/p de agua, y preferiblemente, menos del 5% p/p de agua en 8 horas o menos. La higroscopicidad (grado higroscópico) se calcula basándose en el aumento en peso en un compuesto en puntos de medición comparativos. Otra medida de la estabilidad física es la forma de cristal de la sal, que puede medirse mediante XRPD.

Una medida de la pureza química se define mediante el contenido de isómero β de la sal. Muchas tetraciclinas son ópticamente activas y contienen uno o más centros asimétricos. El proceso mediante el cual se altera la asimetría de tal centro para formar la estereoquímica contraria se denomina epimerización. Las tetraciclinas experimentan epimerización reversible a la epitetraciclina menos activa. La velocidad a la que se produce la epimerización depende de muchos factores, tales como pH, temperatura, contraión y humedad. El epímero que se produce de manera natural se denomina normalmente α , o epímero activo. El otro epímero, conocido como β , puede o no presentar actividad biológica.

La amida del ácido (4S,4aS,5aR,12aS)-4-dimetilamino-3,10,12,12a-tetrahidroxi-7-[(metoxi(metil)amino)-metil]-1,11-dioxo-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-octahidro-naftacen-2-carboxílico tiene un centro epimérico en C₄. Los epímeros α y β de amida del ácido (4S,4aS,5aR,12aS)-4-dimetilamino-3,10,12,12a-tetrahidroxi-7-[(metoxi(metil)amino)-metil]-1,11-dioxo-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-octahidro-naftacen-2-carboxílico pueden separarse y cuantificarse mediante HPLC de fase inversa (cromatografía de líquidos de alta resolución) con análisis con detector de ultravioleta (HPLC-UV), y se miden como porcentaje de área bajo la curva, también denominado porcentaje de área de pico. Aunque el epímero de amida del ácido (4S,4aS,5aR,12aS)-4-dimetilamino-3,10,12,12a-tetrahidroxi-7-[(metoxi(metil)amino)-metil]-1,11-dioxo-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-octahidro-naftacen-2-carboxílico se cree que no es tóxico, en determinadas condiciones puede carecer de la eficacia antibacteriana de amida del ácido (4S,4aS,5aR,12aS)-4-dimetilamino-3,10,12,12a-tetrahidroxi-7-[(metoxi(metil)amino)-metil]-1,11-dioxo-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-octahidro-naftacen-2-carboxílico y, por

tanto, se considera un producto de degradación indeseable.

Cuanto menor sea el contenido de isómero β , mayor será la pureza química de la sal. El contenido de isómero β se mide después de la síntesis de la sal y se compara con el contenido medido de isómero β después del almacenamiento durante un periodo de tiempo designado. Cuando el contenido de isómero β no aumenta significativamente después del almacenamiento, no ha habido efecto negativo de almacenamiento en la pureza química de la sal y la sal es estable durante ese periodo de tiempo designado. Puesto que la captación de humedad por la tetraciclina puede ser un factor que contribuye a la epimerización, una forma de sal de amida del ácido (4S,4aS,5aR,12aS)-4-dimetilamino-3,10,12,12a-tetrahidroxi-7-[(metoxi(metil)amino)-metil]-1,11-dioxo-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-octahidro-naftacen-2-carboxílico que no es significativamente higroscópica puede proporcionar una resistencia innata a la epimerización provocada por la humedad.

Otra medida de la pureza química se define mediante el contenido de otras impurezas relacionadas, subproductos o productos de degradación de la sal, que representa la morfología del compuesto. Cuanto menor sea el contenido de impurezas total tal como se mide mediante HPLC, generalmente, mediante HPLC-UV, mayor será la pureza química de la sal. El contenido de impurezas total se mide después de la síntesis de la sal y se compara con el contenido medido de impurezas total después del almacenamiento durante un periodo de tiempo designado. Cuando el contenido de impurezas total no aumenta significativamente después del almacenamiento, no ha habido efecto negativo de almacenamiento en la pureza química de la sal y la sal es estable durante ese periodo de tiempo designado.

En determinadas realizaciones de la presente divulgación, a los 0 días, la sal de *mono*-clorhidrato cristalina de amida del ácido (4S,4aS,5aR,12aS)-4-dimetilamino-3,10,12,12a-tetrahidroxi-7-[(metoxi(metil)amino)-metil]-1,11-dioxo-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-octahidronaftacen-2-carboxílico tiene un contenido de impurezas total de menos de aproximadamente el 8% y, preferiblemente, menos de aproximadamente el 4%. En otra realización de la presente divulgación, la sal de *mono*-clorhidrato cristalina de amida del ácido (4S,4aS,5aR,12aS)-4-dimetilamino-3,10,12,12a-tetrahidroxi-7-[(metoxi(metil)amino)-metil]-1,11-dioxo-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-octahidro-naftacen-2-carboxílico tiene un contenido de impurezas total después del almacenamiento durante aproximadamente 6 meses a aproximadamente 40°C y aproximadamente el 75% de HR de menos de aproximadamente el 10% y, preferiblemente, menos de aproximadamente el 6%. En una realización determinada de la presente divulgación, la sal tiene un contenido de impurezas total después del almacenamiento durante aproximadamente 6 meses a aproximadamente 40°C y aproximadamente el 75% de HR no más de aproximadamente el 80% de área de pico mayor que el contenido de impurezas total a aproximadamente 0 días, y preferiblemente, no más de aproximadamente el 50% de área de pico mayor que el contenido de impurezas total a aproximadamente 0 días.

En una realización determinada de la presente divulgación, la sal de *mono*-clorhidrato cristalina de amida del ácido (4S,4aS,5aR,12aS)-4-dimetilamino-3,10,12,12a-tetrahidroxi-7-[(metoxi(metil)amino)-metil]-1,11-dioxo-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-octahidro-naftacen-2-carboxílico es estable y tiene un contenido de isómero β después del almacenamiento durante aproximadamente 75 días a aproximadamente 40°C y aproximadamente el 75% de HR no más de aproximadamente el 20% de área de pico mayor que el contenido de isómero β a aproximadamente 0 días. En una realización preferida, la sal tiene un contenido de isómero β después del almacenamiento durante aproximadamente 75 días a aproximadamente 40°C y aproximadamente el 75% de HR no más de aproximadamente el 10% de área de pico mayor que el contenido de isómero β a aproximadamente 0 días; en una realización más preferida, el contenido de isómero β después del almacenamiento durante aproximadamente 75 días a aproximadamente 40°C y aproximadamente el 75% de HR no es más de aproximadamente el 1% de área de pico mayor que el contenido de isómero β a aproximadamente 0 días; y en una realización adicional preferida, el contenido de isómero β después del almacenamiento durante aproximadamente 75 días a aproximadamente 40°C y aproximadamente el 75% de HR es aproximadamente igual al contenido de isómero β a aproximadamente 0 días. "Después de la síntesis" tal como se usa en el presente documento se refiere a menos de aproximadamente un día desde el momento de confirmación de la síntesis, también denominado "0 días".

En una realización determinada de la presente divulgación, el contenido de isómero β de la sal de *mono*-clorhidrato cristalina de amida del ácido (4S,4aS,5aR,12aS)-4-dimetilamino-3,10,12,12a-tetrahidroxi-7-[(metoxi(metil)amino)-metil]-1,11-dioxo-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-octahidro-naftacen-2-carboxílico a los 0 días es de aproximadamente el 0,1% a aproximadamente el 7,0% de área de pico, preferiblemente de aproximadamente el 1,0% a aproximadamente el 6,0% de área de pico, más preferiblemente de aproximadamente el 2,0% a aproximadamente el 4,0% de área de pico, y lo más preferiblemente de aproximadamente el 3,0% a aproximadamente el 4,0% de área de pico. En una realización determinada de la presente divulgación, el contenido de isómero β de la sal de *mono*-clorhidrato cristalina de amida del ácido (4S,4aS,5aR,12aS)-4-dimetilamino-3,10,12,12a-tetrahidroxi-7-[(metoxi(metil)amino)-metil]-1,11-dioxo-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-octahidro-naftacen-2-carboxílico después del almacenamiento durante al menos 3 meses es de aproximadamente el 2,0% a aproximadamente el 8,0% de área de pico, y más preferiblemente de aproximadamente el 3,0% a aproximadamente el 4,0% de área de pico. En otras realizaciones de la presente divulgación, el contenido de isómero β después del almacenamiento durante al menos 6 meses es de aproximadamente el 0,1% a aproximadamente el 10,0% de área de pico, y más preferiblemente de aproximadamente el 2,0% a aproximadamente el 8,0% de área de pico. En una realización determinada de la

presente divulgación, el contenido de isómero β de la sal de *mono*-clorhidrato cristalina de amida del ácido (4S,4aS,5aR,12aS)-4-dimetilamino-3,10,12,12a-tetrahidroxi-7-[(metoxi(metil)amino)-metil]-1,11-dioxo-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-octahidro-naftacen-2-carboxílico a los 0 días es de menos de aproximadamente el 6,0% de área de pico y después del almacenamiento durante aproximadamente 75 días a condiciones ambientales es de menos de aproximadamente el 6,0% de área de pico. Preferiblemente, el contenido de isómero β a los 0 días es de menos de aproximadamente el 4,5% de área de pico y después del almacenamiento durante aproximadamente 75 días a condiciones ambientales es de menos de aproximadamente el 4,5% de área de pico, y en una realización aún adicional, el contenido de isómero β a los 0 días es de aproximadamente el 3,8% de área de pico y después del almacenamiento durante aproximadamente 75 días a condiciones ambientales es de aproximadamente el 3,8% de área de pico.

Condiciones ambientales, tal como se usa en el presente documento, significa una temperatura de aproximadamente 20°C a aproximadamente 25°C y una HR de aproximadamente el 40%.

Otra realización de la presente divulgación es la sal de *mono*-mesilato cristalina de amida del ácido (4S,4aS,5aR,12aS)-4-dimetilamino-3,10,12,12a-tetrahidroxi-7-[(metoxi(metil)amino)-metil]-1,11-dioxo-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-octahidro-naftacen-2-carboxílico.

El término “sal de *mono*-mesilato” tal como se usa en el presente documento se refiere a un compuesto iónico que resulta de la reacción de neutralización de un ácido y una base. El compuesto se compone de un catión y un anión (en el presente documento, CH_3SO_2^-) de modo que el compuesto es neutro.

En determinadas realizaciones de la presente divulgación, la sal de *mono*-mesilato cristalina de amida del ácido (4S,4aS,5aR,12aS)-4-dimetilamino-3,10,12,12a-tetrahidroxi-7-[(metoxi(metil)amino)-metil]-1,11-dioxo-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-octahidro-naftacen-2-carboxílico tiene un patrón de XRPD sustancialmente tal como se ilustra en la figura 4 después de la síntesis de la sal cristalina.

En una realización preferida de la presente divulgación, la sal de *mono*-mesilato cristalina tiene picos característicos que aparecen al menos a un ángulo de difracción de grados 2-theta que aparecen a aproximadamente 9, aproximadamente 15 y aproximadamente 23,8, tal como se mide mediante XRPD. En una realización más preferida de la presente divulgación, la sal de *mono*-mesilato cristalina tiene picos característicos a un ángulo de difracción de grados 2-theta que aparecen al menos a aproximadamente 9, aproximadamente 15, aproximadamente 22,7 y aproximadamente 23,8, tal como se mide mediante XRPD, y todavía más preferible, la sal de *mono*-mesilato cristalina tiene picos característicos a un ángulo de difracción de grados 2-theta que aparecen al menos a aproximadamente 9, aproximadamente 15, aproximadamente 22, aproximadamente 22,7 y aproximadamente 23,8.

En una realización determinada de la presente divulgación, la sal de *mono*-mesilato cristalina de amida del ácido (4S,4aS,5aR,12aS)-4-dimetilamino-3,10,12,12a-tetrahidroxi-7-[(metoxi(metil)amino)-metil]-1,11-dioxo-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-octahidro-naftacen-2-carboxílico presenta una curva de DSC sustancialmente tal como se ilustra en la figura 5. Preferiblemente, la sal de *mono*-mesilato cristalina analizada mediante DSC no presenta acontecimientos hasta la degradación de la sal cristalina.

En una realización determinada de la presente divulgación, la sal de *mono*-mesilato cristalina de amida del ácido (4S,4aS,5aR,12aS)-4-dimetilamino-3,10,12,12a-tetrahidroxi-7-[(metoxi(metil)amino)-metil]-1,11-dioxo-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-octahidro-naftacen-2-carboxílico presenta una curva de TGA sustancialmente tal como se ilustra en la figura 6. Preferiblemente, la sal de *mono*-mesilato cristalina analizada mediante TGA presenta una pérdida de peso de aproximadamente el 1% a aproximadamente el 4% desde aproximadamente 30°C hasta aproximadamente 200°C y una pérdida de peso de aproximadamente el 3% a aproximadamente el 10% desde aproximadamente 200°C hasta aproximadamente 250°C y, más preferiblemente, una pérdida de peso de aproximadamente el 2% a aproximadamente el 3% desde aproximadamente 30°C hasta aproximadamente 200°C y una pérdida de peso de aproximadamente el 6% a aproximadamente el 7% desde aproximadamente 200°C hasta aproximadamente 250°C.

En una realización determinada de la presente divulgación, la sal de *mono*-mesilato cristalina de amida del ácido (4S,4aS,5aR,12aS)-4-dimetilamino-3,10,12,12a-tetrahidroxi-7-[(metoxi(metil)amino)-metil]-1,11-dioxo-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-octahidro-naftacen-2-carboxílico es estable y tiene un contenido de isómero β después del almacenamiento durante aproximadamente 75 días a aproximadamente 40°C y aproximadamente el 75% de HR no más de aproximadamente el 20% de área de pico mayor que el contenido de isómero β a aproximadamente 0 días. En una realización preferida de la presente divulgación, la sal tiene un contenido de isómero β después del almacenamiento durante aproximadamente 75 días a aproximadamente 40°C y aproximadamente el 75% de HR no más de aproximadamente el 10% de área de pico mayor que el contenido de isómero β a aproximadamente 0 días; en una realización más preferida, el contenido de isómero β después del almacenamiento durante aproximadamente 75 días a aproximadamente 40°C y aproximadamente el 75% de HR no es más de aproximadamente el 1% de área de pico mayor que el contenido de isómero β a aproximadamente 0 días; y en una realización adicional preferida, el contenido de isómero β después del almacenamiento durante aproximadamente 75 días a aproximadamente 40°C y

aproximadamente el 75% de HR es aproximadamente igual al contenido de isómero β a aproximadamente 0 días.

En una realización determinada de la presente divulgación, el contenido de isómero β de la sal de *mono*-mesilato cristalina de amida del ácido (4S,4aS,5aR,12aS)-4-dimetilamino-3,10,12,12a-tetrahidroxi-7-[(metoxi(metil)amino)-metil]-1,11-dioxo-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-octahidro-naftacen-2-carboxílico a los 0 días es de aproximadamente el 2,0% a aproximadamente el 10,0% de área de pico, preferiblemente de aproximadamente el 2,0% a aproximadamente el 6,0% de área de pico, y más preferiblemente de aproximadamente el 2,0% a aproximadamente el 3,0% de área de pico.

Otra realización de la presente divulgación es una sal de *mono*-sulfato cristalina de amida del ácido (4S,4aS,5aR,12aS)-4-dimetilamino-3,10,12,12a-tetrahidroxi-7-[(metoxi(metil)amino)-metil]-1,11-dioxo-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-octahidronaftacen-2-carboxílico.

El término “sal de *mono*-sulfato” tal como se usa en el presente documento se refiere a un compuesto iónico que resulta de la reacción de neutralización de un ácido y una base. El compuesto se compone de un catión y un anión (en el presente documento, SO_4^{2-}) de modo que el compuesto es neutro.

En determinadas realizaciones de la presente divulgación, la sal de *mono*-sulfato cristalina de amida del ácido (4S,4aS,5aR,12aS)-4-dimetilamino-3,10,12,12a-tetrahidroxi-7-[(metoxi(metil)amino)-metil]-1,11-dioxo-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-octahidro-naftacen-2-carboxílico tiene un patrón de XRPD sustancialmente tal como se ilustra en la figura 7 después de la síntesis de la sal cristalina.

En una realización preferida de la presente divulgación, la sal de *mono*-sulfato cristalina tiene picos característicos a un ángulo de difracción de grados 2-theta que aparecen al menos a aproximadamente 15, aproximadamente 17,8 y aproximadamente 23,5, tal como se mide mediante XRPD. En una realización más preferida de la presente divulgación, la sal de *mono*-sulfato cristalina tiene picos característicos a un ángulo de difracción de grados 2-theta que aparecen al menos a aproximadamente 15, aproximadamente 17,8, aproximadamente 22,5 y aproximadamente 23,5, tal como se mide mediante XRPD. En una realización todavía más preferida de la presente divulgación, la sal de *mono*-sulfato cristalina tiene picos característicos a un ángulo de difracción de grados 2-theta que aparecen al menos a aproximadamente 15, aproximadamente 17,8, aproximadamente 19,0, aproximadamente 22,5 y aproximadamente 23,5, tal como se mide mediante XRPD.

En una realización determinada de la presente divulgación, la sal de *mono*-sulfato cristalina de amida del ácido (4S,4aS,5aR,12aS)-4-dimetilamino-3,10,12,12a-tetrahidroxi-7-[(metoxi(metil)amino)-metil]-1,11-dioxo-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-octahidro-naftacen-2-carboxílico presenta una curva de DSC sustancialmente tal como se ilustra en la figura 8. Preferiblemente, la sal de *mono*-sulfato cristalina analizada mediante DSC no presenta acontecimientos hasta la degradación de la sal cristalina.

