

ÖZET

(4S,4AS,5AR,12AS)-4-

DİMETİLAMİNO-3,10,12,12A-TETRAHİDROKSİ-7-[(METOKSİ(METİL)AMİNO)-

METİL]-1,11-DİOKSO-1,4,4A,5,5A,6,11,12A-OKTAHİDRO-NAFTASEN-2-

KARBOKSİLİK ASİT AMİDİN KRİSTALLİ TUZLARI VE BUNLARIN KULLANIM

YÖNTEMLERİ

Gelişmiş stabiliteye sahip (4S,4aS,5aR,12aS)-4-dimetilamino-3,10,12,12a-tetrahidroksi-7-
[(metoksi(metil)amino)-metil]-1,11-diokso-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-oktahidro-naftasen-2-
karboksilik asit amidin bir kristalli mono hidroklorür tuzu tarif edilmektedir. Ek olarak,
gelişmiş stabiliteye sahip (4S,4aS,5aR,12aS)-4-dimetilamino-3,10,12,12a-tetrahidroksi-7-
[(metoksi(metil)amino)-metil]-1,11-diokso-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-oktahidro-naftasen-2-
karboksilik asit amidin bir kristalli mono mezilat tuzu ve kristalli mono sülfat tuzu tarif
edilmektedir. Kristalli tuzlar¹ uygulanmasında² içeren, inflamatuvar cilt bozuklukları^{3,4} ve
bakteriyel enfeksiyonların⁵ tedavisine yönelik kristalli tuzlar⁶ ve yöntemleri içeren bir
farmasötik bileşim tarif edilmektedir.

İSTEMLER

1. (4S,4aS,5aR,12aS)-4-dimetilamino-3,10,12,12a-tetrahidroksi-7-[(metoksi(metil) amino)-metil]-1,11-diokso-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-oktahidro-naftasen-2-karboksilik asit amidin bir kristalli tuzu olup, burada tuz *mono* hidroklorür, *mono* mezilat ve *mono* sülfattan oluşan bir gruptan seçilmektedir.
2. Tuzun, sentezden sonra, XRPD ile ölçüldüğü gibi en az yaklaşık 13.4, yaklaşık 20.5 ve yaklaşık 23.3'te görünen kırınım açısı-2-teta derecede karakteristik piklere sahip *mono* hidroklorür olduğu, "yaklaşık" teriminin, 0.2 2-teta derecesi içindeki bir aralık ifade ettiği, istem 1'e göre kristalli tuz.
3. Sentezden sonra TGA ile analiz edilen kristalli *mono* hidroklorür tuzun, yaklaşık 30°C'den yaklaşık 200°C'ye yaklaşık %1 ila yaklaşık %5 arasında bir ağırlık kaybı ve yaklaşık 200°C'den yaklaşık 250°C'ye yaklaşık %12 ila yaklaşık %16 arasında bir ağırlık kaybı sergilediği, "yaklaşık" teriminin, verilen değerlerin %10'u içindeki bir aralık ifade ettiği, istem 2'ye göre kristalli tuz.
4. Tuzun, HPLC ile ölçüldüğü gibi yaklaşık %0.1 pik alanı ile yaklaşık %7.0 pik alanından sentezinden sonra bir β -izomer içeriğine sahip olduğu, "yaklaşık" teriminin, verilen değerlerin %10'u içindeki bir aralık ifade ettiği, istem 2'ye göre kristalli tuz.
5. Tuzun, sentezden sonra, XRPD ile ölçüldüğü gibi en az yaklaşık 9, yaklaşık 15, yaklaşık 22.7 ve yaklaşık 23.8'de görünen bir kırınım açısı-2-teta derecede karakteristik piklere sahip *mono* mezilat olduğu, "yaklaşık" teriminin, 0.2 2-teta derecesi içindeki bir aralık ifade ettiği, istem 1'e göre kristalli tuz.
6. Tuzun, HPLC ile ölçüldüğü gibi yaklaşık %2.0 pik alanı ile yaklaşık %10.0 pik alanından sentezinden sonra bir β -izomer içeriğine sahip olduğu, "yaklaşık" teriminin, verilen değerlerin %10'u içindeki bir aralık ifade ettiği, istem 5'e göre kristalli tuz.
7. Tuzun, sentezden sonra, XRPD ile ölçüldüğü gibi en az yaklaşık 15, yaklaşık 17.8 ve yaklaşık 23.5'te görünen bir kırınım açısı-2-teta derecede karakteristik piklere sahip *mono* hidroklorür olduğu, "yaklaşık" teriminin, 0.2 2-teta derecesi içindeki bir aralık ifade ettiği, istem 1'e göre kristalli tuz.

8. Tuzun, HPLC ile ölçüldüğü gibi yaklaşık %3.0 pik alanı ile yaklaşık %26.0 pik alanından sentezinden sonra bir β -izomer içeriğine sahip olduğu, "yaklaşık" teriminin, verilen değerlerin %10'u içindeki bir aralıktı ifade ettiği, istem 7'ye göre kristalli tuz.

5

9. Tuzun, *mono* hidroklorür, *mono* mezilat ve *mono* sülfattan oluşan bir gruptan seçildiği, istem 1'e göre kristalli tuzu ve farmasötik olarak kabul edilebilir bir ekspiyantı içeren bir farmasötik bileşim.

10 10. Bir cilt inflamatuvar bozukluğunun tedavisinde kullanıma yönelik, istem 9'a göre bir farmasötik bileşim.

11. Akne ve gül hastalıklarının tedavisinde kullanıma yönelik, istem 9'a göre bir farmasötik bileşim.

15

12. Gram pozitif bakteriyel enfeksiyonun, *Propionibacterium acne*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumonia*, *Streptococcus pyogenes* ve *Clostridium difficile* den oluşan gruptan seçilen bakteriyel türler ile ilişkilendirildiği, bir gram pozitif bakteriyel enfeksiyonunun tedavisinde kullanıma yönelik, istem 9'a göre bir farmasötik bileşim.

20

13. Bir cilt inflamatuvar bozukluğun tedavisinde kullanıma yönelik, istem 1'e göre bir kristalli tuz.

14. Tuzun, *mono* hidroklorür, *mono* mezilat ve *mono* sülfattan oluşan bir gruptan seçildiği, aknenin tedavisinde kullanıma yönelik istem 1'e göre bir kristalli tuz.

25

15. Tuzun, *mono* hidroklorür, *mono* mezilat ve *mono* sülfattan oluşan bir gruptan seçildiği, gül hastalıklarının tedavisinde kullanıma yönelik istem 1'e göre bir kristalli tuz.

30 16. Gram pozitif bakterinin, *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumonia*, *Streptococcus pyogenes* ve *Clostridium difficile* den oluşan gruptan seçildiği, tuzun, *mono* hidroklorür, *mono* mezilat ve *mono* sülfattan oluşan bir gruptan seçildiği, bir gram pozitif bakteriyel enfeksiyonun tedavisinde kullanıma yönelik, istem 1'e göre bir kristalli tuz.

35

17.Tuzun, bir mono hidroklorür tuzu olduğu, istem 1'e göre kristalli tuz.

18.Bakterinin, *Propionibacterium acnes*, *Propionibacterium granulosum*, *Propionibacterium avidum*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pneumonia*,
5 *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus haemolyticus*,
Enterococcus faecalis, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*,
Proteus mirabilis, *Pseudomonas aeruginosa*, ve *Clostridium difficile*den oluşan gruptan
seçildiği, bir bakteriyel enfeksiyonun tedavisinde kullanıma yönelik, istem 1'e göre bir
kristalli tuz.