En una realización determinada de la presente divulgación, la sal de *mono*-sulfato cristalina de amida del ácido (4S,4aS,5aR,12aS)-4-dimetilamino-3,10,12,12a-tetrahidroxi-7-[(metoxi(metil)amino)-metil]-1,11-dioxo-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-octahidro-naftacen-2-carboxílico presenta una curva de TGA sustancialmente tal como se ilustra en la figura 9. Preferiblemente, la sal de *mono*-sulfato cristalina analizada mediante TGA presenta una pérdida de peso de aproximadamente el 1% a aproximadamente el 5% desde aproximadamente 30°C hasta aproximadamente 200°C y una pérdida de peso de aproximadamente el 12% a aproximadamente el 16% desde aproximadamente 200°C hasta aproximadamente 250°C y, más preferiblemente, una pérdida de peso de aproximadamente el 3% a aproximadamente el 4% desde aproximadamente 30°C hasta aproximadamente 200°C y una pérdida de peso de aproximadamente el 13% a aproximadamente el 14% desde aproximadamente 200°C hasta aproximadamente 250°C.

En una realización determinada de la presente divulgación, la sal de *mono*-sulfato cristalina de amida del ácido (4S,4aS,5aR,12aS)-4-dimetilamino-3,10,12,12a-tetrahidroxi-7-[(metoxi(metil)amino)-metil]-1,11-dioxo-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-octahidro-naftacen-2-carboxílico es estable y tiene un contenido de isómero β después del almacenamiento durante aproximadamente 75 días a aproximadamente 40°C y aproximadamente el 75% de HR no más de aproximadamente el 20% de área de pico mayor que el contenido de isómero β a aproximadamente 0 días.

En una realización preferida de la presente divulgación, la sal tiene un contenido de isómero β después del almacenamiento durante aproximadamente 75 días a aproximadamente 40°C y aproximadamente el 75% de HR no más de aproximadamente el 10% de área de pico mayor que el contenido de isómero β a aproximadamente 0 días; en una realización más preferida, el contenido de isómero β después del almacenamiento durante aproximadamente 75 días a aproximadamente 40°C y aproximadamente el 75% de HR no es más de aproximadamente el 1% de área de pico mayor que el contenido de isómero β a aproximadamente 0 días; y en una realización adicional preferida, el contenido de isómero β después del almacenamiento durante aproximadamente 75 días a aproximadamente 40°C y aproximadamente el 75% de HR es aproximadamente igual al contenido de isómero β a aproximadamente 0 días.

En una realización determinada de la presente divulgación, el contenido de isómero β de la sal de *mono*-sulfato cristalina de amida del ácido (4S,4aS,5aR,12aS)-4-dimetilamino-3,10,12,12a-tetrahidroxi-7-[(metoxi(metil)amino)-

metil]-1,11-dioxo-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-octahidro-naftacen-2-carboxílico a los 0 días es de aproximadamente el 3,0% a aproximadamente el 26,0% de área de pico, preferiblemente de aproximadamente el 5,0% a aproximadamente el 20,0% de área de pico, y lo más preferiblemente de aproximadamente el 6,0% a aproximadamente el 10,0% de área de pico.

5

Composiciones farmacéuticas

Una realización de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende una sal cristalina de amida del ácido (4S,4aS,5aR,12aS)-4-dimetilamino-3,10,12,12a-tetrahidroxi-7-[(metoxi(metil)amino)-metil]-1,11-dioxo-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-octahidro-naftacen-2-carboxílico, en la que la sal se selecciona de un grupo que consiste en *mono*-clorhidrato, *mono*-mesilato y *mono*-sulfato, y un excipiente farmacéuticamente aceptable, en la que la composición farmacéutica es para administración oral.

10

La composición farmacéutica de la presente invención comprende una cantidad eficaz de una sal cristalina, un excipiente farmacéuticamente aceptable, y, en algunas realizaciones, también puede contener uno o más principios activos adicionales. El contenido de sal cristalina en la composición farmacéutica de la presente invención varía según el sujeto de administración y la enfermedad diana, entre otras variables. La composición farmacéutica de la presente invención va a administrarse por vía oral. Preferiblemente, la composición farmacéutica de la presente invención puede usarse para tratar infecciones bacterianas y trastornos inflamatorios de la piel. Por ejemplo, la composición farmacéutica de la presente invención puede usarse para tratar acné y/o rosácea, por ejemplo, para tratar acné, o para tratar infecciones con bacterias Gram positivas, en la que la bacteria Gram positiva se selecciona del grupo que consiste en *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes* y *Clostridium difficile*.

15

20

Para administración oral, la sal cristalina de la presente invención puede administrarse como una cápsula, comprimido o gránulo. Los comprimidos pueden contener diversos excipientes tales como celulosa microcristalina, citrato de sodio, carbonato de calcio, fosfato de dicalcio y glicina, junto con diversos disgregantes tales como almidón (y preferiblemente almidón de maíz, patata o tapioca), ácido algínico y determinados silicatos complejos, junto con aglutinantes de granulación como polivinilpirrolidona, sacarosa, gelatina y acacia. En una realización determinada, el comprimido puede recubrirse con película. Además, agentes lubricantes tales como estearato de magnesio, lauril sulfato de sodio y talco son a menudo muy útiles para los comprimidos. También pueden emplearse otras composiciones sólidas como cargas en cápsulas de gelatina; los materiales preferidos a este respecto también incluyen lactosa o azúcar de la leche así como polietilenglicoles de alto peso molecular. Cuando se desean suspensiones y/o elixires acuosos para administración oral, la sal cristalina puede combinarse con diversos agentes edulcorantes o saborizantes, materia colorante o tintes y, si así se desea, agentes emulsionantes y/o de suspensión, junto con tales diluyentes como agua, etanol, propilenglicol, glicerina y diversas combinaciones similares de los mismos. Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden formularse de modo que la sal cristalina se libera a lo largo de un periodo de tiempo después de la administración.

30

35

Puede realizarse la preparación de tales composiciones farmacéuticas de la sal cristalina de la presente invención junto con un excipiente farmacéuticamente aceptable y, opcionalmente, un principio activo adicional, mediante cualquier técnica convencional conocida en la técnica.

40

En una realización, la sal cristalina presente en la composición farmacéutica es de aproximadamente el 0,01% a aproximadamente el 90% en peso en relación con la composición completa. Una cantidad eficaz terapéuticamente adecuada de la sal cristalina oscilará normalmente desde aproximadamente 0,01 mg/kg hasta aproximadamente 1 g/kg de peso corporal por día; en otra realización, desde aproximadamente 1 mg/kg hasta aproximadamente 600 mg/kg peso corporal por día; en otra realización, desde aproximadamente 1 mg/kg hasta aproximadamente 250 mg/kg peso corporal por día; en otra realización, desde aproximadamente 10 mg/kg hasta aproximadamente 400 mg/kg peso corporal por día; en otra realización, desde aproximadamente 10 mg/kg hasta aproximadamente 200 mg/kg de peso corporal por día; en otra realización, desde aproximadamente 10 mg/kg hasta aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal por día; en una realización, desde aproximadamente 10 mg/kg hasta aproximadamente 25 mg/kg peso corporal por día; en otra realización, desde aproximadamente 1 mg/kg hasta aproximadamente 10 mg/kg peso corporal por día; en otra realización, desde aproximadamente 0,001 mg/kg hasta aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal por día; en otra realización, desde aproximadamente 0,001 mg/kg hasta aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal por día; y en otra realización, desde aproximadamente 0,001 mg/kg hasta aproximadamente 1 mg/kg de peso corporal por día. En una realización determinada, una cantidad eficaz terapéuticamente adecuada de la sal cristalina es de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 100 miligramos por kilogramo de peso corporal de receptor por día, preferiblemente de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 50 miligramos por kilogramo de peso corporal de receptor por día, más preferiblemente desde aproximadamente 0,1 hasta aproximadamente 20 miligramos por kilogramo de peso corporal de receptor por día, e incluso más preferiblemente desde aproximadamente 0,1 hasta aproximadamente 10 miligramos por kilogramo de peso corporal de receptor por día. La dosis deseada puede administrarse una vez al día, o mediante varias dosis subdivididas, por ejemplo, de 2 a 5 dosis subdivididas, a intervalos apropiados a lo largo del día, u otra pauta adecuada.

50

55

60

65

El término "excipiente farmacéuticamente aceptable" tal como se usa en el presente documento incluye, pero no se

- limita a, uno de más de los siguientes: polímeros, resinas, plastificantes, cargas, lubricantes, diluyentes, aglutinantes, disgregantes, disolventes, codisolventes, tensioactivos, sistemas de tampón, conservantes, agentes edulcorantes, agentes saborizantes, tintes o pigmentos de calidad farmacéutica, agentes quelantes, agentes de viscosidad, y combinaciones de los mismos. Pueden usarse excipientes farmacéuticamente aceptables en cualquier componente en la elaboración de la forma de dosificación, es decir comprimido de núcleo o recubrimiento. Los agentes saborizantes y tintes y pigmentos entre aquellos útiles en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, los descritos en Handbook of Pharmaceutical Excipients (4ª ed., Pharmaceutical Press 2003). Los codisolventes adecuado incluyen, pero no se limitan a, etanol, isopropanol, acetona, y combinaciones de los mismos. Los tensioactivos adecuados incluyen, pero no se limitan a, ésteres de ácidos grasos de sorbitano de polioxietileno, monoalquil éteres de polioxietileno, monoésteres de sacarosa, emulsión de simeticona, lauril sulfato de sodio, Tween 80®, y ésteres de lanolina, éteres, y combinaciones de los mismos. Los conservantes adecuados incluyen, pero no se limitan a, fenol, ésteres alquílicos de ácido parahidroxibenzoico, ácido benzoico y las sales del mismo, ácido bórico y las sales del mismo, ácido sórbico y las sales del mismo, clorbutanol, alcohol bencílico, timerosal, nitrato y acetato fenilmercúrico, nitromersol, cloruro de benzalconio, cloruro de cetilpiridinio, metilparabeno, propilparabeno, y combinaciones de los mismos. Las cargas adecuadas incluyen, pero no se limitan a, almidón, lactosa, sacarosa, maltodextrina, y celulosa microcristalina. Los plastificantes adecuados incluyen, pero no se limitan a, citrato de trietilo, polietilenglicol, propilenglicol, ftalato de dibutilo, aceite de ricino, monoglicéridos acetilados, triacetina, y combinaciones de los mismos. Los polímeros adecuados incluyen, pero no se limitan a, etilcelulosa, trimelitato de acetato de celulosa, ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa, ftalato de acetato de celulosa, ftalato de poli(acetato de vinilo), y Eudragit® L 30-D, Eudragit® L 100-55, Eudragit® F530D y Eudragit® S 100 (Rohm Pharma GmbH y Co. KG, Darmstadt, Alemania), Acryl-EZE® y Sureteric® (Colorcon, Inc., West Point, Pa.), y combinaciones de los mismos. Los lubricantes adecuados incluyen, pero no se limitan a, estearato de magnesio, ácido esteárico, talco, y combinaciones de los mismos.
- El término "principio activo adicional" tal como se usa en el presente documento incluye cualquier agente conocido en la técnica para tratar, prevenir o reducir los síntomas de la afección que está tratándose mediante la composición farmacéutica. Tales agentes incluyen, pero no se limitan a, agentes conocidos para tratar, prevenir o reducir los síntomas de infecciones bacterianas y trastornos inflamatorios de la piel.
- La estabilidad mejorada de las sales cristalinas de la presente invención significa que los cristales son menos higroscópicos, es decir, menos sensibles a la humedad, de modo que una composición farmacéutica que contiene la sal cristalina puede almacenarse durante un periodo de tiempo más largo que las composiciones farmacéuticas previamente conocidas.
- En una realización determinada, la composición farmacéutica comprende la sal de *mono*-clorhidrato de amida del ácido (4S,4aS,5aR,12aS)-4-dimetilamino-3,10,12,12a-tetrahidroxi-7-[(metoxi(metil)amino)-metil]-1,11-dioxo-1,4,4a,5,3a,6,11,12a-octahidro-naftacen-2-carboxílico y un excipiente farmacéuticamente aceptable. En otra realización, la composición farmacéutica comprende la sal de *mono*-mesilato de amida del ácido (4S,4aS,5aR,12aS)-4-dimetilamino-3,10,12,12a-tetrahidroxi-7-[(metoxi(metil)amino)-metil]-1,11-dioxo-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-octahidro-naftacen-2-carboxílico y un excipiente farmacéuticamente aceptable. En una realización aún adicional, la composición farmacéutica comprende la sal de *mono*-sulfato de amida del ácido (4S,4aS,5aR,12aS)-4-dimetilamino-3,10,12,12a-tetrahidroxi-7-[(metoxi(metil)amino)-metil]-1,11-dioxo-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-octahidro-naftacen-2-carboxílico y un excipiente farmacéuticamente aceptable.
- La composición farmacéutica de la presente invención comprende una sal cristalina de amida del ácido (4S,4aS,5aR,12aS)-4-dimetilamino-3,10,12,12a-tetrahidroxi-7-[(metoxi(metil)amino)-metil]-1,11-dioxo-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-octahidro-naftacen-2-carboxílico seleccionada del grupo que consiste en sal de *mono*-clorhidrato, *mono*-mesilato y *mono*-sulfato.
- Métodos de uso**
- Una realización de la presente divulgación se refiere a un método para tratar acné y/o rosácea que comprende administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una sal cristalina de amida del ácido (4S,4aS,5aR,12aS)-4-dimetilamino-3,10,12,12a-tetrahidroxi-7-[(metoxi(metil)amino)-metil]-1,11-dioxo-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-octahidro-naftacen-2-carboxílico, en el que la sal cristalina se selecciona de un grupo que consiste en *mono*-clorhidrato, *mono*-mesilato y *mono*-sulfato. En una realización, la presente divulgación se refiere a un método para tratar acné. En otra realización, la presente divulgación se refiere a un método para tratar rosácea.
- El término "tratar" tal como se usa en el presente documento incluye tratamiento terapéutico y/o profiláctico de acné y/o rosácea u otras afecciones descritas en el presente documento. El tratamiento incluye la disminución o el alivio de al menos un síntoma asociado con acné y/o rosácea o al menos un síntoma asociado con otra afección descrita en el presente documento.
- El término "cantidad terapéuticamente eficaz" tal como se usa en el presente documento significa una cantidad de un compuesto o composición lo suficientemente alta para modificar significativamente de manera positiva los síntomas y/o la afección que va a tratarse, pero lo suficientemente baja para evitar efectos secundarios graves (a una razón

riesgo/beneficio razonable), dentro del alcance del juicio médico razonable. La cantidad terapéuticamente eficaz de principio activo para su uso en el método de la invención en el presente documento variará con la afección particular que esté tratándose, la edad y el estado físico del paciente que va a tratarse, la gravedad de la afección, la duración del tratamiento, la naturaleza de la terapia simultánea, el principio activo particular que está empleándose, los excipientes farmacéuticamente aceptables particulares utilizados, y factores similares dentro del conocimiento y la experiencia de un médico o veterinario experto. Anteriormente se describen diversas cantidades terapéuticamente eficaces adecuadas.

El término "sujeto" tal como se usa en el presente documento es un animal. "Sujeto" incluye, sin limitación, un humano, ratón, rata, cobaya, perro, gato, caballo, vaca, cerdo, mono, chimpancé, babuino o macaco de la India. En una realización, "sujeto" es un mamífero. En otra realización, "sujeto" es un humano.

Una determinada realización de la presente divulgación se refiere al método para tratar acné que comprende administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de la sal de *mono*-clorhidrato cristalina de amida del ácido (4S,4aS,5aR,12aS)-4-dimetilamino-3,10,12,12a-tetrahidroxi-7-[(metoxi(metil)amino)-metil]-1,11-dioxo-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-octahidro-naftacen-2-carboxílico. En una realización de la misma, la cantidad de la sal de *mono*-clorhidrato empleada está entre aproximadamente 10 mg y aproximadamente 2000 mg, y preferiblemente entre aproximadamente 25 mg y aproximadamente 500 mg. En una realización determinada de la presente divulgación, la sal de *mono*-clorhidrato se administra al menos una vez al mes, preferiblemente, cada semana, más preferiblemente, cada dos semanas, y lo más preferiblemente, la sal de *mono*-clorhidrato se administra diariamente.

Otra realización de la presente divulgación se refiere al método para tratar acné que comprende administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de la sal de *mono*-mesilato cristalina de amida del ácido (4S,4aS,5aR,12aS)-4-dimetilamino-3,10,12,12a-tetrahidroxi-7-[(metoxi(metil)amino)-metil]-1,11-dioxo-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-octahidro-naftacen-2-carboxílico. En determinadas realizaciones de la misma, la cantidad de sal de *mono*-mesilato cristalina empleada está entre aproximadamente 10 mg y aproximadamente 2000 mg, y preferiblemente entre aproximadamente 25 mg y aproximadamente 500 mg. En una realización determinada de la presente divulgación, la sal de *mono*-mesilato se administra al menos una vez al mes, preferiblemente, cada semana, más preferiblemente, cada dos semanas, y lo más preferiblemente, la sal de *mono*-mesilato se administra diariamente.

Una realización adicional de la presente divulgación se refiere al método para tratar acné que comprende administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de la sal de *mono*-sulfato cristalina de amida del ácido (4S,4aS,5aR,12aS)-4-dimetilamino-3,10,12,12a-tetrahidroxi-7-[(metoxi(metil)amino)-metil]-1,11-dioxo-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-octahidro-naftacen-2-carboxílico. En determinadas realizaciones de la presente divulgación, la cantidad de sal de *mono*-sulfato cristalina empleada está entre aproximadamente 10 mg y aproximadamente 2000 mg, y preferiblemente entre aproximadamente 25 mg y aproximadamente 500 mg. En una realización determinada de la presente divulgación, la sal de *mono*-sulfato se administra al menos una vez al mes, preferiblemente, cada semana, más preferiblemente, cada dos semanas, y lo más preferiblemente, la sal de *mono*-sulfato se administra diariamente.