10

TARİFNAME

(4S,4aS,5AR,12aS)-4-

DİMETİLAMİNO-3,10,12,12A-TETRAHİDROKSİ-7-[(METOKSİ(METİL)AMİNO)-

METİL]-1,11-DİOKSO-1,4,4A,5,5A,6,11,12A-OKTAHİDRO-NAFTASEN-2-

KARBOKSİLİK ASİT AMİDİN KRİSTALLİ TUZLARI VE BUNLARIN KULLANIM

YÖNTEMLERİ

İLGİLİ BAŞVURULARA ÇAPRAZ REFERANS

TEKNİK ALAN

Mevcut buluş, (4S,4aS,5AR,12aS)-4-dimetilamino-3,10,12,12a-tetrahidroksi-7-[(metoksi (metil)amino)-metil]-1,11-diokso-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-oktahidro-naftasen-2-karboksilik asit amidin kristalli *mono* hidroklorür, *mono* mezilat ve *mono* sülfat tuzları ve bunların kullanımı yöntemleri ile ilgilidir. Daha belirgin olarak, buluş, teknikte bilinen tetrasiklin bileşikleri üzerinde gelişmiş stabiliteye sahip olan (4S,4aS,5aR,12aS)-4-dimetilamino-3,10,12,12a-tetrahidroksi-7-[(metoksi(metil)amino)-metil]-1,11-diokso-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-oktahidro-naftasen-2-karboksilik asit amidin kristalli *mono* hidroklorür, *mono* mezilat ve *mono* sülfat tuzları ile ilgilidir. Ek olarak, mevcut buluş, (4S,4aS,5aR,12aS)-4-dimetilamino-3,10,12,12a-tetrahidroksi-7-[(metoksi(metil)amino)-metil]-1,11-diokso-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-oktahidro-naftasen-2-karboksilik asit amidin kristalli *mono* hidroklorür, *mono* mezilat ve *mono* sülfat tuzları içeren farmasötik bileşimlerle ve (4S,4aS,5aR,12aS)-4-dimetilamino-3,10,12,12a-tetrahidroksi-7-[(metoksi(metil) amino)-metil]-1,11-diokso-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-oktahidro-naftasen-2-karboksilik asit amidin kristalli *mono* hidroklorür, *mono* mezilat ve *mono* sülfat tuzları kullanarak akne, gül hastalığı veya gram pozitif bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde kullanıma yönelik yukarıda değinilen kristalli tuzları içeren farmasötik bileşimler ile ilgilidir.

ÖNCEKİ TEKNİK

Tetrasiklinler, "geniş spektrumlu" antibiyotikler olarak bilinmektedir ve terapötik amaçlar için geniş ölçüde kullanılmaktadır Tetrasiklinlerin, rickettsiae; bir gram pozitif ve gram negatif bakteri; ve lenfogranüloma venereum, inklüzyon konjonktiviti ve psittakozdan sorumlu maddelere karşı farmakolojik olarak yüksek derecede etkili olduğu bulunmuştur. Tetrasiklin

antibiyotiklerinin ilk kullanımı 1948 yılına kadar uzanmaktadır. Farmasötik olarak aktif tetrasiklin ve tetrasiklin analog bileşimlerinin örnekleri, U.S. 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; ve 4,126,680 Sayılı Patent Dokümanında bulunabilmektedir. Tetrasiklinler ayrıca dermatit, sedef hastalığı, pyoderma gangrenozum, akne ve gül hastalığı dahil inflamatuvar cilt bozukluklarının tedavisi için kullanılabilmektedir.

Akne olarak da ifade edilen akne vulgaris, bir inflamatuvar cilt bozukluğudur ve bir bakteriyel enfeksiyondur. Yağ bezlerini etkileyen hormonlardan kaynaklanan bir bozukluktur, bu da tıkanmış gözenekler ve lezyonların salgılarına veya sivilcedir. Akne, neredeyse 17 milyon insanı etkileyen Amerika Birleşik Devletleri'nde en yaygın cilt hastalığıdır. Şiddetli akne şekil bozukluğuna ve kalıcı yara izlerine neden olabilmektedir.

Akne, pilosebaceal birimlerin (PSU'lar) bir bozukluğu olarak tanımlanmaktadır. Çoğu gövde boyunca, PSU'ların yağ bezlerinden oluştuğu bulunmaktadır, bu da bir gözenek olarak adlandırılan folikülün açıldığı vasıtasıyla cilt yüzeyine normal bir şekilde boşalan bir yağlı maddeyi oluşturmaktadır. Gözenek tıkanıklığında, yağ ve hücrelerin karışımı ciltte normal bir şekilde canlı olan bakterilerin, tıkanmış foliküllerde büyümesine izin vermektedir, bu da kimyasallar ve enzimleri üretmektedir ve inflamasyona yol açan beyaz kan hücrelerini çekmektedir. Tıkanmış folikül kopmaktadır, sebum, dökülen cilt hücreleri ve bakteriler, dokuların yakınına dokulara yayılarak, lezyonlara veya sivilcelere yol açmaktadır.

Akne, bakteri büyümesini azaltma için tetrasiklinler dahil sistemik antibiyotiklerle yaygın olarak tedavi edilmektedir. Verimliliğin, *Propionibacterium acnes* (*P.acnes*) üzerinde, bu antibiyotiklerin temel anti-inflamatuvar özellikleri üzerinde bir etkiden kaynaklandığı düşünülmektedir. *Propionibacterium acnes*, akneye bağlanan bir nispeten yavaş büyüyen, tipik olarak aerotolerant anaerobik gram pozitif bakteridir (çomak hücresi). Tetrasiklinlerin *P.acnes*'i öldürmede etkili olduğu bilinmektedir ve diğer bakteriler, antibakteriyel ve anti-inflamatuvar özelliklerden dolayı akneyi tedavi etmek üzere kullanılmaktadır.

Gül hastalığı, başlıca kuzey batı Avrupa kökeninden bireyleri etkileyen yüz kızarıklığı ile karakterize edilen bir cilt bozukluğudur. Gül hastalığının erken semptomları çene, burun, cilt veya alında kızarıklık, yüzünde küçük görünür kan damarları şişlik veya sivilce; ve sulu ve tahriş olmuş gözleri içermektedir. Gül hastalığının nedenleri zayıf olarak anlaşılmış olsa da, tetrasiklinler gibi sistemik antibiyotikler, anti-inflamatuvar ve antibakteriyel

özelliklerden dolayı ül hastalıklarının tedavisi için yaygın olarak reçete edilmektedir.

Büyük ve küçük rahatsızlıklar ve hastalara yönelik tetrasiklinlerin geniş kullanılmaları, bu antibiyotiklere direnç yol açtıktan sonra, ikame edilmiş tetrasiklin bileşiklerin, bakteriyel enfeksiyonlar, inflamasyon, neoplazmalar ve diğer koşulların tedavi etmek için geliştirilmiştir. "Tetrasiklin bileşiği" terimi, tetrasikline bir benzer halka yapısına sahip birçok bileşiği içermektedir. Bu tetrasiklin bileşiklerinin örneklerini içermektedir: klortetrasiklin, doksisisiklin, minosiklin, oksitetrasiklin, demeklosiklin, metasiklin, sisiklin, kelsokardin, rolitetrasiklin, lisiklin, apisiklin; klomosiklin, guamesiklin, meglusiklin, mepilsiklin, penimepisiklin, pipasiklin, etamosiklin, penimosiklini içermektedir. Örneğin, ikame edilmiş tetrasiklin bileşikleri, WO 2008/079339 ve WO 2008/079363 Sayılı Patent Dokümanlarında tarif edilmiştir.

Bir ikame edilmiş tetrasiklin bileşiği, U.S. 2008/0312193 ve 2010/0305072 Sayılı Patent Başvuru yayında açılan (4S,4aS,5AR,12aS)-4-dimetilamino-3,10,12,12a-tetrahidroksi-7-[(metoksi (metil)amino)-metil]-1,11-diokso-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-oktahidro-naftasen-2-karboksilik asit amittir. Bu bileşiğin serbest bazı bir aktif farmasötik içeriği olarak kullanılmak için stabil olmadığından Ek olarak, teknikte tecrübe sahibi kişiler, öncesinde bu bileşiğin bir tuzunu sentezleme girişiminde bulunurken, sadece amorf tuzlar üretilmiştir ve bu amorf tuzlar, serbest baz boyunca sadece minimum gelişmiş stabilite sergilemiştir. Dolayısıyla, teknikte, bu ikame edilmiş tetrasiklin bileşiğinin gelişmiş stabilitesine ihtiyaç vardır.

Mevcut buluş, serbest baz boyunca üstün stabilite ve öncesinde bilinen tuzları sergileyen yeni (4S,4aS,5aR,12aS)-4-dimetilamino-3,10,12,12a-tetrahidroksi-7-[(metoksi(metil) amino)-metil]-1,11-diokso-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-oktahidro-naftasen-2-karboksilik asit amidin kristalli *mono* hidroklorür, *mono* mezilat ve *mono* sülfat tuzlarına yönlendirilmektedir. Bu, önceki teknikte önemli bir gelişmedir.