Aún otra realización de la presente divulgación se refiere a un método para tratar una infección por bacterias Gram positivas que comprende administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una sal cristalina de amida del ácido (4S,4aS,5aR,12aS)-4-dimetilamino-3,10,12,12a-tetrahidroxi-7-[(metoxi(metil)amino)-metil]-1,11-dioxo-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-octahidro-naftacen-2-carboxílico, en la que la sal cristalina se selecciona de un grupo que consiste en *mono*-clorhidrato, *mono*-mesilato y *mono*-sulfato. Las infecciones por bacterias Gram positivas incluyen infecciones por *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes* y *Clostridium difficile*.

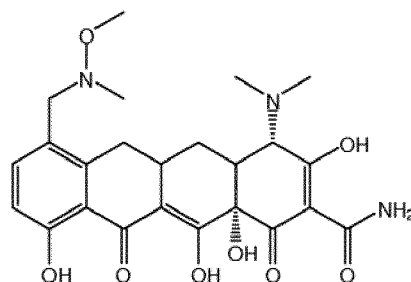
Una realización adicional de la presente divulgación se refiere a un método para tratar una infección bacteriana, por ejemplo, una infección por bacterias Gram positivas seleccionada de infección por *Streptococcus pyogenes* y *Clostridium difficile*, que comprende administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una sal cristalina de amida del ácido (4S,4aS,5aR,12aS)-4-dimetilamino-3,10,12,12a-tetrahidroxi-7-[(metoxi(metil)amino)-metil]-1,11-dioxo-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-octahidro-naftacen-2-carboxílico, preferiblemente la sal es sal de *mono*-clorhidrato, *mono*-mesilato o *mono*-sulfato.

Los siguientes ejemplos son ejemplos de referencia.

Ejemplos

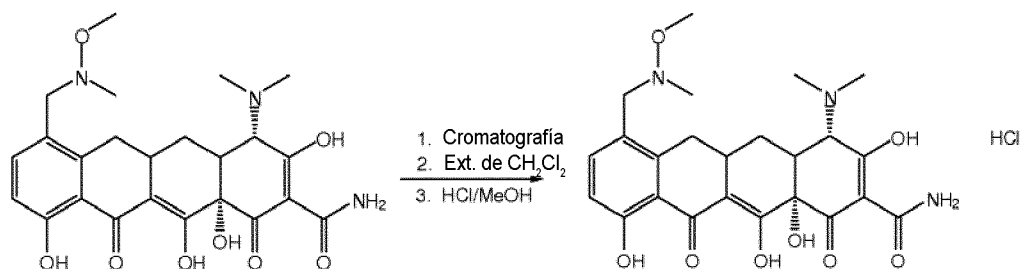
Los siguientes ejemplos ilustran la síntesis de los compuestos descritos en el presente documento.

Síntesis de amida del ácido (4S,4aS,5aR,12aS)-4-dimetilamino-3,10,12,12a-tetrahidroxi-7-[(metoxi(metil)amino)-metil]-1,11-dioxo-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-octahidro-naftacen-2-carboxílico ("la base libre").



Se agitó una disolución de sal de TFA de 7-formilsanciclina (2,23 g) y clorhidrato de N,O-dimetilhidroxilamina (780 mg) en N,N-dimetilacetamida (15 ml) durante 10 minutos a temperatura ambiente bajo atmósfera de argón. A esta disolución se le añadió cianoborohidruro de sodio (302 mg). Se agitó la disolución durante 5 minutos y se monitorizó mediante CL-EM. Se vertió la mezcla de reacción en dietil éter, y se recogieron los precipitados resultantes mediante filtración a vacío. Se purificó el producto en bruto mediante HPLC preparativa usando una columna C18 (gradiente lineal el 10-40% de acetonitrilo en trietanolamina acuosa 20 mM, pH 7,4). Se recogieron las fracciones de HPLC preparativa, y se evaporó el disolvente orgánico (acetonitrilo) a presión reducida. Se cargó la disolución acuosa resultante en una columna limpia PDVB SPE, se lavó con agua destilada, luego con una disolución de acetato de sodio 0,1 M seguido de agua destilada. Se eluyó el producto con acetonitrilo. Se concentró el eluyente a presión reducida, se obtuvieron 385 mg como base libre.

Síntesis de sal de *mono*-clorhidrato cristalina de amida del ácido (4S,4aS,5aR,12aS)-4-dimetilamino-3,10,12,12a-tetrahidroxi-7-[(metoxi(metil)amino)-metil]-1,11-dioxo-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-octahidro-naftacen-2-carboxílico (la "sal de *mono*-clorhidrato cristalina").



Se purificó la amida del ácido (4S,4aS,5aR,12aS)-4-dimetilamino-3,10,12,12a-tetrahidroxi-7-[(metoxi(metil)amino)-metil]-1,11-dioxo-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-octahidro-naftacen-2-carboxílico en bruto (100 g, ap. el 35% de ensayo) sobre cromatografía en columna preparativa. Se combinaron las fracciones deseadas (8-10 litros) y se ajustó el pH a 7,0-7,5 usando hidróxido de amonio. Se extrajo esta disolución acuosa 3 veces con diclorometano (4 litros cada vez). Se combinaron las fases de diclorometano y se concentraron a presión reducida. Se suspendió el residuo en etanol (800 ml) y se añadieron 20 ml de agua. Se ajustó el pH gradualmente a pH 1,6-1,3 usando ácido clorhídrico 1,25 M en metanol y se agitó la mezcla durante 20-60 minutos, punto en el que se disolvió completamente la base libre. Se concentró la disolución a presión reducida hasta 200-250 ml y se sembró con cristales de mono-HCl de amida del ácido (4S,4aS,5aR,12aS)-4-dimetilamino-3,10,12,12a-tetrahidroxi-7-[(metoxi(metil)amino)-metil]-1,11-dioxo-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-octahidro-naftacen-2-carboxílico (100-200 mg). Se continuó la agitación durante 2-18 horas mientras que la suspensión se mantuvo a $\leq 5^{\circ}\text{C}$. Se filtraron los cristales resultantes, se lavaron con etanol (50 ml) y se secaron a presión reducida hasta un peso constante. Se aislaron 20 g de mono-clorhidrato de amida del ácido (4S,4aS,5aR,12aS)-4-dimetilamino-3,10,12,12a-tetrahidroxi-7-[(metoxi(metil)amino)-metil]-1,11-dioxo-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-octahidro-naftacen-2-carboxílico cristalino en $\geq 90\%$ de pureza y $\geq 90\%$ de ensayo.

Síntesis de sal de *mono*-mesilato cristalina del ácido (4S,4aS,5aR,12aS)-4-dimetilamino-3,10,12,12a-tetrahidroxi-7-[(metoxi(metil)amino)-metil]-1,11-dioxo-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-octahidro-naftacen-2-carboxílico (la "sal de mesilato cristalina").

Se suspendió base libre de amida del ácido (4S,4aS,5aR,12aS)-4-dimetilamino-3,10,12,12a-tetrahidroxi-7-[(metoxi(metil)amino)-metil]-1,11-dioxo-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-octahidro-naftacen-2-carboxílico (74 mg) en etanol (740 μl) y se calentó con agitación hasta 60°C (temperatura del baño). Se añadió ácido metanosulfónico (1,1 eq, 167 μl como disolución 1 M en THF) y se disolvió la mayor parte del sólido. Después de cinco minutos, se enfrió la suspensión hasta temperatura ambiente a lo largo de aproximadamente 1,75 horas (sin controlar en baño de aceite). A 53°C , había precipitado sólido que se filtró a temperatura ambiente a presión reducida. Se añadió una porción adicional de etanol (200 μl) para ayudar la filtración, ya que la suspensión era viscosa. Se lavó la torta con n-hexano (400 μl) y se secó al aire sobre filtro durante aproximadamente 30 minutos para dar 59 mg (67% de rendimiento) de sólido amarillo.

Síntesis de sal de *mono*-sulfato cristalina del ácido (4S,4aS,5aR,12aS)-4-dimetilamino-3,10,12,12a-tetrahidroxi-7-[(metoxi(metil)amino)-metil]-1,11-dioxo-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-octahidro-naftacen-2-carboxílico (la "sal de sulfato cristalina").

Se suspendió base libre de amida del ácido (4S,4aS,5aR,12aS)-4-dimetilamino-3,10,12,12a-tetrahidroxi-7-[(metoxi(metil)amino)-metil]-1,11-dioxo-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-octahidro-naftacen-2-carboxílico (86 mg) en etanol (500 µl) y se calentó con agitación hasta 63°C (temperatura del baño), temperatura a la que se había disuelto la mayor parte de la base libre. Se añadió ácido sulfúrico (1,1 eq, 194 µl como disolución 1 M en agua) y se disolvió todo el sólido. Se enfrió la disolución hasta temperatura ambiente a lo largo de aproximadamente 1,75 horas (sin controlar en baño de aceite), temperatura a la que no había precipitado ningún sólido. Se añadió metil *t*-butil éter (MtBE) como antidisolvente (4 x 50 µl). Cada adición provocó un punto de enturbiamiento, pero el sólido volvió a disolverse con agitación. Se agitó la disolución con un tapón durante aproximadamente 3 horas, tiempo tras el cual precipitó el sólido. Se filtró el sólido a presión reducida y se lavó con MtBE (3 x 200 µl) y se secó al aire sobre filtro durante aproximadamente 45 minutos para dar 93 mg (90% de rendimiento) de sólido amarillo.

Ejemplo comparativo 1

Síntesis de sal de *bis*-clorhidrato amorfa de amida del ácido (4S,4aS,5aR,12aS)-4-dimetilamino-3,10,12,12a-tetrahidroxi-7-[(metoxi(metil)amino)-metil]-1,11-dioxo-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-octahidro-naftacen-2-carboxílico.

Se suspendió la base libre amida del ácido (4S,4aS,5aR,12aS)-4-dimetilamino-3,10,12,12a-tetrahidroxi-7-[(metoxi(metil)amino)-metil]-1,11-dioxo-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-octahidro-naftacen-2-carboxílico (1 g) en metanol (50 ml). Se convirtió la base libre en la sal de clorhidrato añadiendo un exceso de HCl metanólico seguido por una evaporación a presión reducida para dar 1,1 g de sólido amarillo: EM ($M_z+1 = 488$). ^1H RMN (300 MHz, CD₃OD) δ 7,46 (d, 1H, $J = 8,6$ Hz), 6,81 (d, 1H, $J = 8,6$ Hz), 4,09 (d, 1H, $J = 1,0$ Hz), 3,79 (d, 1H, $J = 13,1$ Hz), 3,73 (d, 1H, $J = 13,1$ Hz), 3,36 (m, 1H), 3,27 (s, 3H), 3,08-2,95 (8H), 2,61 (s, 3H), 2,38 (t, 1H, $J = 14,8$), 2,22 (m, 1H), 1,64 (m, 1H). Se muestra un patrón de XRPD en la figura 10 y se muestran unas curvas de TGA y DSC superpuestas en la figura 11.

Ejemplo comparativo 2

Síntesis de sal de *mono*-clorhidrato amorfa de amida del ácido (4S,4aS,5aR,12aS)-4-dimetilamino-3,10,12,12a-tetrahidroxi-7-[(metoxi(metil)amino)-metil]-1,11-dioxo-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-octahidro-naftacen-2-carboxílico.

Se disolvió una muestra de sal de *mono*-clorhidrato cristalina (2,09 g) en agua (250 ml, 120 vol), se filtró y se congeló en un baño a -78°C. Se retiró agua de la muestra solidificada usando un liofilizador durante 110 horas para dar la sal de *mono*-clorhidrato amorfa como sólido amarillo esponjoso, que se confirmó que era amorfa mediante análisis de XRPD.

Pruebas

Con el fin de determinar la estabilidad de la sal de *mono*-clorhidrato cristalina, se determinó el contenido de isómero β de la sal mediante análisis de HPLC-UV y se comparó con el contenido de isómero β calculado después de que la sal se almacenara en un vial de vidrio ámbar durante aproximadamente 75 días en condiciones ambientales. Los resultados se muestran en la tabla 1 a continuación. Tal como resulta evidente por los datos recogidos, el contenido de isómero β no aumentó a lo largo del tiempo y por tanto, el almacenamiento no afectó negativamente a la pureza química de la sal de *mono*-clorhidrato cristalina.

Tabla 1: Formación de isómero β en la sal de *mono*-clorhidrato cristalina después del almacenamiento.

Muestra	Pureza química a los 0 días.	Pureza química a los 75 días.
Sal de <i>mono</i> -clorhidrato cristalina	93,8% (3,8% de isómero β)	94,8% (3,8% de isómero β)

Se analizaron otras muestras de la sal de *mono*-clorhidrato cristalina mediante HPLC-UV y debido a pequeñas variaciones en el proceso de síntesis, se encontró que la pureza a los 0 días era del 93,8% (3,5% de isómero β) y 95,8% (3,4% de isómero β). No se sometió a prueba la pureza química para estas muestras después del almacenamiento.

Se demostraron pruebas adicionales de estabilidad mediante análisis del contenido de impurezas total de sal de *mono*-clorhidrato cristalina mediante HPLC-UV a los 0 días y de nuevo después del almacenamiento durante aproximadamente 6 meses a aproximadamente 40°C y aproximadamente el 75% de HR, y se encontró que era del 4% de área de pico y 6% de área de pico, respectivamente.

En las pruebas llevadas a cabo sobre la estabilidad del ejemplo comparativo 1, después de sólo 48 horas de almacenamiento a aproximadamente 40°C y aproximadamente el 75% de HR, el contenido de isómero β aumentó hasta el 31,7% de área de pico desde el 3,6% de área de pico a los 0 días. Después del almacenamiento durante 36 días a aproximadamente 25°C y aproximadamente el 60% de HR, se calculó el contenido de isómero β como el 8,7% de área de pico. En otra prueba, el compuesto del ejemplo comparativo 1 tenía un contenido de impurezas total del 4,2% de área de pico a los 0 días y el 34,6% de área de pico después del almacenamiento durante aproximadamente 2 días a aproximadamente 40°C y aproximadamente el 75% de HR. Por consiguiente, el ejemplo comparativo 1 presentó un aumento mucho mayor del contenido de impurezas total y fue significativamente menos estable que la sal de *mono*-clorhidrato cristalina.

También se determinó el contenido de isómero β del ejemplo comparativo 2 mediante análisis de HPLC-UV a los 0 días y se comparó con el contenido de isómero β calculado después de que el compuesto se almacenara en un vial de vidrio transparente durante aproximadamente 75 días en condiciones ambientales. Los resultados se muestran en la tabla 2 a continuación. Tal como resulta evidente por los datos, después del almacenamiento durante 75 días, el contenido de isómero β aumentó en más del 80% y, por tanto, el almacenamiento afectó negativamente a la pureza química del ejemplo comparativo 2.

Tabla 2: Formación de isómero β en el ejemplo comparativo 2 después del almacenamiento.

Muestra	Pureza química a los 0 días	Pureza química a los 75 días
Ejemplo comparativo 2	94,3% (4,4% de isómero β)	90,4% (7,8% de isómero β)

Se comparó la estabilidad de la sal de *mono*-clorhidrato cristalina con la sal de *mono*-clorhidrato amorfa del ejemplo comparativo 2. Los resultados de las diversas pruebas que demuestran ventajas y desventajas de la sal de *mono*-clorhidrato cristalina y del ejemplo comparativo 2 se muestran en la tabla 3 a continuación.

Tabla 3: Ventajas y desventajas de la sal de *mono*-clorhidrato cristalina y ejemplo comparativo 2.

Forma sólida	Ventajas	Desventajas
Sal de <i>mono</i> -clorhidrato cristalina	No higroscópica al 90% de HR	Alguna pérdida de cristalinidad al prensado y molienda
	Sin cambios en la forma o en el contenido de isómero β al moler o prensar	-
	Sin aumento en el contenido de isómero β durante el almacenamiento en condiciones ambientales	-
Ejemplo comparativo 2	Alta transición vítrea (166°C)	Higroscópico por encima del 70% de HR
	Estable a la cristalización tras el almacenamiento y ciclo de calor/frío	Cambio en la forma (de amorfa a cristalina) de la sal de <i>mono</i> -clorhidrato cristalina observada por encima del 75% de HR
	-	Aumento del contenido de isómero β tras el almacenamiento al 63% de HR
	-	Aumento del contenido de isómero β al prensado y molienda
	-	Aumento del contenido de isómero β durante el almacenamiento en condiciones ambientales
	-	Velocidad más rápida de formación de isómero β tras la exposición al disolvente en comparación con la sal de <i>mono</i> -clorhidrato cristalina

Se llevaron a cabo análisis de HPLC-UV y de XRPD en muestras de sal de *mono*-clorhidrato cristalina, sal de

mesilato cristalina y sal de sulfato cristalina a los 0 días y después del almacenamiento durante 7 días a 40°C y el 75% de HR. Las figuras 1,4 y 7 muestran el análisis de XRPD de la sal de *mono*-clorhidrato cristalina, sal de mesilato cristalina y sal de sulfato cristalina a los 0 días y después del almacenamiento a 40°C y el 75% de HR con los gráficos superpuestos para comparación. Tal como se muestra en la figura 1, la sal de *mono*-clorhidrato cristalina no mostró cambio en la forma de cristal después del almacenamiento. Tal como se muestra en la figura 4, la sal de mesilato cristalina tampoco mostró cambio en la forma de cristal después del almacenamiento. Los cambios mostrados en la figura son en intensidad y resolución en lugar de en posición de pico, que, si está presente, indicaría cambio en la forma de cristal. Por consiguiente, la sal de *mono*-clorhidrato cristalina y sal de mesilato cristalina son físicamente estables, tal como se muestra por las figuras 1 y 4. Tal como se muestra en la figura 7, la sal de sulfato cristalina mostró contenido cristalino aumentado después del almacenamiento.