BULUŞUN KISA AÇIKLAMASI

Mevcut buluş, serbest baz boyunca üstün stabilite ve öncesinde bilinen tuzları sergileyen yeni (4S,4aS,5aR,12aS)-4-dimetilamino-3,10,12,12a-tetrahidroksi-7-[(metoksi(metil) amino)-metil]-1,11-diokso-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-oktahidro-naftasen-2-karboksilik asit amidin kristalli *mono* hidroklorür, *mono* mezilat ve *mono* sülfat tuzlarına yönlendirilmektedir. Belirli bir yapılandırımda, kristalli tuz büyük ölçüde saftır. Bir yapılandırma, (4S,4aS,5aR,12aS)-4-

dimetilamino-3,10,12,12a-tetrahidroksi-7-[(metoksi(metil)amino)-metil]-1,11-diokso-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-oktahidro-naftasen-2-karboksilik asit amidin kristalli *mono* hidroklorür tuzuna yönlendirilmektedir. Belirli bir yapılandırılarda, kristalli tuzunun sentezinden sonra Şekil 1’de gösterildiği gibi büyük ölçüde bir X-ışın difraksiyonu (XRPD) paternine sahiptir ve tercih edilen bir yapılandırılarda, en azından yaklaşık 13.4, yaklaşık 20.5 ve yaklaşık 23.3 görünen kırınım açısı 2-teta derecesinde XRPD paterninde karakteristik piklere sahiptir. Diğer yapılandırılarda, kristalli *mono* hidroklorür tuz, sentezden sonra büyük ölçüde Şekil 2’de gösterildiği gibi bir diferansiyel tarama kalorimetrisine (DSC) ve sentezden sonra büyük ölçüde Şekil 3’te gösterildiği gibi bir termo-grafimetric analiz (TGA) eğrisine sahiptir. Bir diğer yapılandırılarda, kristalli *mono* hidroklorür tuz, Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile ölçüldüğü gibi 0. günde yaklaşık yüzde 0.1 pik alanı (buradan “pik alanı %’si” ile yaklaşık %7.0 pik alanı aralığında bir β-izomer içeriğine sahiptir.

Buluşun diğer yapılandırılarda (4S,4aS,5aR,12aS)-4-dimetilamino-3,10,12,12a-tetrahidroksi-7-[(metoksi(metil) amino)-metil]-1,11-diokso-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-oktahidro-naftasen-2-karboksilik asit amidin kristalli *mono* hidroklorür, *mono* mezilat ve *mono* sülfat tuzlarına yönlendirilmektedir. Belirli bir yapılandırılarda, kristalli *mono* mezilat tuzu, kristalli tuzunun sentezinden sonra Şekil 4’te gösterildiği gibi büyük ölçüde XRPD paternine sahiptir ve tercih edilen bir yapılandırılarda, en azından yaklaşık 9, yaklaşık 15 ve yaklaşık 23.8 görünen kırınım açısı 2-teta derecesinde XRPD paterninde karakteristik piklere sahiptir. Diğer yapılandırılarda, kristalli *mono* mezilat tuz, sentezden sonra büyük ölçüde Şekil 5’te gösterildiği gibi bir DSC eğrisine ve sentezden sonra büyük ölçüde Şekil 6’da gösterildiği gibi bir TGA eğrisine sahiptir.

Belirli bir yapılandırılarda, kristalli *mono* mezilat tuzu, kristalli tuzunun sentezinden sonra Şekil 7’de gösterildiği gibi büyük ölçüde XRPD paternine sahiptir ve tercih edilen bir yapılandırılarda, en azından yaklaşık 15, yaklaşık 17.8 ve yaklaşık 23.5 görünen kırınım açısı 2-teta derecesinde XRPD paterninde karakteristik piklere sahiptir. Diğer yapılandırılarda, kristalli *mono* mezilat tuz, sentezden sonra büyük ölçüde Şekil 5’te gösterildiği gibi bir DSC eğrisine ve sentezden sonra büyük ölçüde Şekil 9’da gösterildiği gibi bir TGA eğrisine sahiptir.

Tercih edilen yapılandırılarda, kristalli *mono* tuzu, HPLC ile ölçüldüğü gibi 0. günde yaklaşık %2.0 ile yaklaşık %10.0 pik alan bir β-izomer içeriğine sahiptir ve kristalli *mono* sülfat tuzu, HPLC ile ölçüldüğü gibi 0. günlerde yaklaşık %3.0 pik alanı ile yaklaşık %26.0 pik alanı bir β-izomer içeriğine sahiptir.

Mevcut buluş, (4S,4aS,5aR,12aS)-4-dimetilamino-3,10,12,12a-tetrahidroksi-7-
[(metoksi(metil) amino)-metil]-1,11-diokso-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-oktahidro-naftasen-2-
karboksilik asit amidin kristalli *mono* hidroklorür, kristalli *mono* mezilat ve kristalli *mono* sülfat
5 tuzunu ve farmasötik olarak kabul edilebilir bir ekşiyanıçeren bir farmasötik bileşime
yönlendirilmektedir. Bir yapılandırılma, farmasötik bileşim, aknenin tedavisine yöneliktir. Bir
diğer yapılandırılma, farmasötik bileşim, gül hastalığı tedavisine yöneliktir. Bir diğer
yapılandırılma, farmasötik bileşim, bir gram pozitif bakteriyel enfeksiyonun tedavi
edilmesine yöneliktir, burada gram pozitif bakteriler, *Propionibacterium acnes*,
10 *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumonia*, *Streptococcus pyogenes* ve *Clostridium*
difficile arasından oluşan gruptan seçilmektedir.

Mevcut buluş ayrıca (4S,4aS,5aR,12aS)-4-dimetilamino-3,10,12,12a-tetrahidroksi-7-
[(metoksi(metil) amino)-metil]-1,11-diokso-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-oktahidro-naftasen-2-
15 karboksilik asit amidin kristalli *mono* hidroklorür, kristalli *mono* mezilat ve kristalli *mono* sülfat
tuzunun terapötik olarak etkili bir miktarı, bir süreye uygulanması içeren aknenin
tedavisine yönelik bir yöntemde kullanıma yönelik yukarıda bahsi geçen kristalli tuzlara
yönlendirilmektedir.

Mevcut buluş ayrıca (4S,4aS,5aR,12aS)-4-dimetilamino-3,10,12,12a-tetrahidroksi-7-
[(metoksi(metil) amino)-metil]-1,11-diokso-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-oktahidro-naftasen-2-
20 karboksilik asit amidin kristalli *mono* hidroklorür, kristalli *mono* mezilat ve kristalli *mono* sülfat
tuzunun terapötik olarak etkili bir miktarı, bir süreye uygulanması içeren gül hastalığı
tedavisine yönelik bir yöntemde kullanıma yönelik yukarıda bahsi geçen kristalli tuzlara
25 yönlendirilmektedir.

Mevcut buluş ayrıca bir bakteriyel enfeksiyonun tedavisine yönelik bir yöntemde kullanıma
yönelik yukarıda bahsi geçen kristalli tuzlara yönlendirilmektedir, burada bakteri,
(4S,4aS,5aR,12aS)-4-dimetilamino-3,10,12,12a-tetrahidroksi-7-[(metoksi(metil) amino)-
30 metil]-1,11-diokso-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-oktahidro-naftasen-2-karboksilik asit amidin kristalli
mono hidroklorür, kristalli *mono* mezilat ve kristalli *mono* sülfat tuzunun terapötik olarak etkili
bir miktarı, bir süreye uygulanması içeren, *Propionibacterium acnes*, *Propionibacterium*
granulosum, *Propionibacterium avidum*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*,
Streptococcus pneumonia, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus*
35 *haemolyticus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter*

cloacae, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, ve *Clostridium difficile* arasından oluşan gruptan seçilmektedir.