Los resultados del análisis de HPLC-UV para las mismas muestras de sal de mesilato cristalina y sal de sulfato cristalina se muestran en la tabla 4. Como el contenido de isómero β no aumentó después del almacenamiento, estas sales no resultaron afectadas negativamente por el almacenamiento.

Tabla 4: Formación de isómero β en la sal de mesilato cristalina y sal de sulfato cristalina después del almacenamiento.

Muestra	Pureza química a los 0 días	Pureza química a los 7 días, 40°C y el 75% de HR
Sal de mesilato cristalina	92% (3% de isómero β)	98% (2% de isómero β)
Sal de sulfato cristalina	88% (9% de isómero β)	91% (9% de isómero β)

Además, se llevó a cabo análisis de calorimetría diferencial de barrido (DSC) y termogravimétrico (TGA) de la sal de *mono*-clorhidrato cristalina, sal de mesilato cristalina y sal de sulfato cristalina después de la síntesis. Las curvas de DSC se muestran en las figuras 2, 5 y 8 y las curvas de TGA se muestran en las figuras 3, 6 y 9. Estas figuras muestran que, mediante análisis de DSC, no hay acontecimientos hasta la degradación de las sales, confirmando de ese modo la estabilidad de las sales a temperaturas elevadas. Las curvas de TGA muestran que no estaban presentes hidratos o solvatos. La pérdida de peso aparente observada se debe a la inestabilidad de la máquina.

La tabla 5 a continuación compara el análisis de DSC y TGA de las sales cristalinas de la presente invención con la base libre cristalina y el ejemplo comparativo 1.

Tabla 5: Análisis de DSC y TGA de sal de *mono*-clorhidrato cristalina, sal de mesilato cristalina y sal de sulfato cristalina, base libre cristalina y ejemplo comparativo 1.

Muestra	Calorimetría diferencial de barrido	Análisis termogravimétrico
Sal de <i>mono</i> -clorhidrato cristalina	No hay acontecimientos hasta la degradación	El 3% pérdida de peso desde aproximadamente 30°C hasta aproximadamente 200°C El 14% pérdida de peso desde aproximadamente 200°C hasta aproximadamente 250°C
Sal de mesilato cristalina	No hay acontecimientos hasta la degradación	El 3% pérdida de peso desde aproximadamente 30°C hasta aproximadamente 200°C El 7% pérdida de peso desde aproximadamente 200°C hasta aproximadamente 250°C
Sal de sulfato cristalina	No hay acontecimientos hasta la degradación	El 3% pérdida de peso desde aproximadamente 30°C hasta aproximadamente 200°C El 14% pérdida de peso desde aproximadamente 200°C hasta aproximadamente 250°C
Base libre cristalina	Pico endotérmico a 175°C (ΔH 72 J.g ⁻¹)	El 15% pérdida de peso desde aproximadamente 30°C a descomposición a menos de 220°C

Ejemplo comparativo 1	Pico endotérmico amplio entre aproximadamente 20°C y aproximadamente 200°C	El 7% pérdida de peso desde aproximadamente 30°C hasta aproximadamente 106°C El 8% pérdida de peso desde aproximadamente 106°C hasta aproximadamente 200°C El 23% pérdida de peso desde aproximadamente 200°C hasta aproximadamente 300°C
-----------------------	--	--

Por consiguiente, la sal de *mono*-clorhidrato cristalina, la sal de mesilato cristalina y la sal de sulfato cristalina son más estables que la base libre cristalina y el ejemplo comparativo 1.

5 Actividad antimicrobiana

Se evaluó la actividad antimicrobiana de la sal de *mono*-clorhidrato cristalina según la actividad antianaerobia, el mecanismo de acción y los estudios de eficacia *in vivo* tal como se detalla en el presente documento. Si se usa o bien sal de *bis*-clorhidrato amorfa o bien sal de *mono*-clorhidrato cristalina de amida del ácido (4S,4aS,5aR,12aS)-4-dimetilamino-3,10,12,12a-tetrahidroxi-7-[(metoxi(metil)amino)-metil]-1,11-dioxo-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-octahidro-naftacen-2-carboxílico para preparar muestras para estos estudios, se entiende bien en la técnica que los datos de eficacia serían los mismos para todas las formas de sal, puesto que el compuesto se coloca en disolución antes de las pruebas. Por consiguiente, se empieza o bien con la sal de *mono*-clorhidrato cristalina o bien con la sal de *bis*-clorhidrato amorfa de amida del ácido (4S,4aS,5aR,12aS)-4-dimetilamino-3,10,12,12a-tetrahidroxi-7-[(metoxi(metil)amino)-metil]-1,11-dioxo-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-octahidro-naftacen-2-carboxílico, la base libre (tal como se definió anteriormente; en el presente documento "el activo") es la que está sometiéndose a prueba.

Para los estudios a continuación, se prepararon muestras con sal de *bis*-clorhidrato, y los datos se expresan basándose en la base libre ("activa"). La actividad microbiana antianaerobia global de la sal de *mono*-clorhidrato cristalina puede observarse por medio de un estudio *in vitro* del activo contra 37 cepas representativas de bacterias anaerobias y los resultados se recopilan en la tabla 6. El activo demostró una actividad relativamente potente (es decir, concentración inhibitoria mínima (CIM) de 4 µg/ml o menos) contra muchas especies de bacterias Gram positivas, incluyendo *P. acnes*. En general, la actividad del activo era similar a la de tetraciclina y doxiciclina pero menor que la de minociclina. Los organismos con altos valores de CIM para el activo (CIM ≥ 16 µg/ml) incluían *C. perfringens* y *S. constellatus*.

Los valores de CIM para los anaerobios Gram negativos se muestran en la tabla 6. Las cepas resistentes a tetraciclina tenían resistencia cruzada al activo. El activo y las demás tetraciclinas demostraron actividad potente contra *E. corrodens* y *Fusobacterium* spp., actividad moderada contra *P. melaninogenica* (1 de 2 cepas) y *V. parvula*, y escasa actividad contra *P. asaccharolytica*.

Tabla 6: Resumen de pruebas de CIM *in vitro* del activo contra bacterias anaerobias Gram positivas y Gram negativas.

Organismo/Micromyx n.º	ATCC n.º	La CIM del activo (µg/ml)	CIM de TET (µg/ml)	CIM de DOX (µg/ml)	CIM de MIN (µg/ml)
<i>Bifidobacterium bifidum</i> 3965	15696	1	1	0,5	0,25
<i>Bifidobacterium brevis</i> 3967	15698	1	1	0,5	0,25
<i>Bifidobacterium infantis</i> 3966	15702	0,5	1	0,5	0,25
<i>Bifidobacterium longum</i> 3968	15707	4	2	1	1
<i>Clostridium perfringens</i> 3414	--	16	>16	16	16
<i>Clostridium perfringens</i> 3518	--	16	>16	16	8
<i>Clostridium difficile</i> 3579	--	0,12	0,5	0,06	0,03

ES 2 985 493 T3

<i>Clostridium difficile</i> 3584	--	0,12	0,5	0,06	0,03
<i>Lactobacillus acidophilus</i> 0681	--	4	2	2	0,5
<i>Lactobacillus casei</i> 1722	393	2	2	2	0,5
<i>Lactobacillus plantarum</i> 2791	39268	2	2	2	0,5
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i> 3526	--	2	8	2	1
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i> 3531	--	4	16	4	2
<i>Peptostreptococcus micros</i> 3432	--	0,25	0,25	0,12	0,06
<i>Peptostreptococcus micros</i> 3545	--	1	1	0,5	0,25
<i>Propionibacterium acnes</i> 1713	--	0,25	0,25	0,12	0,06
<i>Propionibacterium acnes</i> 1286	11829	1	1	0,5	0,5
<i>Streptococcus constellatus</i> 1202	27823	32	>16	16	16
<i>Streptococcus intermedius</i> 1203	27335	1	2	0,5	0,25
<i>Bacteroides fragilis</i> 3374	--	0,12	0,5	0,12	0,03
<i>Bacteroides fragilis</i> 3479	--	16	>16	16	8
<i>Bacteroides ovatus</i> 3503	--	8	>16	8	4
<i>Bacteroides ovatus</i> 3508	--	0,25	0,5	0,12	0,03
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> 3399	--	0,25	1	0,25	0,03
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> 3496	--	16	>16	16	8
<i>Bacteroides vulgatus</i> 3389	--	16	>16	8	8
<i>Bacteroides vulgatus</i> 3494	--	16	>16	8	8
<i>Eikenella corrodens</i> 1206	43278	1	0,5	0,12	0,03
<i>Fusobacterium necrophorum</i> 3963	25286	0,25	0,5	0,5	0,06
<i>Fusobacterium nucleatum</i> 3962	25586	0,25	0,5	0,5	0,06
<i>Porphyromonas asaccharolytica</i> 3552	--	16	>16	4	8
<i>Porphyromonas asaccharolytica</i> 3557	--	8	16	2	4
<i>Prevotella</i>	--	32	>16	16	16

<i>melaninogenica</i> 3437					
<i>Prevotella melaninogenica</i> 3443	--	4	8	1	1
<i>Prevotella</i> spp. 3564	--	4	1	1	0,25
<i>Prevotella</i> spp. 3568	--	2	4	1	0,25
<i>Veillonella parvula</i> 1272	17745	4	1	1	0,5

"TET" es tetraciclina; "DOX" es doxiciclina; "MIN" es minociclina; "ATCC" es la Colección Americana de Cultivos Tipo.

Espectro antibacteriano de actividad

Se determinó una evaluación del espectro antibacteriano de actividad del activo en varios estudios mediante determinación de la CIM *in vitro* para una variedad de organismos aerobios y anaerobios Gram positivos y Gram negativos. Los resultados de estos ensayos (resumidos en la tabla 7) indican que el activo demuestra actividad contra propionibacterias y otros organismos Gram positivos con un espectro más estrecho de actividad que las tetraciclinas usadas a nivel clínico. Las cepas resistentes a tetraciclina tienen resistencia cruzada al activo. La actividad para cada grupo organismo se comenta en el texto que sigue a la tabla.

Tabla 7: Resumen de pruebas de CIM *in vitro* contra propionibacterias y organismos aerobios Gram positivos y Gram negativos

Organismo [Tipo] (n.º de aislados)	Compuesto	Intervalo de CIM (µg/ml)	CIM ₅₀ (µg/ml)	CIM ₉₀ (µg/ml)
Propionibacterias				
<i>P. acnes</i> [tetS] (13)	El activo	0,25 - 4	0,5	2
	Tetraciclina	0,5 - 4	0,5	4
	Doxiciclina	0,25 - 1	0,25	1
	Minociclina	≤0,06 - >8	0,125	1
<i>P. acnes</i> [tetR] (2)	El activo	>8 - >8		
	Tetraciclina	>8 - >8		
	Doxiciclina	8 - 8		
	Minociclina	2 - 2		
<i>P. acnes</i> [aislados clínicos] (55)	El activo	0,5 - 16	0,5	4
	Tetraciclina	0,5 - 32	1	2
	Doxiciclina	0,25 - 16	0,5	2
	Minociclina	0,125 - 8	0,25	1
	Clindamicina	≤0,06 - 64	≤0,06	4
	Eritromicina	≤0,06 - >128	≤0,06	>128
<i>P. acnes</i> [tetS] (2)	El activo	0,25 - 1		
	Tetraciclina	0,25 - 1		
	Doxiciclina	0,12 - 0,5		
	Minociclina	0,06 - 0,5		
	Clindamicina	0,06 - 0,25		
	Metronidazol	>32 - >32		
	Penicilina	0,03 - 0,5		
	Vancomicina	0,5 - 0,5		
<i>P. granulosum</i> [aislados clínicos] (3)	El activo	1 - 1		
	Tetraciclina	1 - 2		
	Doxiciclina	0,5 - 1		

	Minociclina	0,25 - 0,5		
	Clindamicina	≤0,06 - ≤0,06		
	Eritromicina	≤0,06 - <0,06		
<i>P. avidum</i> [aislados clínicos] (4)	El activo	1 - 4		
	Tetraciclina	1 - 8		
	Doxiciclina	0,5 - 4		
	Minociclina	0,25 - 2		
	Clindamicina	≤0,06 - 0,5		
	Eritromicina	0,125 - 0,125		
<u>Bacterias aerobias</u> <u>Gram positivas</u>				
<i>S. aureus</i> [tetS] (20)	El activo	≤0,06 - 0,25	0,125	0,25
	Tetraciclina	≤0,06 - 0,25	0,25	0,25
	Doxiciclina	≤0,06 - 0,25	≤0,06	0,25
	Minociclina	0,125 - 0,5	0,25	0,5
<i>S. aureus</i> [tetR] (10)	El activo	0,125 - 32	4	16
	Tetraciclina	2 - 64	64	64
	Doxiciclina	1 - 16	4	16
	Minociclina	0,25 - 16	0,5	8
<i>S. epidermidis</i> [MSSE] (31)	El activo	0,12 - 2	0,25	2
	Tetraciclina	0,12 - 2	0,25	2
	Doxiciclina	0,06 - 1	0,12	1
	Minociclina	0,06 - 0,25	0,06	0,25
	Eritromicina	0,12 - >32	0,25	>32
	Clindamicina	≤0,03 - >32	0,12	>32
	Oxacilina	0,06 - 0,25	0,12	0,25
	Vancomicina	1 - 2	2	2
<i>S. epidermidis</i> [MRSE] (32)	El activo	0,25 - 2	0,5	2
	Tetraciclina	0,25 - >32	1	2
	Doxiciclina	0,12 - 8	0,5	1
	Minociclina	0,06 - 0,5	0,12	0,25
	Eritromicina	0,12 - >32	>32	>32
	Clindamicina	0,06 - >32	>32	>32
	Oxacilina	0,5 - >32	32	>32
	Vancomicina	1 - 2	2	2
<i>S. pneumoniae</i> [tetS] (5)	El activo	≤0,06 - 0,125		
	Tetraciclina	≤0,06 - 0,25		
	Doxiciclina	≤0,06 - 0,125		
	Minociclina	0,25 - 0,25		
<i>S. pneumoniae</i> [tetR] (5)	El activo	4 - 32		
	Tetraciclina	32 - 64		
	Doxiciclina	4 - 4		
	Minociclina	8 - 16		
<i>S. pneumoniae</i>	El activo	≤0,03-32	0,12	0,25

[PSSP] (32)	Tetraciclina	0,06->32	0,12	0,25
	Doxiciclina	0,03->16	0,06	0,12
	Minociclina	≤0,015->16	0,06	0,12
	Eritromicina	≤0,015->16	0,03	2
	Clindamicina	≤0,015->16	0,03	0,06
	Penicilina	≤0,015-0,12	≤0,015	0,06
	Vancomicina	0,06-0,25	0,25	0,25
<i>S. pyogenes</i> (32)	El activo	0,12-16	0,12	8
	Tetraciclina	0,12-32	0,12	32
	Doxiciclina	0,06-8	0,12	4
	Minociclina	0,03-8	0,06	8
	Eritromicina	0,03->16	0,06	0,06
	Clindamicina	0,03->16	0,03	0,06
	Penicilina	≤0,015-0,25	≤0,015	≤0,015
<i>S. pyogenes</i> [tetS] (5)	Vancomicina	0,25-0,5	0,25	0,25
	El activo	≤0,06 - 0,25		
	Tetraciclina	≤0,06 - 0,125		
	Doxiciclina	≤0,06 - 0,125		
<i>S. pyogenes</i> [tetR] (5)	Minociclina	0,25 - 0,5		
	El activo	4 - 16		
	Tetraciclina	32 - 64		
	Doxiciclina	4 - 8		
<i>S. agalactiae</i> (31)	Minociclina	4 - 8		
	El activo	0,12-32	16	16
	Tetraciclina	0,12->32	32	>32
	Doxiciclina	0,06-16	8	16
	Minociclina	0,03-16	16	16
	Eritromicina	0,03->16	0,06	>16
	Clindamicina	0,03->16	0,06	>16
	Penicilina	≤0,015-2	0,03	1
<i>S. agalactiae</i> [tetS] (3)	Vancomicina	0,25-2	0,5	0,5
	El activo	0,125 - 0,25		
	Tetraciclina	0,25 - 0,25		
	Doxiciclina	0,25 - 0,25		
<i>S. agalactiae</i> [tetR] (7)	Minociclina	0,5 - 0,5		
	El activo	16 - 32		
	Tetraciclina	16 - 64		
	Doxiciclina	8 - 16		
<i>S. haemolyticus</i> (33)	Minociclina	8 - 16		
	El activo	0,12-2	0,12	2
	Tetraciclina	0,12->32	1	>32
	Doxiciclina	0,06-16	0,5	16
	Minociclina	≤0,03-0,5	0,06	0,5
	Eritromicina	0,12->32	>32	>32