Mevcut buluş ayrı bir gram pozitif bakteriyel enfeksiyonunun tedavisine yönelik bir yöntemde kullanıma yönelik yukarıda bahsi geçen kristalli tuzlara yönlendirilmektedir, burada bakteri, (4S,4aS,5aR,12aS)-4-dimetilamino-3,10,12,12a-tetrahidroksi-7-[(metoksi(metil)amino)-metil]-1,11-diokso-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-oktahidro-naftasen-2-karboksilik asit amidin kristalli *mono* hidroklorür, kristalli *mono* mezilat ve kristalli *mono* sülfat tuzunun terapötik olarak etkili bir miktarın bir süreye uygulanması içeren, *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes* ve *Clostridium difficile* arasından oluşan gruptan seçilmektedir.

ŞEKİLLERİN KISA AÇIKLAMASI

Şekil 1, 40°C ve %75 bağıl nemde (RH) 7 gün boyunca sentezden ve depolamadan sonra (4S,4aS,5aR,12aS)-4-dimetilamino-3,10,12,12a-tetrahidroksi-7-[(metoksi(metil) amino)-metil]-1,11-diokso-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-oktahidro-naftasen-2-karboksilik asit amidin kristalli *mono* hidroklorür tuzunun X-ışın difraksiyonu (XRPD) analizini göstermektedir.

Şekil 2, sentezden sonra (4S,4aS,5aR,12aS)-4-dimetilamino-3,10,12,12a-tetrahidroksi-7-[(metoksi(metil) amino)-metil]-1,11-diokso-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-oktahidro-naftasen-2-karboksilik asit amidin kristalli *mono* hidroklorür tuzunun bir diferansiyel tarama kalorimetrisi (DSC) eğrisidir.

Şekil 3, sentezden sonra (4S,4aS,5aR,12aS)-4-dimetilamino-3,10,12,12a-tetrahidroksi-7-[(metoksi(metil)amino)-metil]-1,11-diokso-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-oktahidro-naftasen-2-karboksilik asit amidin kristalli *mono* hidroklorür tuzunun bir termo-gravimetrik analiz (TGA) eğrisidir.

Şekil 4, 40°C ve %75 RH'de 7 gün boyunca sentezden ve depolamadan sonra (4S,4aS,5aR,12aS)-4-dimetilamino-3,10,12,12a-tetrahidroksi-7-[(metoksi(metil) amino)-metil]-1,11-diokso-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-oktahidro-naftasen-2-karboksilik asit amidin kristalli *mono* mezilat tuzunun XRPD analizini göstermektedir.

Şekil 5, sentezden sonra (4S,4aS,5aR,12aS)-4-dimetilamino-3,10,12,12a-tetrahidroksi-7-[(metoksi(metil) amino)-metil]-1,11-diokso-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-oktahidro-naftasen-2-karboksilik asit amidin kristalli *mono* mezilat tuzunun bir DSC eğrisidir.

Şekil 6, sentezden sonra (4S,4aS,5aR,12aS)-4-dimetilamino-3,10,12,12a-tetrahidroksi-7-[(metoksi(metil) amino)-metil]-1,11-diokso-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-oktahidro-naftasen-2-

karboksilik asit amidin kristalli *mono* mezilat tuzunun bir TGA'sıdır.

Şekil 7, 40°C ve %75 RH'de 7 gün boyunca sentezden ve depolamadan sonra (4S,4aS,5aR,12aS)-4-dimetilamino-3,10,12,12a-tetrahidroksi-7-[(metoksi(metil) amino)-metil]-1,11-diokso-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-oktahidro-naftasen-2-karboksilik asit amidin kristalli *mono* sülfat tuzunun XRPD analizini göstermektedir.

Şekil 8, sentezden sonra (4S,4aS,5aR,12aS)-4-dimetilamino-3,10,12,12a-tetrahidroksi-7-[(metoksi(metil) amino)-metil]-1,11-diokso-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-oktahidro-naftasen-2-karboksilik asit amidin kristalli *mono* sülfat tuzunun bir DSC eğrisidir.

Şekil 9, sentezden sonra (4S,4aS,5aR,12aS)-4-dimetilamino-3,10,12,12a-tetrahidroksi-7-[(metoksi(metil) amino)-metil]-1,11-diokso-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-oktahidro-naftasen-2-karboksilik asit amidin kristalli *mono* sülfat tuzunun bir TGA'sıdır.

Şekil 10, (4S,4aS,5aR,12aS)-4-dimetilamino-3,10,12,12a-tetrahidroksi-7-[(metoksi(metil) amino)-metil]-1,11-diokso-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-oktahidro-naftasen-2-karboksilik asit amidin amorf *bis* hidroklorür tuzunun XRPD analizini göstermektedir.

Şekil 11, (4S,4aS,5aR,12aS)-4-dimetilamino-3,10,12,12a-tetrahidroksi-7-[(metoksi(metil) amino)-metil]-1,11-diokso-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-oktahidro-naftasen-2-karboksilik asit amidin amorf *bis* hidroklorür tuzu kaplı bir TGA eğrisi ve DSC eğrisidir.

BULUŞUN AYRINTILI AÇIKLAMASI

Kristalli Tuzlar

(4S,4aS,5aR,12aS)-4-dimetilamino-3,10,12,12a-tetrahidroksi-7-[(metoksi(metil) amino)-metil]-1,11-diokso-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-oktahidro-naftasen-2-karboksilik asit amidin yeni kristalli tuzları burada tarif edilmektedir. Daha fazla deneyden ve keşiften sonra, mucitler, bir farmasötik bileşimde bir farmasötik aktif içerik olarak kullanılabilen, mucitler, (4S,4aS,5aR,12aS)-4-dimetilamino-3,10,12,12a-tetrahidroksi-7-[(metoksi(metil) amino)-metil]-1,11-diokso-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-oktahidro-naftasen-2-karboksilik asit amidin stabil ve tercih edilen tuz formları belirlemiştir. Mevcut buluş, (4S,4aS,5aR,12aS)-4-dimetilamino-3,10,12,12a-tetrahidroksi-7-[(metoksi(metil) amino)-metil]-1,11-diokso-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-oktahidro-naftasen-2-karboksilik asit amidin serbest bazı üzerinde bunları yeni kristalli tuzları ve üstün faydaları ve bunları öncesinde bilinen amorf tuzları nasıl yapıldığını öğretmektedir.

Bu şekilde, mevcut buluşun bir yapılandırılması (4S,4aS,5aR,12aS)-4-dimetilamino-

3,10,12,12a-tetrahidroksi-7-[(metoksi(metil)amino)-metil]-1,11-diokso-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-oktahidro-naftasen-2-karboksilik asit amidin bir kristalli tuzudur, burada tuz, *mono* hidroklorür, *mono* mezilat ve *mono* sülfattan oluşan bir gruptan seçilmektedir.

- 5 Tercih edilen bir yapılandırılma, kristalli tuz büyük ölçüde saftır. Büyük ölçüde saf bir kristalli tuz, HPLC ile ölçüldüğü gibi toplam katışkı içeriğinin %10'dan daha az pik alanına ve tercihen yaklaşık %4'ten daha az pik alanı içermektedir. Daha fazla tercih edilen bir yapılandırılma, kristalli tuz, bir amorf tuzdan büyük ölçüde serbesttir. Tercihen, amorf tuzunun yaklaşık %8'inden daha az pik alanı mevcuttur, daha çok tercih edilecek şekilde, amorf tuzunun yaklaşık %5'ten daha az pik alanı mevcuttur ve daha çok tercih edilecek şekilde, amorf tuzunun yaklaşık %3'ten daha az pik alanı mevcuttur.

Burada kullanılan üzere, katışkı içeriğinin pik alanı yüzdesine referansla, "yaklaşık" terimi genel olarak, yüzde 10 içerisinde, örneğin verilen bir değerin veya aralığın yüzde 5'i içerisinde anlamına gelmektedir.

Burada kullanılan üzere "kristalli" terimi, kristallerin özelliği olan atomların, iyonların veya moleküllerin bir periyodik ve tekrar eden üç boyutlu iç düzenlemesine sahip bir katı halde bileşikler ifade etmektedir. Kristalli terimi, bileşiğin kristaller olarak mevcut olduğu, fakat kristal benzeri iç yapısal düzenlemeye sahip olduğu anlamına gelmektedir. Burada kullanılan üzere "amorf" terimi, bir kristalli yapıdan mahrum bileşikler ifade etmektedir; herhangi bir tekrar eden patern düzensizleşmemektedir, sadece kısa bir aralık sınırsız kapsamlı bir şekilde bozulmaktadır.

25 (4S,4aS,5aR,12aS)-4-dimetilamino-3,10,12,12a-tetrahidroksi-7-[(metoksi(metil)amino)-metil]-1,11-diokso-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-oktahidro-naftasen-2-karboksilik asit amidin kristalli tuzları bakteriyel, viral, parazitler ve fungal enfeksiyonlar; kanser (örneğin, prostat, meme, kolon, akciğer melanomu ve lenf kanserleri) ve tetrasiklin bileşiklerinin aktif olduğunun bulunduğu istenmeyen hücresel çoğalma; artrit; osteoporoz; şeker hastalığı felç; Akut miyokard infarktüsü; aort anevrizması nörodejeneratif hastalıklar ve diğer durumlar ile karakterize edilen diğer bozuklukları tedavi etmek, önlemek veya başka bir şekilde hafifletmek için kullanılabilmektedir (bkz. örneğin, U.S. 5,789,395; 5,834,450; 6,277,061; ve 5,532,227 sayılı patent dokümanları her birisi, burada referans ile açıkça dahil edilmektedir). Ek olarak, buluşun tuzları rickettsial enfeksiyonlar, cinsel yolla bulaşan enfeksiyonlar, solunum yolu enfeksiyonları bakteriyel enfeksiyonlar, oftalmik enfeksiyonlar, şarbon gibi

önemli memeli ve veterinerlik hastalıklarında önlemek veya kontrol etmek için kullanılabilmektedir; akut bağırsak amibiyaz, akne ve laym hastalıklarında terapi olarak hizmet edebilmektedir; ve sifon ve benzerinin profilaksisi için kullanılabilmektedir. Tercihen, mevcut buluşun kristalli tuzları kristallayabilen maksiller egzama, dermatit, sedef hastalığı, pyoderma gangrenozum, akne ve gül hastalığına çeren bakteriyel enfeksiyonlar ve inflamatuvar cilt bozukluklarında tedavi etmek için kullanılabilmektedir. Bir yapılandırılma, mevcut buluşun kristalli tuzları akneyi ve/veya gül hastalığını tedavi etmek üzere kullanılabilmektedir. Örneğin, mevcut buluşun kristalli tuzları akneyi tedavi etmek üzere kullanılabilmektedir. Buluşun tuzları ile tedavi edilebilen bakteriyel enfeksiyonların kristallayabilen örnekleri, gram pozitif organizmalar (*Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumonia*, *Streptococcus pyogenes* veya *Clostridium difficile*) ile enfeksiyonları içermektedir.

Belirli bir yapılandırılma, (4S,4aS,5aR,12aS)-4-dimetilamino-3,10,12,12a-tetrahidroksi-7-[(metoksi(metil)amino)-metil]-1,11-diokso-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-oktahidro-naftasen-2-karboksilik asit amidin kristalli *mono* hidroklorür tuzudur.

Burada kullanıldığı üzere, "*mono* hidroklorür tuz" terimi, bir asidin ve bir bazın nötrleştirme reaksiyonundan kaynaklanan bir iyonik bileşiği ifade etmektedir. İyonik bileşik (burada, HCl), bileşiğin doğal olması için bir katyon ve bir anyondan oluşmaktadır.

Kristalli tuzların analizine yönelik genel yöntemler, X-ışın toz kırınımı (XRPD), diferansiyel tarama kalorimetrisi (DSC) ve termo-gravimetrik analiz (TGA) ile kristal analizini içermektedir.

Burada tarif edilen XRPD analizi, Cu K α radyasyonu (40kV, 40mA), otomatikleştirilmiş XYZ aşaması oto-numune konumlandırılmasına yönelik lazer video mikroskobu ve bir HiStar 2-boyutlu alan detektörü kullanılarak bir Bruker AXS C2 GADDS kırınım ölçerinde toplanmış X-ışın optikleri, 0.3 mm bir pim deliği kolimatörü ile birleştirilen tek bir Göbel çok katmanlı aynadan oluşmuştur. Veri koleksiyonu için kullanılan yazılım, WNT 4.1.16 için GADDS'dir ve veri, Diffrac Plus EVA v 9.0.0.2 veya v 13.0.0.2 kullanılarak analiz edilmiş ve sunulmuştur. Numuneler, alıngı gibi toz kullanarak düz plaka numuneleri olarak ortam koşullarında analiz edilmiştir. Yaklaşık olarak 1 ila 2 mg numune, bir düz yüzeyi elde etmek için bir cam lamda hafifçe preslenmiştir. Ortam dışı koşullar altında analiz edilen numuneler, bir iletim bileşiğine sahip bir silikon plakaya monte edilmiştir. Numune daha sonrasında yaklaşık olarak 20°C.dk⁻¹'de uygun sıcaklığa iletildi ve daha sonrasında, veri başlatılmaadan yaklaşık olarak

1 dakika önce izotermal olarak tutulmuştur.

Belirli bir yapılandırılma, (4S,4aS,5aR,12aS)-4-dimetilamino-3,10,12,12a-tetrahidroksi-7-
[(metoksi(metil)amino)-metil]-1,11-diokso-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-oktahidro-naftasen-2-

5 karboksilik asit amidin kristalli *mono* hidroklorür tuzu, kristalli tuzunun sentezinden sonra büyük ölçüde Şekil 1’de gösterildiği gibi bir XRPD paternine sahiptir.

Burada kullanılan “XRPD paterni” terimi, XRPD analizi ile toplanan verinin grafiksel temsilini ifade etmektedir. XRPD analizi, polikristalli veya toz halde katı hallerde kristalografik yapı, boyutu ve tercih edilen yönlendirmesini karakterize edecek şekilde kullanılan bir tekniktir. Bu yöntem ayrıca mevcut kristalli bileşiklerin yüzdesini belirlemek üzere heterojen katı karışımları karakterize etmek için kullanılabilmektedir ve bilinmeyen malzemelere dair yapısal bilgiyi sağlayabilmektedir.

15 Bir XRPD paternine referansla burada kullanıldığı üzere “büyük ölçüde” ve “yaklaşık” terimi, bir listelenen piklerin, bir verilen 2-teta değerinde 0.1 derece 2-teta içerisinde dahil olmak üzere 0.2 derece 2-teta içerisinde görüldüğü XRPD’yi ifade etmektedir.

Tercih edilen bir yapılandırılma, kristalli *mono* hidroklorür tuzu, XRPD ile ölçüldüğü gibi en az yaklaşık 13.4, yaklaşık 20.5 ve yaklaşık 23.3 görünen 2-teta derece kriteri altında karakteristik piklere sahiptir. Daha çok tercih edilen bir yapılandırılma, kristalli *mono* hidroklorür tuzu, XRPD ile ölçüldüğü gibi en az yaklaşık 9.5, yaklaşık 13.4, yaklaşık 15.5, yaklaşık 20.5 ve yaklaşık 23.3 görünen 2-teta derece kriteri altında karakteristik piklere sahiptir ve daha çok tercih edilecek şekilde, kristalli *mono* hidroklorür tuzu, en az yaklaşık 9.5, yaklaşık 13.4, yaklaşık 15.5, yaklaşık 16.6, yaklaşık 19.2, yaklaşık 20.5, yaklaşık 22.2 ve yaklaşık 23.3 görünen 2-teta derece kriteri altında karakteristik piklere sahiptir.

Burada kullanılan “karakteristik pik”, temel gürültüden en az %20, daha çok tercih edilecek şekilde %40 daha büyük bir yoğunluğa sahip XRPD paterninde bir piki ifade etmektedir.

TGA ve DSC analizi, termal davranış ölçmek için kullanılabilmektedir ve polimorfları ayırt etmek için kullanılabilmektedir. Bir polimorfik form, amorf malzemesinin veya bir diğer polimorfik formundan farklı termal davranış sergileyebilmektedir.