	Clindamicina	0,06->32	0,12	1
	Oxacilina	0.00->32	0,25	>32
	Vancomicina	0,5-2	1	1
<i>Streptococcus</i> spp. [Grupo C] (30)	El activo	0,12-16	0,25	16
	Tetraciclina	0,12->32	0,25	32
	Doxiciclina	0,06-16	0,12	8
	Minociclina	0,03-8	0,06	8
	Eritromicina	≤0,015->16	0,06	4
	Clindamicina	≤0,015->16	0,06	0,12
	Penicilina	≤0,015-0,03	≤0,015	≤0,015
	Vancomicina	0,25-1	0,25	0,5
<i>E. faecalis</i> [tetS] (4)	El activo	≤0,06 - ≤0,06		
	Tetraciclina	0,25 - 0,5		
	Doxiciclina	≤0,06 - 0,125		
	Minociclina	0,25 - 0,5		
<i>E. faecalis</i> [tetR] (6)	El activo	8 - 32		
	Tetraciclina	32 - 64		
	Doxiciclina	2- 16		
	Minociclina	4 - 16		
<i>E. faecalis</i> [VSE] (31)	El activo	0,25 - 32	32	32
	Tetraciclina	0,25 - >64	32	64
	Doxiciclina	0,12-16	8	8
	Minociclina	0,06- 16	8	16
	Eritromicina	0,25 - >32	>32	>32
	Clindamicina	4 - >32	>32	>32
	Ampicilina	0,5-8	1	1
	Vancomicina	0,5 - 4	1	2
<i>E. faecium</i> [tetS] (4)	El activo	≤0,06 - ≤0,06		
	Tetraciclina	0,125 - 0,25		
	Doxiciclina	≤0,06 - ≤0,06		
	Minociclina	0,25 - 0,5		
<i>E. faecium</i> [tetR] (6)	El activo	8 - 32		
	Tetraciclina	32 - 64		
	Doxiciclina	4 - 16		
	Minociclina	2 - 32		
<i>E. faecium</i> [VSE] (32)	El activo	0,12 - 32	0,5	32
	Tetraciclina	0,12 - >64	1	>64
	Doxiciclina	0,06 - 32	0,5	16
	Minociclina	≤0,03 - 16	0,12	16
	Eritromicina	0,06 - >32	>32	>32
	Clindamicina	0,12 - >32	>32	>32
	Ampicilina	0,12->64	64	>64
	Vancomicina	0,25 - 2	1	1
<i>E. faecium</i>	El activo	0,12 - 32	2	32

[VRE] (30)	Tetraciclina	0,12 - >64	2	>64
	Doxiciclina	0,06 - 16	1	8
	Minociclina	≤0,03 - 16	0,25	16
	Eritromicina	0,12 - >32	>32	>32
	Clindamicina	0,06 - >32	>32	>32
	Ampicilina	8->64	>64	>64
	Vancomicina	>64	>64	>64
<u>Bacterias aerobias</u> <u>Gram negativas</u>				
<i>E. coli</i> [tetS] (7)	El activo	4 - 32		
	Tetraciclina	1 - 4		
	Doxiciclina	0,5 - 4		
	Minociclina	0,5 - 4		
<i>E. coli</i> [tetR] (3)	El activo	>64 - >64		
	Tetraciclina	>64 - >64		
	Doxiciclina	64 - 64		
	Minociclina	8 - 16		
<i>E. coli</i> (33)	El activo	2->64	16	>64
	Tetraciclina	1->64	2	>64
	Doxiciclina	0,5->32	2	32
	Minociclina	0,25>32	1	8
	Ampicilina	1->64	>64	>64
	Ciprofloxacina	0,008->2	0,015	>2
	Cefalotina	2->64	32	>64
	Tmp/Sxt	≤0,06/1,19- >64/1216	0,25/4,75	>64/1216
<i>K. pneumoniae</i> [tetS] (7)	El activo	16 - 64		
	Tetraciclina	0,5 - 4		
	Doxiciclina	0,5 - 8		
	Minociclina	1 - 16		
<i>K. pneumoniae</i> [tetR] (5)	El activo	>64 - >64		
	Tetraciclina	8 - >64		
	Doxiciclina	16 - 64		
	Minociclina	16 - >64		
<i>K. pneumoniae</i> (31)	El activo	16->64	>64	>64
	Tetraciclina	1->64	8	>64
	Doxiciclina	1->32	8	>32
	Minociclina	1->32	4	>32
	Ampicilina	>64	>64	>64
	Ciprofloxacina	0,03->2	>2	>2
	Cefalotina	>64	>64	>64
	Tmp/Sxt	0,12/2,38- >64/1216	>64/1216	>64/1216
<i>E. cloacae</i> (30)	El activo	0,25->64	32	>64
	Tetraciclina	0,5->64	2	>64

	Doxiciclina	0,06->32	2	32
	Minociclina	≤0,03->32	1	16
	Ampicilina	4->64	64	>64
	Ciprofloxacina	0,008->2	0,25	>2
	Cefalotina	2->64	>64	>64
	Tmp/Sxt	≤0,06/1,19->64/1216	0,25/4,75	>64/1216
<i>P. mirabilis</i> (30)	El activo	>64	>64	>64
	Tetraciclina	16->64	32	64
	Doxiciclina	32->32	>32	>32
	Minociclina	8->32	16	>32
	Ampicilina	0,5->64	4	>64
	Ciprofloxacina	0,015->2	>2	>2
	Cefalotina	2->64	8	>64
	Tmp/Sxt	≤0,06/1,19->64/1216	2/38	>64/1216
<i>P. aeruginosa</i> (11)	El activo	32->64	>64	>64
	Tetraciclina	4->64	64	64
	Doxiciclina	4->32	>32	>32
	Minociclina	8->32	>32	>32
	Ampicilina	>64	>64	>64
	Ciprofloxacina	0,12->2	>2	>2
	Cefalotina	>64	>64	>64
	Tmp/Sxt	2/38->64/1216	16/304	>64/1216
<i>Salmonella</i> spp. (35)	El activo	8->64	16	>64
	Tetraciclina	1->64	2	>64
	Doxiciclina	2->32	2	32
	Minociclina	1->32	2	8
	Ampicilina	0,5->64	1	>64
	Ciprofloxacina	0,015-0,25	0,015	0,03
	Cefalotina	1->64	2	16
	Tmp/Sxt	≤0,06/1,19->64/1216	≤0,06/1,19->64/1216	0,12/2,38

Abreviaturas utilizadas en la tabla 7: tetS, sensible a tetraciclina; tetR, resistente a tetraciclina; VSE, *Enterococcus* susceptible a vancomicina; VRE, *Enterococcus* resistente a vancomicina; MSSE, *Staphylococcus epidermidis* susceptible a meticilina; MRSE, *Staphylococcus epidermidis* resistente a meticilina; PSSP, *Streptococcus pneumoniae* susceptible a penicilina; CIM, concentración inhibitoria mínima; CIM₅₀, CIM a la que se inhibe el 50% de los aislados; CIM₉₀, CIM a la que se inhibe el 90% de los aislados.

Actividad antibacteriana in vitro del activo contra propionibacterias

Se evaluó la actividad antimicrobiana *in vitro* del activo contra el patógeno de acné vulgar *P. acnes* usando el método de dilución con agar aprobado por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) para anaerobios. Se realizaron pruebas de susceptibilidad midiendo la CIM contra un panel de selección de *P. acnes* que incluía varias cepas resistentes a macrólidos. Los valores determinados para el activo se compararon con miembros similares de la clase de tetraciclina de antibióticos, incluyendo los agentes terapéuticos usados a nivel clínico para el acné, doxiciclina y minociclina (tabla 7). Contra un panel de 13 *P. acnes* sensibles a tetraciclina, el activo demostró CIM comparables con doxiciclina y minociclina.

En un estudio ampliado, el activo se sometió a prueba contra 62 aislados clínicos recientes de propionibacterias junto con varios comparadores de tetraciclina (tabla 7). Contra 55 cepas de *P. acnes* aisladas en los últimos 7 años,

incluyendo 26 aislados obtenidos en los últimos 3 años, el activo demostró actividad similar a la de doxiciclina.

Actividad antimicrobiana in vitro del activo contra estafilococos

- 5 Se sometieron a prueba treinta cepas de *S. aureus* contra el activo (tabla 7) y tetraciclinas convencionales (tetraciclina, doxiciclina y minociclina). Se incluyeron cepas tipificadas con mecanismos de resistencia conocidos, protección ribosómica y eflujo activo. La actividad era variable y se comparó con doxiciclina y minociclina.

Actividad antimicrobiana in vitro del activo contra estreptococos

- 10 Se sometieron a prueba treinta cepas de estreptococos (10 de cada uno de *S. pyogenes*, *S. agalactiae* y *S. pneumoniae*) contra el activo y tetraciclinas convencionales (tetraciclina, doxiciclina, y minociclina). Se incluyeron cepas tipificadas con resistencia conocida a tetraciclina y minociclina, característica de la protección ribosómica mediada por *tetM* o *tetO*. De manera similar a los estafilococos, los intervalos de CIM y valores de CIM₉₀ (tabla 7) fueron los más próximos a minociclina y doxiciclina. El activo mostró buena actividad contra cepas susceptibles de *S. pyogenes*, con CIM comparables con doxiciclina y minociclina.

- 20 El activo demostró una distribución bimodal de los valores de CIM para *S. agalactiae* con 7 cepas inhibidas a 0,25 µg/ml o menos, y requiriendo el resto de los aislados 16-32 µg/ml para la inhibición. Los valores de CIM elevados se rastrearon con resistencia a tetraciclina. Los valores de CIM₅₀ y CIM₉₀ para el activo fueron similares a los de doxiciclina y minociclina pero menores que los de tetraciclina.

- 25 El activo demostró una potente actividad contra PSSP con todas las cepas excepto 3 inhibidas a 0,25 µg/ml o menos. Los valores de CIM elevados se rastrearon con resistencia a tetraciclina. La actividad fue similar a la de tetraciclina, doxiciclina y minociclina.

- 30 El activo demostró una potente actividad contra *S. pyogenes* con todas las cepas excepto 6 inhibidas a 0,25 µg/ml o menos. Se observaron CIM elevadas (≥ 4 µg/ml) para 5 cepas que se rastrearon con resistencia a tetraciclina. El valor de CIM₉₀ para el activo fue similar al de doxiciclina y minociclina pero menor que el de tetraciclina.

- 35 El activo demostró una distribución bimodal de los valores de CIM para los estreptococos del grupo C con 19 cepas inhibidas a 0,25 µg/ml o menos, y requiriendo el resto de los aislados 4-16 µg/ml para la inhibición. Los valores de CIM elevados se rastrearon con resistencia a tetraciclina. Los valores de CIM₅₀ y CIM₉₀ para el activo fueron similares a los de tetraciclina pero mayores que los de doxiciclina y minociclina.

Actividad antimicrobiana in vitro del activo contra enterococos

- 40 Se sometieron a prueba veinte cepas enterocócicas (10 de cada uno de *E. faecalis* y *E. faecium*) contra el activo y tetraciclinas convencionales (tetraciclina, doxiciclina y minociclina), incluyendo 11 cepas resistentes a tetraciclina bien caracterizadas (tabla 7). Al contrario que los estafilococos, el activo no fue activo contra ninguna cepa resistente a tetraciclina mediante eflujo (mediado por *tetK* o *tetL*) o mediante protección ribosómica (*tetM* o *tetO*). El activo mostró actividad contra cepas susceptibles a tetraciclina de *E. faecalis* y *E. faecium* que era comparable con la de doxiciclina.

- 45 El activo demostró una distribución bimodal de los valores de CIM para *E. faecalis* susceptible a vancomicina con 8 cepas inhibidas a 0,5 µg/ml o menos, y requiriendo el resto de los aislados 16-32 µg/ml para la inhibición. Los valores de CIM elevados se rastrearon con resistencia a tetraciclina. Los valores de CIM₅₀ y CIM₉₀ para el activo fueron similares a los de tetraciclina y mayores que los de doxiciclina y minociclina.

- 50 El activo también demostró distribución bimodal de los valores de CIM para *E. faecium* susceptible a vancomicina con 17 cepas inhibidas a 0,5 µg/ml o menos, y requiriendo el resto de los aislados 16-32 µg/ml para la inhibición. Los valores de CIM elevados se rastrearon con resistencia a tetraciclina. Los valores de CIM₅₀ y CIM₉₀ para el activo fueron similares a los de doxiciclina y minociclina con un valor de CIM₉₀ menor que el de tetraciclina.

- 55 El activo demostró un amplio intervalo de los valores de CIM para *E. faecium* resistente a vancomicina. Los valores de CIM elevados se rastrearon con resistencia a tetraciclina. El valor de CIM₅₀ para el activo fue similar al de tetraciclina y doxiciclina y 8 veces mayor que el de minociclina. El valor de CIM₉₀ para el activo fue menor que el de tetraciclina y mayor que el de doxiciclina y minociclina. Un alto porcentaje de cepas era resistente al resto de los agentes de prueba.

60 *Actividad antimicrobiana in vitro contra bacterias Gram negativas*

- 65 Contra 7 cepas de *E. coli* sensibles a tetraciclina, el activo era menos activo *in vitro* que la doxiciclina y minociclina (tabla 7). Se observó incluso menos actividad para el activo contra cepas de *K. pneumoniae* sensibles a tetraciclina. En cambio, la doxiciclina y minociclina demostraron mayor actividad contra estos organismos que el activo. Tal como

se esperaba, no se observó actividad para el activo contra 6 cepas resistentes a tetraciclina lo que demuestra eflujo activo mediado por *tetB* o *tetD*.

El activo tuvo generalmente escasa actividad contra *E. cloacae* aunque se inhibió un pequeño número de cepas (7 de 30) a 1 µg/ml o menos. El valor de CIM₅₀ fue de 16 a 32 veces mayor que el de las otras tetraciclinas. El valor de CIM₉₀ para el activo fue el mismo que el de tetraciclina y mayor que el de doxiciclina o minociclina.

El activo fue la menos activa de las tetraciclinas contra *E. coli* con valores de CIM₅₀ y CIM₉₀ de 16 y >64 µg/ml, respectivamente. El activo fue la menos activa de las tetraciclinas contra *K. pneumoniae*. El activo tuvo generalmente escasa actividad contra *Salmonella* spp., y fue la menos activa de las tetraciclinas.

Mecanismo de acción

Para los estudios a continuación, se prepararon muestras con sal de *bis*-clorhidrato, y los datos se expresan basándose en la base libre ("el activo"). El mecanismo de acción de la sal de *mono*-clorhidrato cristalina se determinó mediante dos diferentes enfoques por medio de estudio del activo, tal como se describe a continuación.

En el primer enfoque, mecanismo de acción antibacteriano: inhibición *in vitro* de transcripción y traducción bacteriana, se evaluó la capacidad del activo para inhibir la síntesis de proteína bacteriana usando un ensayo de transcripción y traducción bacteriana libre de células *in vitro* (disponible comercialmente de Promega Corporation, Madison, WI) (Beckler, G., Promega Notes 31 (1991) págs. 3-6). El activo inhibió la síntesis de proteína indicadora con una CI₅₀ de 8,3 ± 0,18 µM. Este valor era comparable a los valores de CI₅₀ determinados para las tetraciclinas comparadoras, doxiciclina y minociclina (valores de CI₅₀ de 4,7 ± 0,48 y 2,4 ± 0,22 µM, respectivamente). Estos resultados proporcionan pruebas de que el activo actúa como una tetraciclina clásica inhibiendo la síntesis de proteína bacteriana.

En el segundo enfoque, mecanismo de acción antibacteriano: inhibición de síntesis macromolecular en *Staphylococcus aureus*, la capacidad del activo para dirigir la síntesis de proteína bacteriana se confirmó adicionalmente en un ensayo de células completas de síntesis macromolecular en el organismo Gram positivo, *S. aureus*. El activo inhibió, de manera dependiente de la dosis, la incorporación de [³H]-leucina en proteínas del organismo en crecimiento dentro del intervalo de concentración de 0,25-8 veces la CIM (0,063-2 µg/ml). Se observó una inhibición máxima del 80% a 8 veces la CIM que era comparable con los valores obtenidos para los comparadores de tetraciclina, doxiciclina y minociclina. En cambio, el activo a 8 veces la CIM demostró menos del 20% de inhibición para la síntesis de la pared celular, ADN, ARN y componentes lipídicos de las bacterias de prueba. Los resultados de este estudio indican que el activo actúa como un inhibidor selectivo de la síntesis de proteína bacteriana a concentraciones comparables con tetraciclinas conocidas.

Los estudios de susceptibilidad *in vitro* descritos anteriormente incluyeron cepas resistentes a tetraciclina con genes de resistencia a tetraciclina caracterizados. Se seleccionaron cepas que albergaban los genes de resistencia a tetraciclina más comunes: eflujo (*tetK*, *tet38*, *tetL*, *tetS*, *tetB*, y *tetD*), protección ribosómica (*tetM* y *tetO*), así como *P. acnes* resistente por mutación puntual de ARNr. Los valores de CIM para estas cepas seleccionadas demostraron un grado de resistencia cruzada entre el activo y otras tetraciclinas, tal como se muestra en la tabla 8. La presencia de un gen de resistencia a tetraciclina aumentó la CIM del activo en relación con cepas susceptibles (con la excepción de *tetK* en *S. aureus*), con valores de CIM similares a los de doxiciclina y/o minociclina, pero generalmente menores que los de tetraciclina.

Tabla 8: Actividad del activo contra cepas bacterianas con mecanismos de resistencia a tetraciclina caracterizados.

Organismo	Cepa PBS n.º	Mec./genotipo	CIM del activo (µg/ml)	CIM de doxiciclina (µg/ml)	CIM de minociclina (µg/ml)
<i>P. acnes</i>	1073	mutación puntual de ARNr 16S	>8	8	2
<i>S. aureus</i>	1739	<i>tet38</i>	4	2	0,5
<i>E. coli</i>	669	<i>tetB</i>	>64	64	16
<i>K. pneumoniae</i>	266	<i>tetD</i>	>64	64	64
<i>S. aureus</i>	1309	<i>tetK</i>	0,5	2	0,5
<i>E. faecium</i>	1323	<i>tetK</i>	8	4	2
<i>E. faecalis</i>	274	<i>tetL</i>	32	16	16
<i>S. aureus</i>	1310	<i>tetM</i>	8	16	4

<i>S. pyogenes</i>	792	<i>tetM</i>	4	4	4
<i>S. agalactiae</i>	897	<i>tetM</i>	16	8	16
<i>S. pneumoniae</i>	511	<i>tetM</i>	4	4	8
<i>E. faecalis</i>	276	<i>tetM</i>	16	8	16
<i>E. faecium</i>	965	<i>tetM</i>	8	4	8
<i>S. pyogenes</i>	330	<i>tetO</i>	16	8	8
<i>S. agalactiae</i>	316	<i>tetO</i>	32	8	16
<i>E. faecium</i>	1324	<i>tetO</i>	16	4	2
<i>E. faecalis</i>	949	<i>tetS</i>	8	2	4

Modelos animales de infección

Para los estudios a continuación, se prepararon muestras con sal de *bis*-clorhidrato, y los datos se expresan basándose en la base libre ("el activo"). Se llevaron a cabo estudios de eficacia *in vivo* con el activo en tres modelos de infección animal distintos y un modelo de inflamación. Al presentar actividad comparable con el activo, los estudios muestran: 1) eficacia antiinfecciosa de la sal de *mono*-clorhidrato cristalina en comparación con otros medicamentos para el acné de tetraciclina comercialmente disponibles (doxiciclina y minociclina) contra patógenos Gram positivos representativos con susceptibilidad *in vitro* similar a *P. acnes*; y 2) la actividad antiinflamatoria de la sal de *mono*-clorhidrato cristalina.