35 Burada tarif edilen DSC analizi, bir 50 konum otomatik numunelendirici ile donatılan bir TA

Instruments Q2000'de toplanmış Cihaz, sertifikalandırılmış Alüminyum kullanarak enerji ve sıcaklığ için kalibre edilmiştir. Termal kapasiteye yönelik kalibrasyon, safir kullanılarak uygulanmıştır. Tipik olarak, 0.5 ila 3.0 mg her bir numune, bir pim delikli alüminyum tavada, 25°C ila 250°C arasında 10°C.dk'de iletilemiştir. Bir 50 ml.dk⁻¹'de bir nitrojen süpürme, numune üzerinde sürdürölmüştür. Kullanılan cihaz kontrol yazılımı, Advantage for Q Series v2.8.0.392 ve Thermal Advantage v4.8.3'dür ve veri, Universal Analysis v4.4A kullanılarak analiz edilmiştir.

DSC, bir numunenin ve referansın sıcaklığını arttırmak için gerekli ısı miktarındaki farkı, bir sıcaklığ işlevi olarak ölçöldüğü bir termoanalitik tekniğidir. DSC, kristalizasyon eylemlerinin gözlemlenmesine izin veren bir numunenin bir dizi karakteristik özelliğini ölçmek için kullanılabilmektedir. Spesifik olarak, DSC ile, bir katıdan bir sıvı kristale ve bir sıvı kristalden bir izotropik sıvıya madde geçişleri olarak oluşan küçük enerji değişimlerinin gözlemlenmesi mümkündür. DSC eğrisinde eylem mevcudiyeti, bileşiğin stabilitesini, ayrıca solvatları veya hidratları mevcudiyetini değerlendirmek için kullanılabilmektedir.

TGA, sıcaklığdaki değişime ilişkin ağırlık değişimlerini belirlemek için kullanılmaktadır. Bileşin degradasyonunu ve solvatları veya hidratları mevcudiyetini ortaya çıkatabilmektedir. Burada tarif edilen TGA analizi, bir 16 konum otomatik numunelendirici ile donatılan bir TA Instruments Q500 TGA'da toplanmıştır. Cihaz, sertifikalandırılmış Alüminyum ve Nikel kullanılarak kalibre edilen sıcaklığ olmuştur. Tipik olarak, 5 ila 30 mg her bir numunesi, önceden tartılmış platin potaya ve alüminyum DSC tavasına yüklenmiştir ve ortam sıcaklığında 300°'ye 10°C dk⁻¹'de iletilemiştir. 60 ml.dk⁻¹'de bir nitrojen süpürme işleminde, numune boyunca sürdürölmüştür. Kullanılan cihaz kontrolü ve veri analizi, Advantage for Q Series v2.8.0.392 ve Thermal Advantage v4.8.3 olmuştur ve veri, Universal Analysis v4.4A kullanılarak analiz edilmiştir.

Belirli bir yapılandırılmada, (4S,4aS,5aR,12aS)-4-dimetilamino-3,10,12,12a-tetrahidroksi-7-[(metoksi(metil)amino)-metil]-1,11-diokso-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-oktahidro-naftasen-2-karboksilik asit amidin kristalli *mono* hidroklorür tuzu, büyük ölçüde Şekil 2'de gösterildiği gibi bir DSC eğrisini sergilemektedir. Tercihen, DSC ile analiz edilen kristalli *mono* hidroklorür tuzu, kristalli tuzunun bozulmasına kadar herhangi bir eylem sergilememektedir.

Burada kullanılan "eylemler" terimi, termogramda bir pik olarak kaydedilen diferansiyel ısı akışıdaki bir değişime yol açaan ısı soğurumu (endotermik) veya değişimi (ekzotermik) ile ilişkili bir değişimi ifade etmektedir. Numunedeki bu tarz değişimler, formun, morfolojinin, solvatları veya hidratları dekompozisyonunu, degradasyonunu ve değişimini içermektedir.

Herhangi bir eylemin yokluğu, bileşiğin stabil olduğunu ve bir düşük enerji formunda olduğunu göstermektedir.

5 DSC'ye referans burada kullanılan "büyük ölçüde" terimi, 0.5°C verilen bir sıcaklık içerisinde dahil 1°C içerisinde bir piki sergileyen DSC eğrisi anlamına gelmektedir.

Belirli bir yapılandırılarda, (4S,4aS,5aR,12aS)-4-dimetilamino-3,10,12,12a-tetrahidroksi-7-
10 [(metoksi(metil)amino)-metil]-1,11-diokso-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-oktahidro-naftasen-2-
karboksilik asit amidin kristalli *mono* hidroklorür tuzu, büyük ölçüde Şekil 3'te gösterildiği gibi
bir TGA eğrisi sergilemektedir. Tercihen, TGA ile analiz edilen *mono* hidroklorür tuzu, yaklaşık
30°C ile yaklaşık 200°C arasında yaklaşık %1 ile yaklaşık %5 arasında bir ağırlık kaybı ve
200°C ile yaklaşık 250°C arasında yaklaşık %12 ile yaklaşık %16 bir ağırlık kaybı ve daha çok
tercih edilecek şekilde, yaklaşık 30°C ile yaklaşık 200°C arasında yaklaşık %3 bir ağırlık kaybı
ve yaklaşık 200°C ile yaklaşık 250°C arasında yaklaşık %14 ile yaklaşık %15 arasında bir
15 ağırlık kaybı sergilemektedir.

Burada TGA eğrisine referansla kullanılan "büyük ölçüde" terimi, sıcaklık değişimine ilişkili
olarak %0.5 bir verilen değer içerisinde dahil %1 içerisinde bir ağırlık kaybı yüzdesini
sergileyen eğri anlamına gelmektedir.

20

Belirli yapılandırılarda, (4S,4aS,5aR,12aS)-4-dimetilamino-3,10,12,12a-tetrahidroksi-7-
[(metoksi(metil)amino)-metil]-1,11-diokso-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-oktahidro-naftasen-2-
karboksilik asit amidinin kristalli *mono* hidroklorür tuzu, en az 4 ay boyunca ve daha çok
tercih edilecek şekilde en az 6 ay boyunca stabildir.

25

Burada kullanılan "stabil" ve "stabilite" terimi, tuzun hem fiziksel hem de kimyasal katılaşma
ifade etmektedir. Burada kullanılan "tuz" terimi, mevcut buluşun tarif edilen kristalli *mono*
hidroklorür, *mono* mezilat ve *mono* sülfat tuzları ifade etmektedir.

30

Tuzun fiziksel formunun stabilitesinin bir ölçümü, bir maddenin, çevre ortamdan su
moleküllerini soğurma yeteneği olan higroskopisitedir. Nem degradasyonu arttığında, tuz,
%70 bağıl nemin (RH) üzerinde higroskopik veya hafif higroskopik olması halinde stabildir.
Tercih edilen yapılandırılarda, tuz, higroskopik değildir veya %80 RH'nin üzerinde hafif
higroskopiktir ve daha çok tercih edilen yapılandırılarda, tuz, higroskopik değildir veya
35 %90 RH'ye hafif higroskopiktir. Burada kullanılan üzere "higroskopik değil veya hafif

higroskopik", kristalli formda ağrılı cinsinden %80'in üzerinde mevcut, tercihen kristalli formda ağrılı cinsinden yaklaşık %90'ın üzerinde mevcut yaklaşık 40°C'de ve yaklaşık %75 bir RH'de, ağrılı cinsinden %10'dan daha az suyu ve tercihen 8 saat veya daha az bir sürede ağrılı cinsinden %5'ten daha az suyu soğutan bir bileşiği ifade etmektedir. Higroskopisite (higroskopik derece), ölçümün karşılaştırılabilir noktalarında bir bileşikte ağrılı cinsinden artışa bağlı olarak hesaplanmaktadır Fiziksel stabilitenin bir diğer ölçümü, XPRD ile ölçülebilen tuzun kristal formundadır

Kimyasal katışkıların bir ölçümü, tuzun β -izomer içeriği ile tanımlanmaktadır Birçok tetrasiklinler optik olarak aktiftir ve bir veya birden fazla asimetric merkezi içermektedir. Bu tarz bir merkezin asimetrisinin, ters stereokimya oluşturmak için değiştirildiği süreç, epimerizasyon olarak ifade edilmektedir. Tetrasiklinler, daha az aktif pitetrasikline geri döndürülemez epimerizasyona tabi olmaktadır Epimerizasyonun olduğu oran, pH, sıcaklık, karşıyon ve nemlilik gibi birçok faktöre bağlıdır Doğal olarak oluşan epimer tipik olarak α veya aktif epimer olarak ifade edilmektedir. β olarak bilinen diğer epimer, biyolojik aktiviteye sahip olabilmektedir veya sahip olmayabilmektedir.