Los comparadores se dosificaron a una concentración de 10 mg/ml en un vehículo de agua estéril y se ajustó el porcentaje de su resto activo. Todos los estudios, excepto los estudios de herida en el muslo y edema en la almohadilla de rata, se llevaron a cabo en ratones macho CD-1. El modelo de herida en el muslo se llevó a cabo usando ratones hembra CD-1 y los estudios de edema en la almohadilla de rata se llevaron a cabo con ratas macho Sprague-Dawley.

La tabla 9 presenta los datos recogidos de los siguientes tres estudios, que evaluaron la eficacia del activo.

El primer estudio evaluó el activo en un modelo de exposición intraperitoneal sistémica (IPC) de *S. aureus*. El objetivo era evaluar la actividad *in vivo* del activo contra un organismo Gram positivo en un modelo de infección aguda en comparación con tratamientos de tetraciclina comercialmente disponibles para el acné vulgar. Se prepararon cultivos bacterianos haciendo crecer *S. aureus* RN450-1 sensible a tetraciclina durante la noche, diluyendo después con solución salina estéril tamponada con fosfato (PBS). Para cada experimento, se infectó un total de 30 ratones mediante inyección en la cavidad intraperitoneal con 500 µl de $7,5 \times 10^7$ UFC en mucina bacteriológica estéril al 5%. Se trataron de cuatro a cinco grupos de tratamiento de 5 ratones cada uno con una única inyección del activo, doxiciclina, y/o minociclina a dosis que oscilaban desde 0,01 - 0,5 mg/kg en agua estéril. Las dosis se administraron por vía subcutánea (SC) a 1 hora tras la infección. Se incluyó un grupo infectado adicional de 5 ratones como grupo de control negativo (no tratado). Para todos los estudios excepto uno, se incluyó un(os) grupo(s) de control positivo (por ejemplo, doxiciclina, minociclina o ciprofloxacina). Se monitorizaron los ratones para determinar la supervivencia hasta 7 días. Se determinó la eficacia mediante el cálculo de la PD₅₀ a las 48 horas tras la infección. La PD₅₀ (dosis protectora, 50%) es la dosis requerida para lograr el 50% de supervivencia. Los valores de PD₅₀ notificados son una media de 2-3 experimentos independientes para cada fármaco sometido a prueba.

El activo presentó una potente actividad contra *S. aureus* RN450-1 dando como resultado una PD₅₀ de 0,25 mg/kg y demostró una actividad similar a doxiciclina contra un patógeno Gram positivo representativo.

El segundo estudio, eficacia del activo en un modelo de infección de herida en el muslo de *S. aureus*, examinó la actividad del activo contra una infección Gram positiva representativa en un modelo de infección basado en tejido. Se estudió la eficacia del activo contra *S. aureus* RN450-1 en un modelo de herida en el muslo de ratones inmunodeficientes. Un total de 40 ratones (n=4-8 ratones por grupo) se hizo neutropénico mediante tratamiento con ciclofosfamida cuatro días antes (150 mg/kg) y un día antes (100 mg/kg) de la infección. Se prepararon cultivos bacterianos haciendo crecer *S. aureus* RN450-1 durante la noche y diluyendo con PBS estéril. Se inyectó una inyección de 100 µl de $\sim 1 \times 10^8$ UFC/ml en PBS estéril en el muslo. Cuatro grupos de ratones para cada fármaco recibieron dosis de 0,33, 1, 3 ó 9 mg/kg por vía intravenosa a las 2 y 6 horas tras la infección. Un grupo adicional de ratones no tratados sirvió como grupo de control negativo. A las 24 horas tras la infección, los muslos se recogieron de manera aséptica, se homogeneizaron y se sembraron en placa para enumerar la carga bacteriana por muslo. Los datos se notifican como valores de ED₅₀. La ED₅₀ (dosis efectiva, 50%) es la dosis requerida para lograr una reducción 2 log₁₀ de la carga bacteriana (unidades formadoras de colonias [UFC]/órgano completo) en el órgano diana en comparación con controles no tratados.

Tal como se muestra en la tabla 9, el activo demostró eficacia equivalente a doxiciclina, un tratamiento usado comúnmente para el acné vulgar, en el modelo de herida en el muslo de *S. aureus*.

El tercer estudio, eficacia del activo en un modelo de infección de las vías respiratorias (RTI) aguda por *S. pneumoniae*, demostró actividad del activo en un modelo adicional de infección basado en tejido en comparación con doxiciclina. El activo y la doxiciclina se sometieron a prueba independientemente contra una neumonía aguda inducida por *S. pneumoniae* en ratones inmunodeficientes. En cada experimento, 35 ratones se hicieron neutropénicos mediante una inyección intraperitoneal (IP) de ciclofosfamida cuatro días antes (150 mg/kg) y un día antes (100 mg/kg) de la infección. Se hizo crecer *S. pneumoniae* PBS1339 sensible a tetraciclina sobre placas durante la noche, se recogieron las colonias y se resuspendieron en PBS estéril. Los ratones se infectaron por vía intranasal con 50 µl de esta suspensión bacteriana que contenía $\sim 6 \times 10^6$ UFC/ratón. A las 2 horas tras la infección, se trataron de 4 a 5 grupos de 5 ratones cada uno con una única dosis intravenosa (IV) del activo o doxiciclina a 5 (el activo sólo), 10, 20, 40 u 80 mg/kg disueltos en agua estéril. Cada estudio también tenía un grupo de control no tratado y un grupo que recibió un compuesto de control positivo (por ejemplo, vancomicina a 20 mg/kg IV). Se determinó la eficacia mediante el cálculo de la PD₅₀ a las 72 horas tras la infección.

Una única dosis IV del activo presentó actividad en un modelo de RTI por *S. pneumoniae* neutropénico y mortal a una PD₅₀ de 4,66 mg/kg (tal como se muestra en la tabla 9). Esta dosis era ligeramente menor que la dosis de 7,18 mg/kg requerida para lograr la PD₅₀ para doxiciclina. El activo demostró actividad en este modelo adicional de infección basado en tejido que era comparable con, o ligeramente mejor, que la de doxiciclina.

Tabla 9: Resumen de eficacia del activo y comparadores en modelos de infección murinos.

Compuesto	PD ₅₀ de IPC <i>S. aureus</i> RN450-1 (mg/kg)	ED ₅₀ muslo <i>S. aureus</i> RN450-1 (mg/kg)	PD ₅₀ de RTI <i>S. pneumoniae</i> PBS1339 (mg/kg)
El activo	0,25	8,23	4,66
Doxiciclina	0,30	8,31	7,18
Minociclina	0,03	--	--

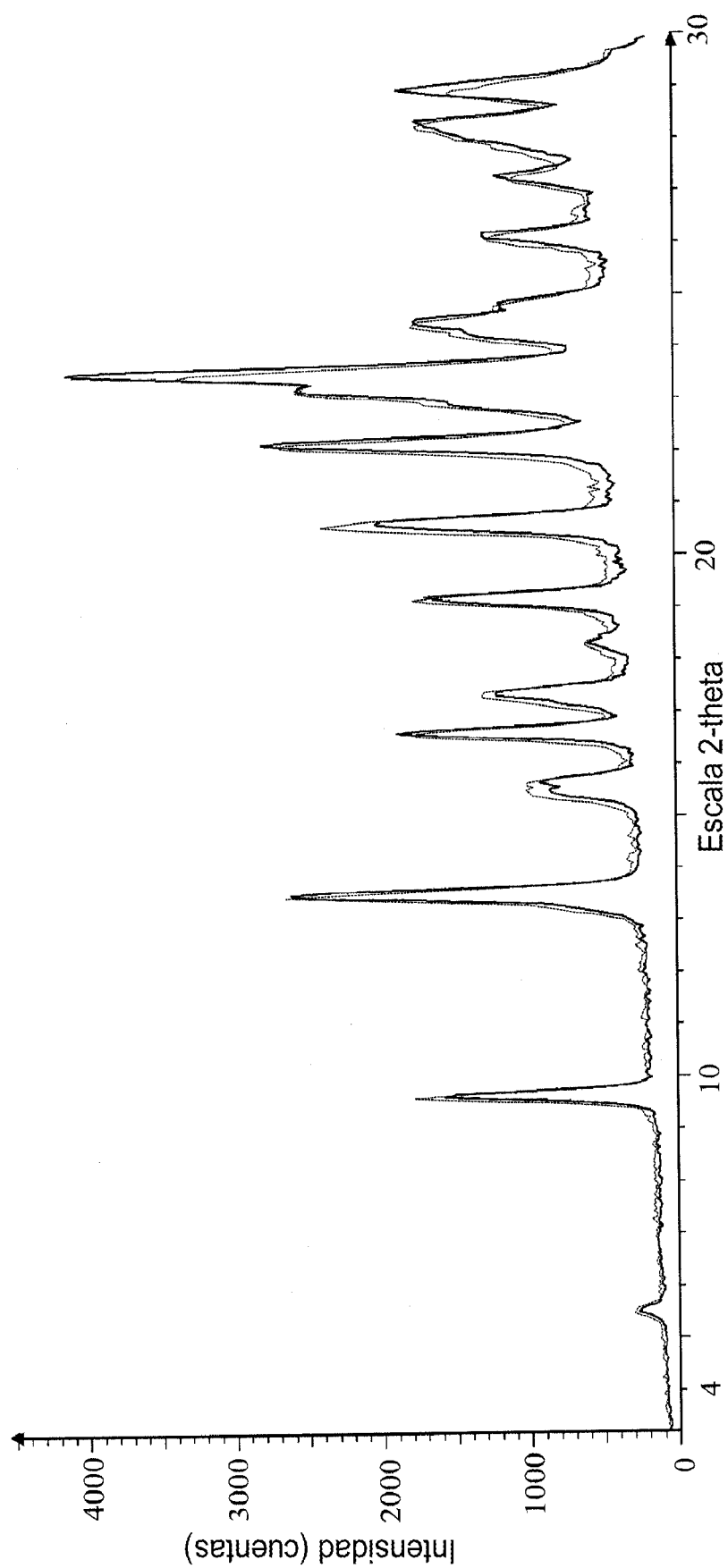
El estudio, eficacia *in vivo* del activo en un modelo de inflamación de edema de almohadilla de rata inducido por carragenanos, se llevó a cabo para evaluar las propiedades antiinflamatorias del activo en comparación con minociclina y doxiciclina. Se inyectaron grupos de 3-8 ratas por vía IP con el activo, doxiciclina, minociclina y/o control de solución salina a los 5 minutos antes de una inyección de la disolución de carragenanos inflamatoria (1 mg/100 µl) en la pata trasera. Cada estudio también tenía un grupo de control tratado con solución salina (3-8 ratas/grupo). Se sometió a prueba el activo a 5, 10, 25, 50, 75, 100 ó 150 mg/kg. Se sometió a prueba la minociclina a 25, 50, 75 ó 100 mg/kg y se sometió a prueba la doxiciclina a 75 y 100 mg/kg. Inmediatamente después de la inyección de carragenanos y 3 horas tras la inyección, se midió el volumen de la pata trasera con un pletismómetro con agua digital. Se calcularon los resultados como porcentaje de cambio en el volumen de pata a lo largo de las 3 horas, dividido entre el volumen de pata de referencia, y luego se ajustó para la media de porcentaje de inflamación en los controles no tratados, y se presentan en la tabla 10. El activo, doxiciclina y minociclina demostraron actividad antiinflamatoria a todas las dosis sometidas a prueba. El activo presentó actividad antiinflamatoria en un modelo de inflamación animal convencional comparable con otras tetraciclinas comercialmente disponibles usadas comúnmente para el tratamiento de acné vulgar.

Tabla 10: Inhibición media de la inflamación por el activo en un modelo de edema de la almohadilla de rata inducida por carragenanos.

Porcentaje medio de inflamación en comparación con los controles no tratados								
Compuesto	150 mg/kg	100 mg/kg	75 mg/kg	50 mg/kg	25 mg/kg	10 mg/kg	5 mg/kg	1 mg/kg
El activo	26	53	56	52	59	65	78	103
Doxiciclina	--	36	68	--	--	--	--	--
Minociclina	--	21	54	33	47	--	--	--

REIVINDICACIONES

1. Composición farmacéutica que comprende una sal cristalina de amida del ácido (4S,4aS,5aR,12aS)-4-dimetilamino-3,10,12,12a-tetrahidroxi-7-[(metoxi(metil)amino)-metil]-1,11-dioxo-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-octahidro-naftacen-2-carboxílico, en la que la sal se selecciona de un grupo que consiste en *mono*-clorhidrato, *mono*-mesilato y *mono*-sulfato, y en la que la composición farmacéutica es para administración oral.
5
2. Composición farmacéutica según la reivindicación 1, que está en la forma de una cápsula, un comprimido o un gránulo.
10
3. Composición farmacéutica según la reivindicación 2, que está en la forma de un comprimido.
4. Composición farmacéutica según una cualquiera de la reivindicación 3, en la que el comprimido está recubierto con película.
15
5. Composición farmacéutica según la reivindicación 3 ó 4, que contiene un excipiente, un disgregante y un aglutinante de granulación, en la que el excipiente se selecciona preferiblemente de celulosa microcristalina, citrato de sodio, carbonato de calcio, fosfato de dicalcio y glicina, el disgregante se selecciona preferiblemente de almidón, lo más preferiblemente almidón de maíz, patata o tapioca, ácido algínico y determinados silicatos complejos, y el aglutinante de granulación se selecciona preferiblemente de polivinilpirrolidona, sacarosa, gelatina y acacia.
20
6. Composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 3-5, que contiene un agente lubricante, preferiblemente estearato de magnesio, lauril sulfato de sodio y talco.
25
7. Composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, para su uso en el tratamiento de acné o rosácea.



La línea más clara es el análisis de XRPD después de la síntesis y el aislamiento a los 0 días.

La línea más oscura es el análisis de XRPD después del almacenamiento.

FIG. 1

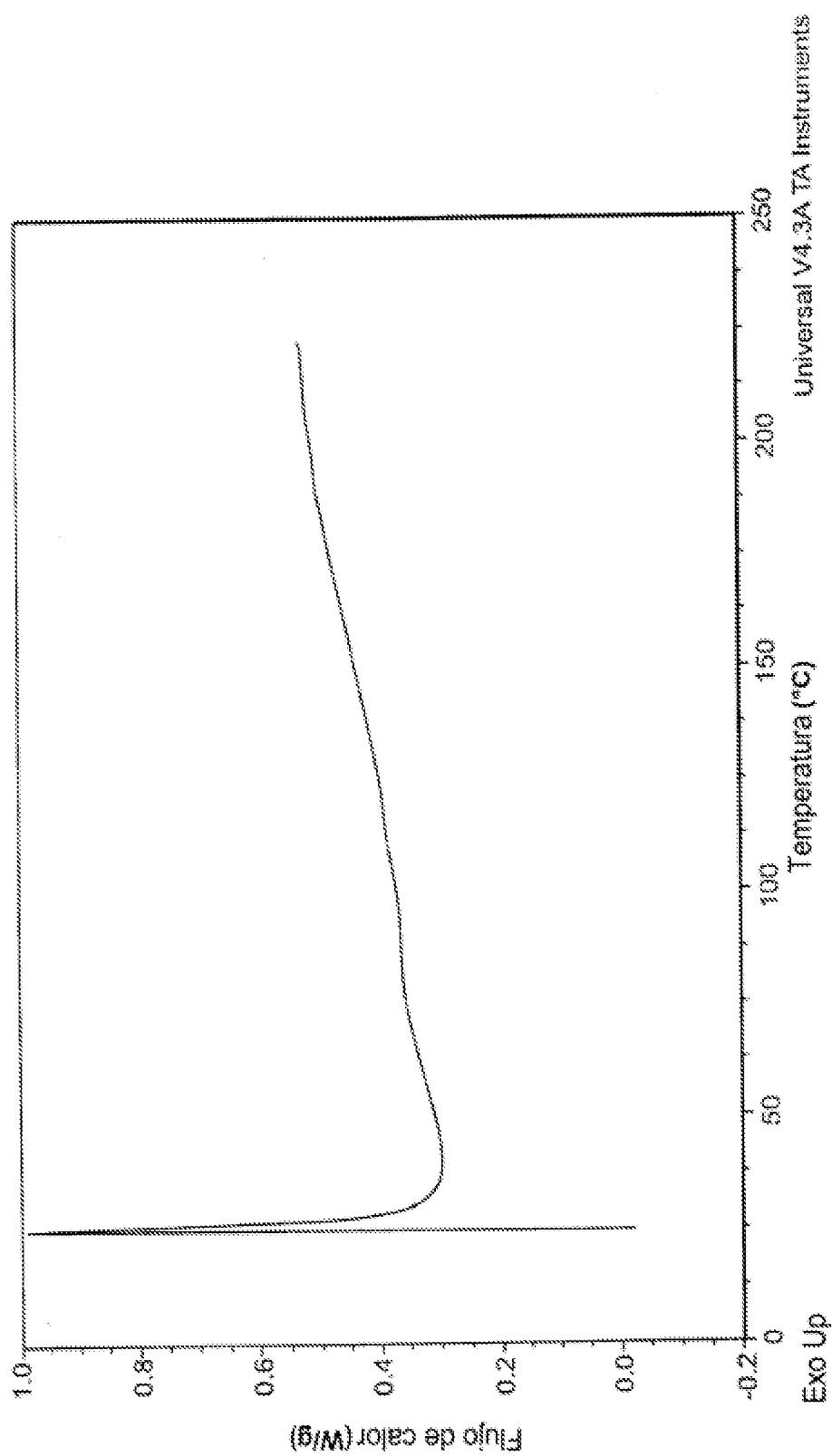


FIG. 2

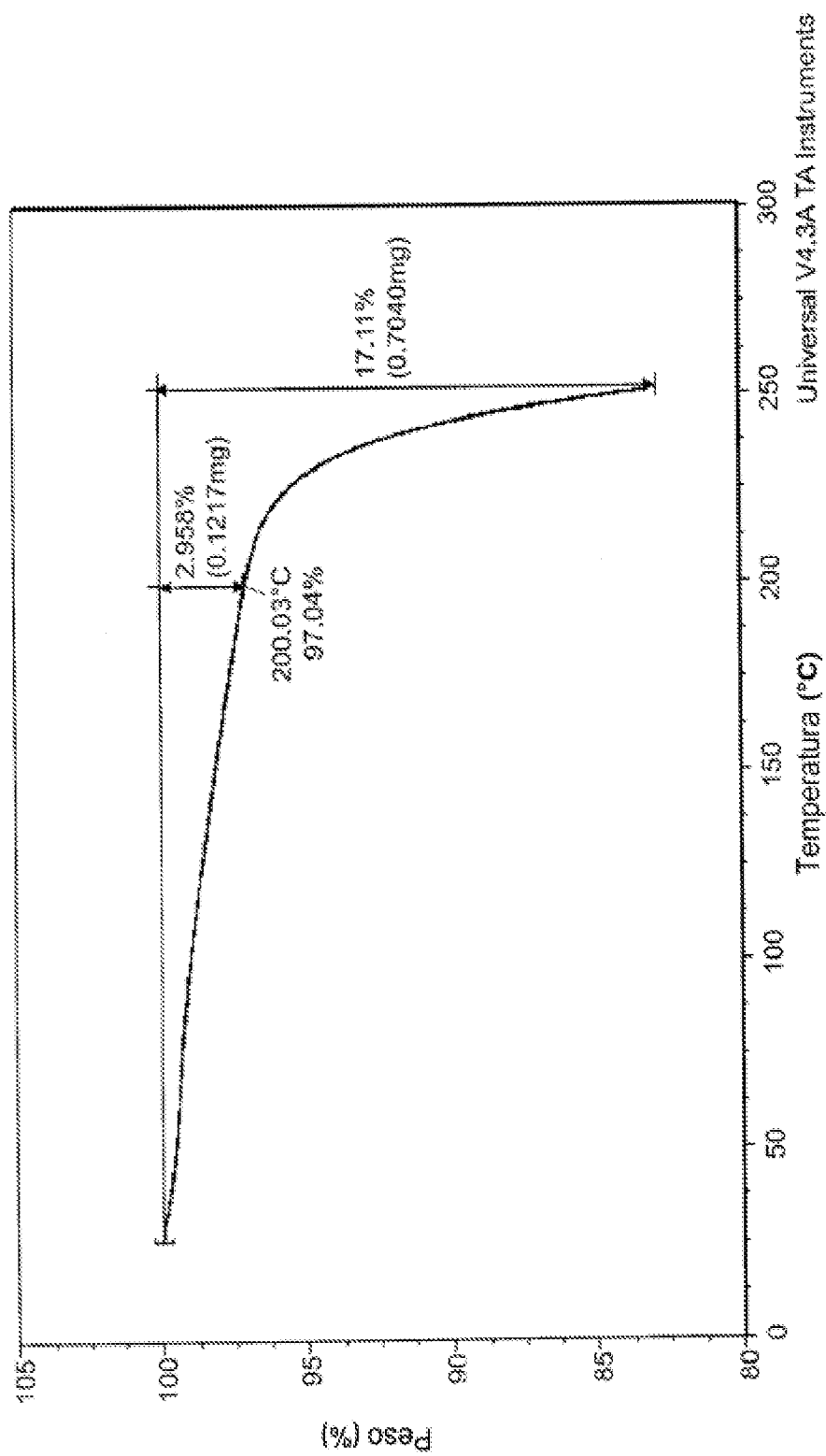
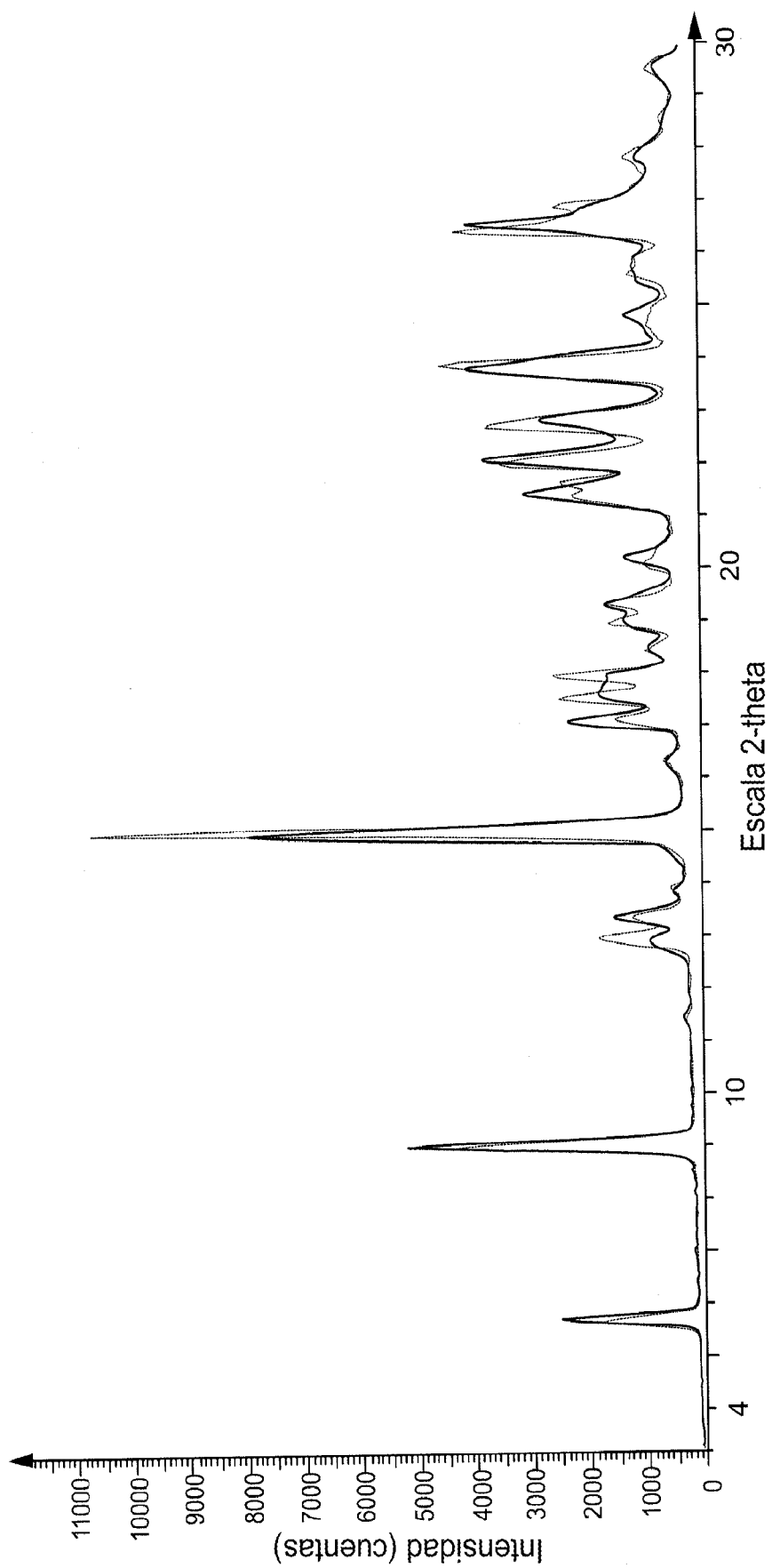


FIG. 3



La línea más clara es el análisis de XRPD después de la síntesis y el aislamiento a los 0 días.
La línea más oscura es el análisis de XRPD después del almacenamiento.

FIG. 4

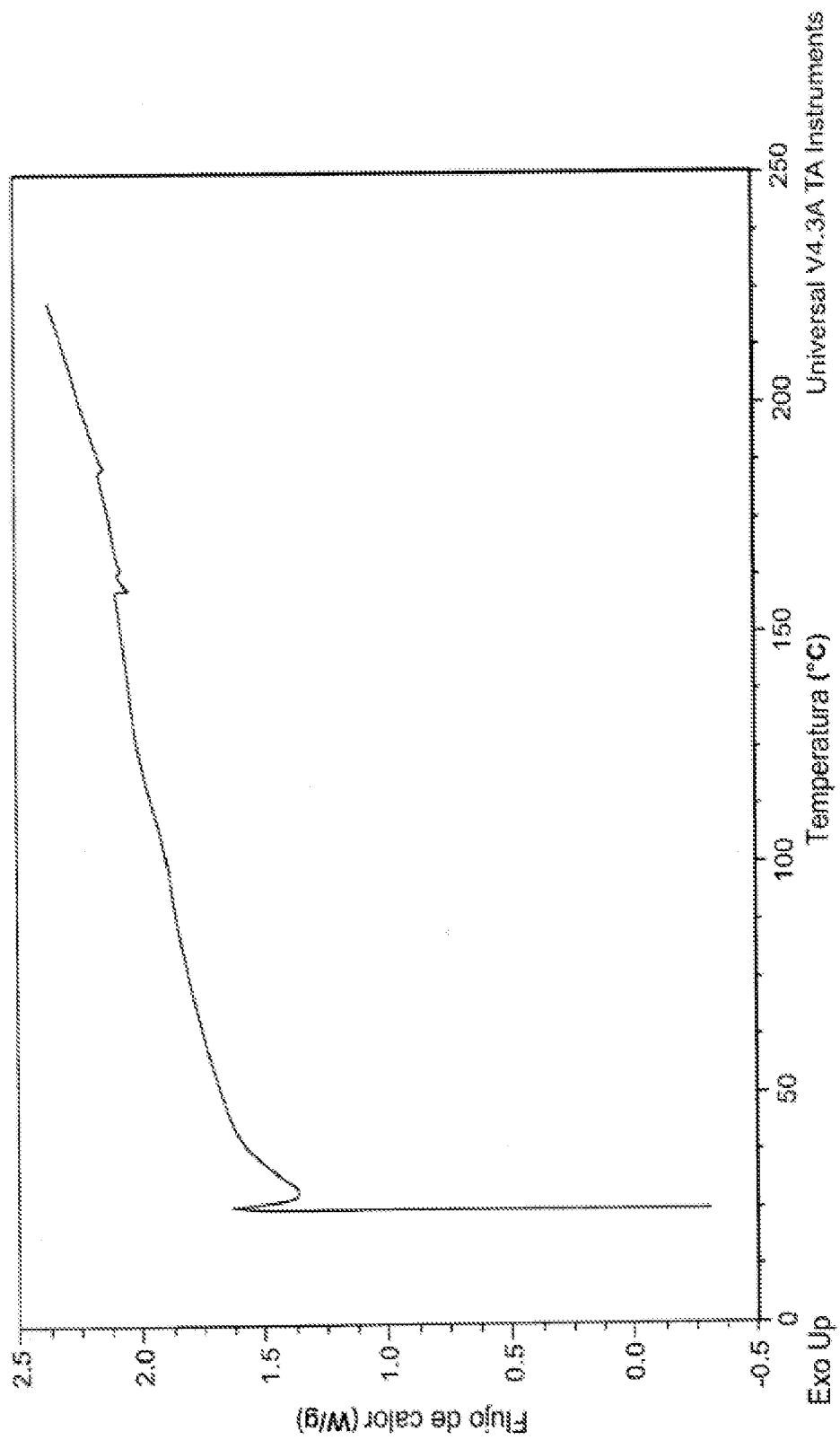
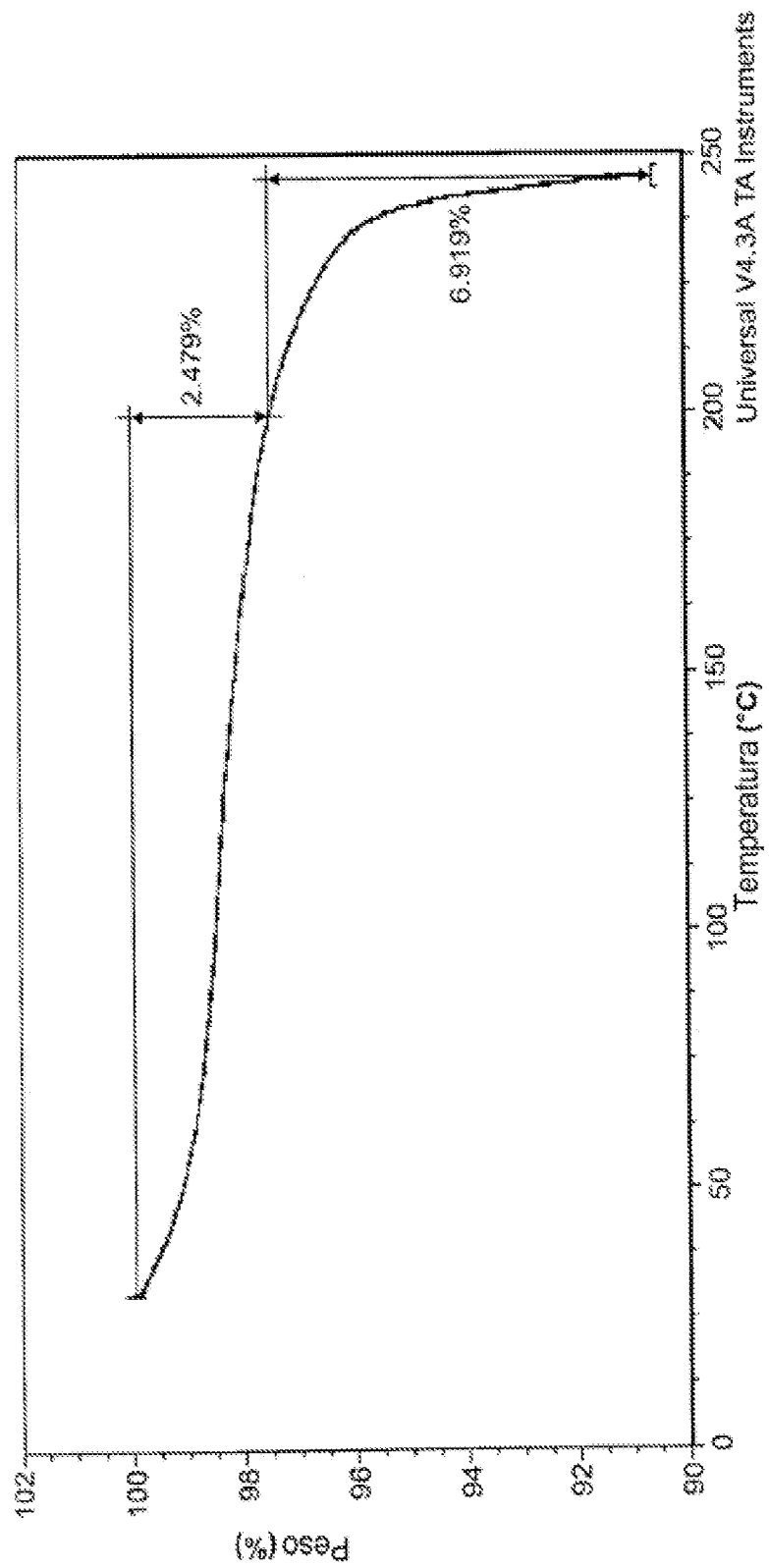
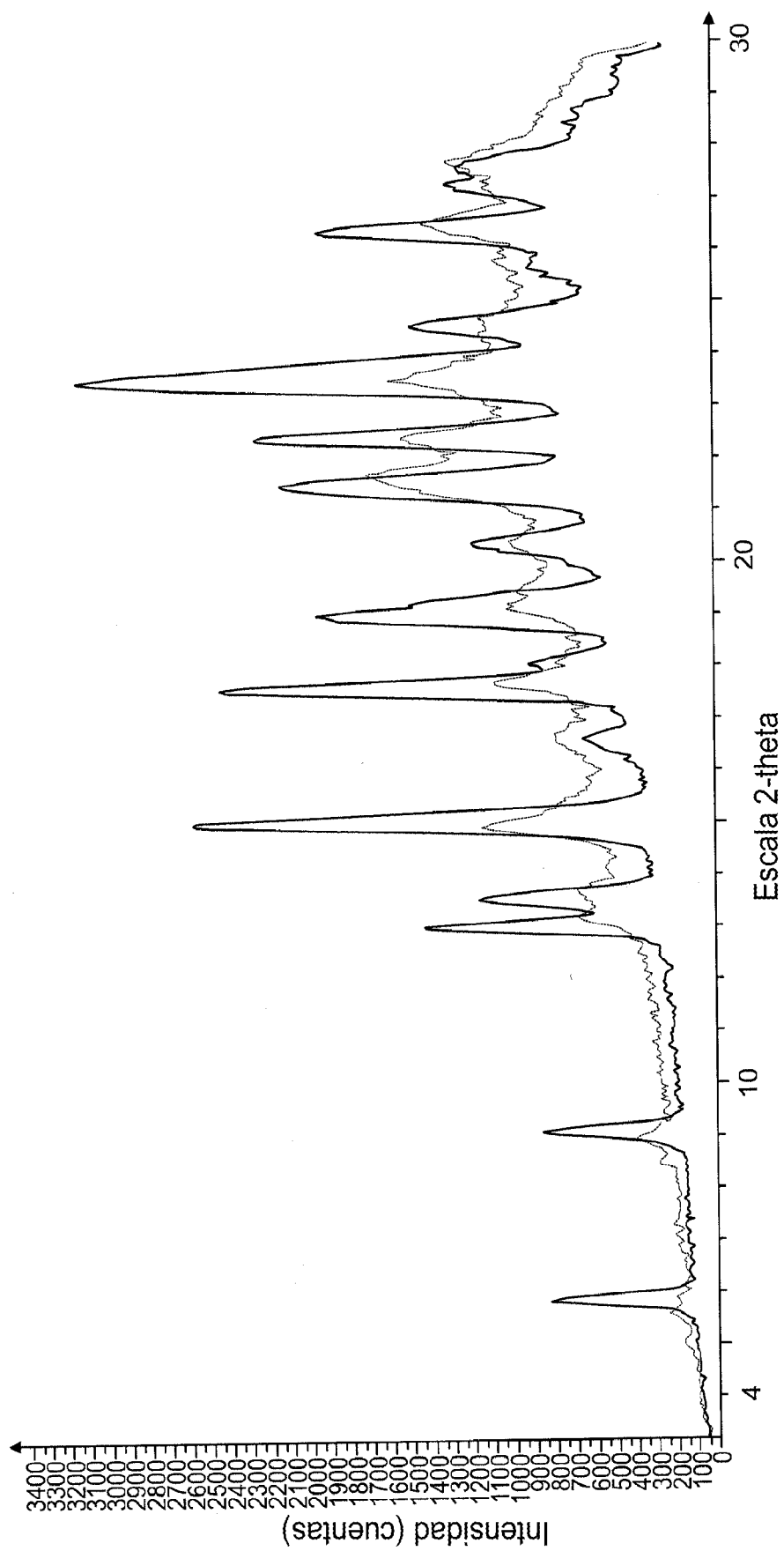


FIG. 5

FIG. 6





La línea más clara es el análisis de XRPD después de la síntesis y el aislamiento a los 0 días.
La línea más oscura es el análisis de XRPD después del almacenamiento.