(4S,4aS,5aR,12aS)-4-dimetilamino-3,10,12,12a-tetrahidroksi-7-[(metoksi(metil)amino)-metil]-1,11-diokso-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-oktahidro-naftasen-2-karboksilik asit amidinin, C₄'de bir epimerik merkeze sahiptir. (4S,4aS,5aR,12aS)-4-dimetilamino-3,10,12,12a-tetrahidroksi-7-[(metoksi(metil) amino)-metil]-1,11-diokso-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-oktahidro-naftasen-2-karboksilik asit amidinin α ve β epimerleri, ultraviyole detektör (HPLC-UV) analizi ile tersine çevrilmiş faz HPLC (Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi) ile ayrılabilir ve ölçülebilmektedir ve pik alan yüzdesi olarak ifade edilen eğri altında alan yüzdesi olarak ölçülmektedir. (4S,4aS,5aR,12aS)-4-dimetilamino-3,10,12,12a-tetrahidroksi-7-[(metoksi(metil)amino)-metil]-1,11-diokso-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-oktahidro-naftasen-2-karboksilik asit amidinin epimerinin toksik olmadığına inanılmasına rağmen, (4S,4aS,5aR,12aS)-4-dimetilamino-3,10,12,12a-tetrahidroksi-7-[(metoksi(metil)amino)-metil]-1,11-diokso-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-oktahidro-naftasen-2-karboksilik asit amidinin antibakteriyel verimliliğinden yoksun olabilmektedir ve bu şekilde, arzu edilmeyen bir degradasyon ürünü olarak görülebilmektedir.

β -izomer içeriği daha düşük oldukça, tuzun kimyasal katışkıları daha yüksektir. β -izomer içeriği, tuzun sentezinden sonra ölçülmektedir ve bir belirlenen süre zarfı için depolamadan sonra ölçülen β -izomer içeriği ile kıyaslanmaktadır β -izomer içeriğinin depolamadan sonra

5 önemli derecede artmadığı yerde, tuzun kimyasal katışkılarındaki herhangi bir negatif depolama etkisi yoktur ve tuz, bu belirlenen süre zarfı için stabildir. Tetrasiklin ile nem alımı, epimerizasyona katkı sağlayıcı bir faktör olabildiği için, herhangi bir önemli higroskopik olmayan (4S,4aS,5aR,12aS)-4-dimetilamino-3,10,12,12a-tetrahidroksi-7-[(metoksi(metil) amino)-metil]-1,11-diokso-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-oktahidro-naftasen-2-karboksilik asit amidinin bir tuz formu, nemliliğin yol açtığı epimerizasyona bir doğal direnç sağlayabilmektedir.

10 Kimyasal katışkılarındaki bir diğer ölçüsü, diğer ilişkili katışkılarındaki içeriği, yani ürünler veya tuzun degradasyon ürünleri ile belirlenmektedir, bileşiğin morfolojisini temsil etmektedir. HPLC ile, genel olarak HPLC-UV ile ölçüldüğü gibi toplam katışkılarındaki içeriği ne kadar düşükse, tuzun kimyasal katışkılarındaki o kadar yüksektir. Toplam katışkı içeriği, tuzun sentezinden sonra ölçülmektedir ve bir belirlenen süre zarfı için depolamadan sonra ölçülen toplam katışkı içeriği ile kıyaslanmaktadır. Toplam katışkı içeriğinin depolamadan sonra önemli derecede artmadığı

15 yerde, tuzun kimyasal katışkılarındaki herhangi bir negatif depolama etkisi yoktur ve tuz, bu belirlenen süre zarfı için stabildir.

Belirli yapılandırılmalarda, 0. günde, (4S,4aS,5aR,12aS)-4-dimetilamino-3,10,12,12a-tetrahidroksi-7-[(metoksi(metil)amino)-metil]-1,11-diokso-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-oktahidro-naftasen-2-karboksilik asit amidinin kristalli *mono* hidroklorür tuzu, yaklaşık %8'den daha az ve tercihen %4'ten daha az bir toplam katışkı içeriğine sahiptir. Bir diğer yapılandırılma, (4S,4aS,5aR,12aS)-4-dimetilamino-3,10,12,12a-tetrahidroksi-7-[(metoksi(metil)amino)-metil]-1,11-diokso-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-oktahidro-naftasen-2-karboksilik asit amidinin kristalli *mono* hidroklorür tuzu, yaklaşık 40°C yaklaşık 6 ay ve yaklaşık %10'dan daha az ve tercihen, yaklaşık %6'dan daha az %75 RH depolamadan sonra bir toplam katışkı içeriğine sahiptir. Belirli bir yapılandırılma, tuz, yaklaşık 40°C'da ve yaklaşık 0. günde toplam katışkı içeriğinden daha büyük olan %80 pik alanından daha fazla olmayan ve tercihen yaklaşık 0. günde toplam katışkı içeriğinden daha büyük olan yaklaşık %50 pik alanından daha fazla olmayan %75 RH'de yaklaşık 6 ay boyunca depolama sonrasında bir toplam katışkı içeriğine

25

30 sahiptir.

Mevcut buluşun belirli bir yapılandırılmasında (4S,4aS,5aR,12aS)-4-dimetilamino-3,10,12,12a-tetrahidroksi-7-[(metoksi(metil)amino)-metil]-1,11-diokso-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-oktahidro-naftasen-2-karboksilik asit amidinin kristalli *mono* hidroklorür tuzu stabildir ve yaklaşık 40°C'de ve 0. günde β-izomer içeriğinden daha büyük yaklaşık %20 pik alanından daha

35

büyük olmayan %75 RH'de yaklaşık 75 gün boyunca depolamadan sonra bir β -izomer içeriğine sahiptir. Tercih edilen bir yapılandırılma, tuz, yaklaşık 40°C'de ve yaklaşık 0. günde β -izomer içeriğinden daha büyük olan yaklaşık %10 pik alanından daha fazla olmayan yaklaşık %75 RH'de 75 gün depolama sonrasında bir β -izomer içeriğine sahiptir; daha çok tercih edilecek bir yapılandırılma, yaklaşık 40°C'de ve %75 RH'de yaklaşık 75 gün boyunca depolamadan sonraki β -izomer içeriği, yaklaşık 0. günde β -izomer içeriğinden daha büyük yaklaşık %1 pik alanından daha fazla değildir; ve tercih edilen bir diğer yapılandırılma, yaklaşık 40°C'de ve %75 RH'de yaklaşık 75 gün boyunca depolamadan sonraki β -izomer içeriği, yaklaşık 0. günde β -izomer içeriğine eşittir. Burada kullanılan gibi "sentezden sonra" terimi, sentezin onay süresinden yaklaşık bir gün daha az olan, "0. gün" olarak ifade edilen süreyi ifade etmektedir.