FIG. 7

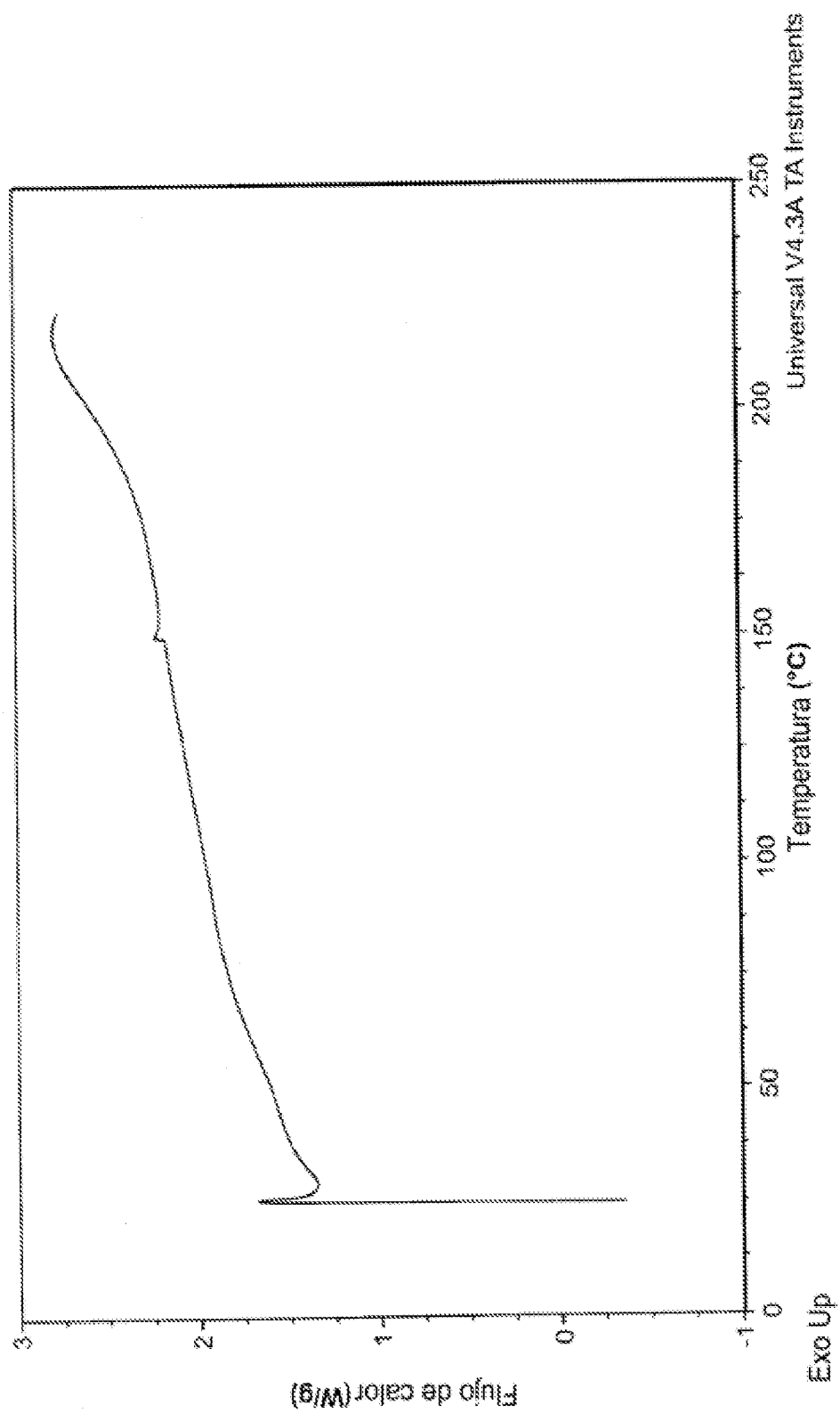


FIG. 8

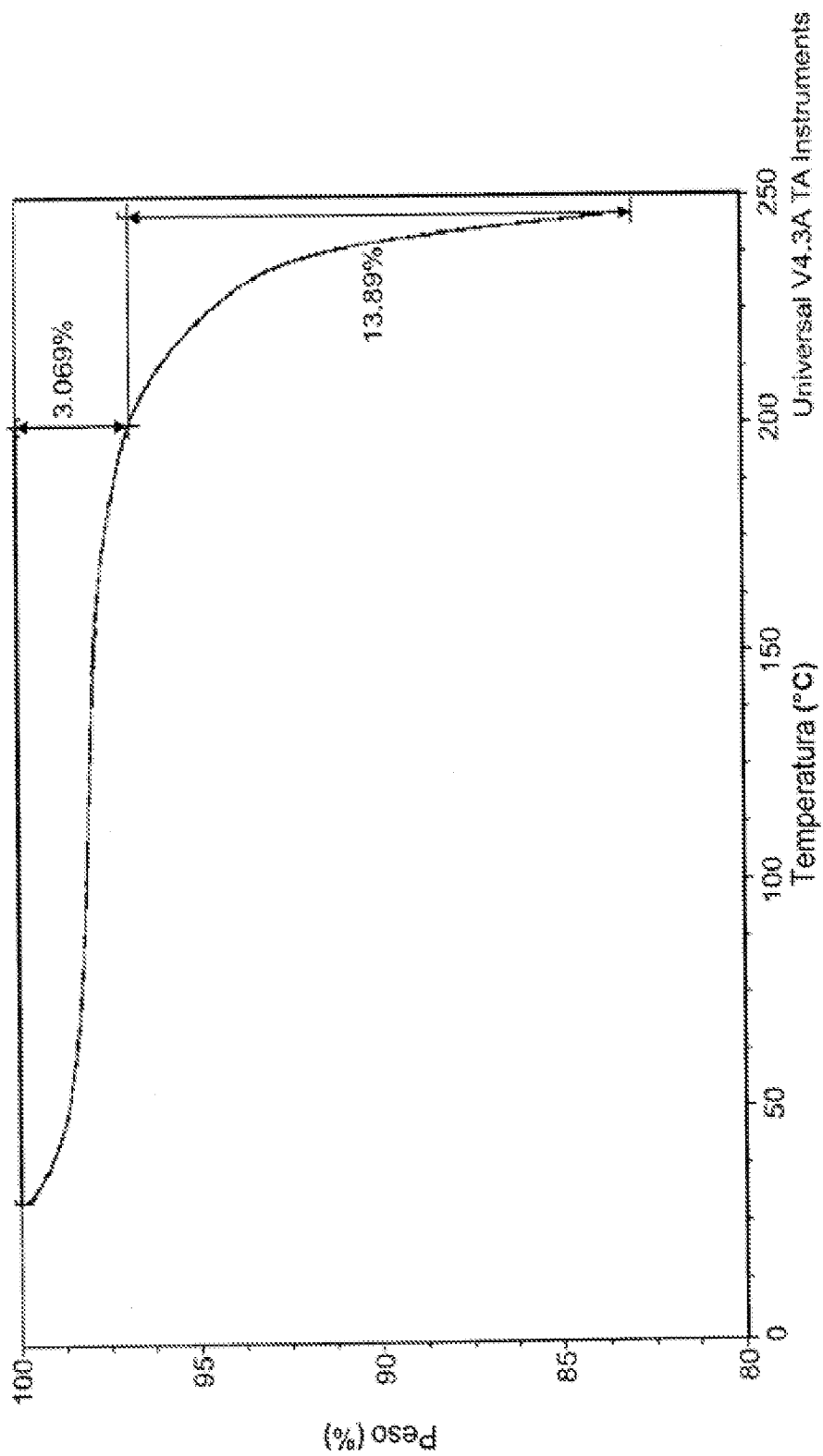
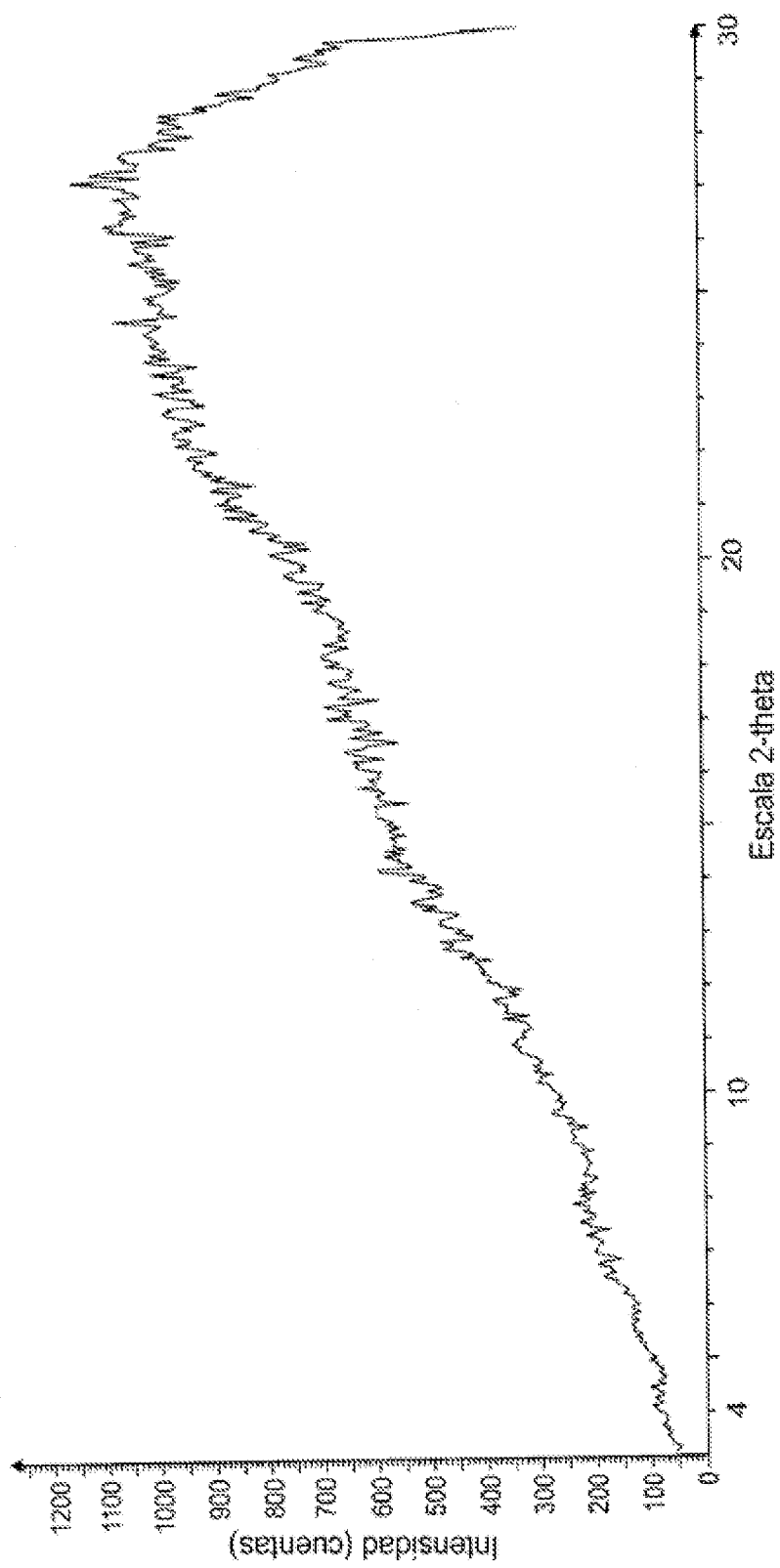


FIG. 9



ESG00043-File: G00043_01.raw-2-Theta: 3.200 °

FIG. 10

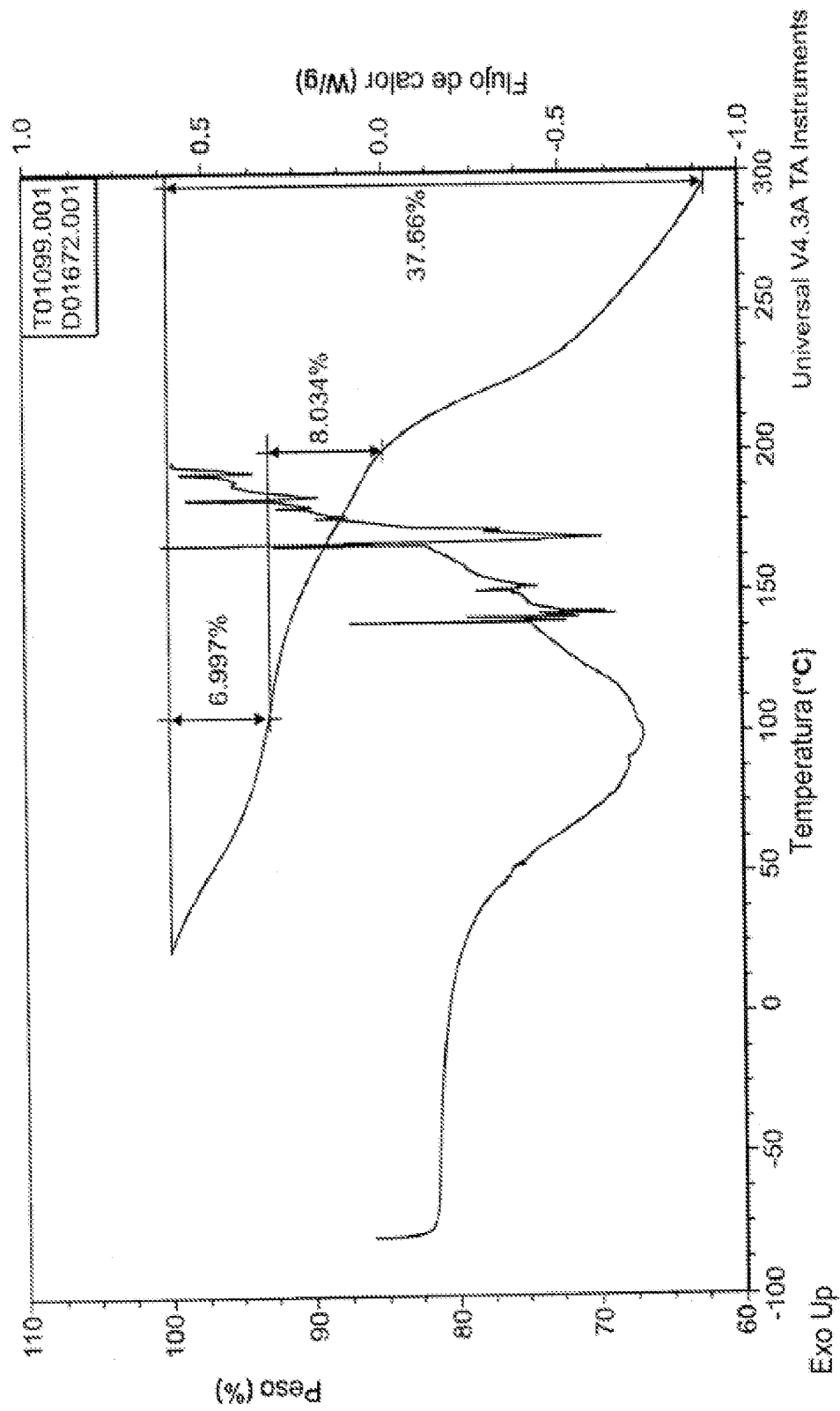


FIG. 11