Belirli bir yapılandırılma, 0. günde (4S,4aS,5aR,12aS)-4-dimetilamino-3,10,12,12a-tetrahidroksi-7-[(metoksi(metil)amino)-metil]-1,11-diokso-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-oktahidro-naftasen-2-karboksilik asit amidinin kristalli *mono* hidroklorür tuzunun β -izomer içeriği, yaklaşık %0.1 ila yaklaşık %7.0 pik alanı, tercihen yaklaşık %1.0 ila yaklaşık %6.0 pik alanı, daha çok tercih edilecek şekilde yaklaşık %2.0 ila yaklaşık %4.0 pik alanı ve en çok tercih edilecek şekilde yaklaşık %3.0 ila yaklaşık %4.0 pik alanı. Belirli bir yapılandırılma, en azından 3 ay boyunca depolamadan sonra (4S,4aS,5aR,12aS)-4-dimetilamino-3,10,12,12a-tetrahidroksi-7-[(metoksi(metil)amino)-metil]-1,11-diokso-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-oktahidro-naftasen-2-karboksilik asit amidinin kristalli *mono* hidroklorür tuzunun β -izomer içeriği, yaklaşık %2.0 ila yaklaşık %8.0 pik alanı ve daha çok tercih edilecek şekilde yaklaşık %3.0 ila yaklaşık %4.0 pik alanı. Diğer yapılandırmalarda, en az 6 ay boyunca depolamadan sonraki β -izomer içeriği, yaklaşık %0.1 ila yaklaşık %10.0 pik alanı ve daha çok tercih edilecek şekilde yaklaşık %2.0 ila yaklaşık %8.0 pik alanı. Belirli bir yapılandırılma, 0. günde (4S,4aS,5aR,12aS)-4-dimetilamino-3,10,12,12a-tetrahidroksi-7-[(metoksi(metil)amino)-metil]-1,11-diokso-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-oktahidro-naftasen-2-karboksilik asit amidinin kristalli *mono* hidroklorür tuzunun β -izomer içeriği, yaklaşık %6.0'dan daha az pik alanı ve ortam koşullarında yaklaşık 75 gün boyunca depolamadan sonra yaklaşık %6.0'dan daha az pik alanı. Belirli bir yapılandırılma, 0. günde β -izomer içeriği, yaklaşık %4.5'den daha az piktir ve ortam koşullarında yaklaşık 75 gün boyunca depolamadan sonra yaklaşık %4.5'den daha az pik alanı ve bir diğer yapılandırılma, 0. günde β -izomer içeriği, yaklaşık %3.8'den pik alanı ve ortam koşullarında yaklaşık 75 gün boyunca depolamadan sonra, yaklaşık %3.8 pik alanı.

Burada kullanıldığı gibi ortam koşulları yaklaşık 20°C ila yaklaşık 25°C bir sıcaklık ve yaklaşık %40 bir RH'dir.

Mevcut buluşun bir diğer yapılandırması (4S,4aS,5aR,12aS)-4-dimetilamino-3,10,12,12a-tetrahidroksi-7-[(metoksi(metil)amino)-metil]-1,11-diokso-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-oktahidro-naftasen-2-karboksilik asit amidin kristalli *mono* mezilat tuzudur.

Burada kullanıldığı üzere, "*mono* mezilat tuz" terimi, bir asidin ve bir bazın nötrleştirme reaksiyonundan kaynaklanan bir iyonik bileşiği ifade etmektedir. Bileşik, bileşiğin doğal olması için bir katyon ve bir anyondan (burada, CH₃SO₂⁻) oluşmaktadır

Belirli bir yapılandırma, (4S,4aS,5aR,12aS)-4-dimetilamino-3,10,12,12a-tetrahidroksi-7-[(metoksi(metil)amino)-metil]-1,11-diokso-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-oktahidro-naftasen-2-karboksilik asit amidin kristalli *mono* mezilat tuzu, kristalli tuzunun sentezinden sonra büyük ölçüde Şekil 4'te gösterildiği gibi bir XRPD paternine sahiptir.

Tercih edilen bir yapılandırma, kristalli *mono* mezilat tuzu, XRPD ile ölçüldüğü gibi en azından yaklaşık 9, yaklaşık 15 ve yaklaşık 23.8 görünen 2-teta derece kırınım açısında karakteristik piklere sahiptir. Daha çok tercih edilen bir yapılandırma, kristalli *mono* mezilat tuzu, XRPD ile ölçüldüğü gibi en az yaklaşık 9, yaklaşık 15, yaklaşık 22.7 ve yaklaşık 23.8 görünen 2-teta derece kırınım açısında karakteristik piklere sahiptir ve daha çok tercih edilecek şekilde, kristalli *mono* mezilat tuzu, en az yaklaşık 9, yaklaşık 15, yaklaşık 22, yaklaşık 22.7 ve yaklaşık 23.8 görünen 2-teta derece kırınım açısında karakteristik piklere sahiptir.

Belirli bir yapılandırma, (4S,4aS,5aR,12aS)-4-dimetilamino-3,10,12,12a-tetrahidroksi-7-[(metoksi(metil)amino)-metil]-1,11-diokso-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-oktahidro-naftasen-2-karboksilik asit amidin kristalli *mono* mezilat tuzu, büyük ölçüde Şekil 5'te gösterildiği gibi bir DSC eğrisi sergilemektedir. Tercihen, DSC ile analiz edilen kristalli *mono* mezilat tuzu, kristalli tuzunun degradasyonuna kadar herhangi bir eylem sergilememektedir.

Belirli bir yapılandırma, (4S,4aS,5aR,12aS)-4-dimetilamino-3,10,12,12a-tetrahidroksi-7-[(metoksi(metil)amino)-metil]-1,11-diokso-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-oktahidro-naftasen-2-karboksilik asit amidin kristalli *mono* mezilat tuzu, büyük ölçüde Şekil 6'da gösterildiği gibi bir TGA eğrisi sergilemektedir. Tercihen, TGA analiz edilen *mono* mezilat tuzu, yaklaşık 30°C ila

yaklaşık 200°C arasında yaklaşık %1 ila yaklaşık %4 arasında bir ağırlık kaybı ve 200°C ila yaklaşık 250°C arasında yaklaşık %3 ila yaklaşık %10 bir ağırlık kaybı ve daha çok tercih edilecek şekilde, yaklaşık 30°C ila yaklaşık 200°C arasında yaklaşık %2 ila yaklaşık %3 bir ağırlık kaybı ve yaklaşık 200°C ila yaklaşık 250°C arasında yaklaşık %6 ila yaklaşık %7 arasında bir ağırlık kaybı gözlemlenmektedir.

Mevcut buluşun belirli bir yapılandırılmasında (4S,4aS,5aR,12aS)-4-dimetilamino-3,10,12,12a-tetrahidroksi-7-[(metoksi(metil)amino)-metil]-1,11-diokso-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-oktahidro-naftasen-2-karboksilik asit amidinin kristalli *mono* mezilat tuzu stabildir ve yaklaşık 40°C'de ve 0. günde β-izomer içeriğinden daha büyük yaklaşık %20 pik alanından daha fazla olmayan %75 RH'de yaklaşık 75 gün boyunca depolamadan sonra bir β-izomer içeriğine sahiptir. Tercih edilen bir yapılandırılma, tuz, yaklaşık 40°C'de ve yaklaşık 0. günde β-izomer içeriğinden daha büyük olan yaklaşık %10 pik alanından daha fazla olmayan yaklaşık %75 RH'de 75 gün depolama sonrasında bir β-izomer içeriğine sahiptir; daha çok tercih edilecek bir yapılandırılma, yaklaşık 40°C'de ve %75 RH'de yaklaşık 75 gün boyunca depolamadan sonraki β-izomer içeriği, yaklaşık 0. günde β-izomer içeriğinden daha büyük yaklaşık %1 pik alanından daha fazla değildir; ve tercih edilen bir diğer yapılandırılma, yaklaşık 40°C'de ve %75 RH'de yaklaşık 75 gün boyunca depolamadan sonraki β-izomer içeriği, yaklaşık 0. günde β-izomer içeriğine eşittir.

Belirli bir yapılandırılma, 0. günde (4S,4aS,5aR,12aS)-4-dimetilamino-3,10,12,12a-tetrahidroksi-7-[(metoksi(metil)amino)-metil]-1,11-diokso-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-oktahidro-naftasen-2-karboksilik asit amidinin kristalli *mono* mezilat tuzunun β-izomer içeriği, yaklaşık %2.0 ila yaklaşık %10.0 pik alanı, tercihen yaklaşık %2.0 ila yaklaşık %6.0 pik alanı ve daha çok tercih edilecek şekilde yaklaşık %2.0 ila yaklaşık %3.0 pik alanıdır.

Mevcut buluşun bir diğer yapılandırılması (4S,4aS,5aR,12aS)-4-dimetilamino-3,10,12,12a-tetrahidroksi-7-[(metoksi(metil)amino)-metil]-1,11-diokso-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-oktahidro-naftasen-2-karboksilik asit amidin kristalli *mono* sülfat tuzudur.

Burada kullanılan üzere, "*mono* sülfat tuz" terimi, bir asidin ve bir bazın nötrleştirme reaksiyonundan kaynaklanan bir iyonik bileşiği ifade etmektedir. Bileşik, bileşiğin doğal olması için bir katyon ve bir anyondan (burada, SO_4^{2-}) oluşmaktadır.

Belirli bir yapılandırılma, (4S,4aS,5aR,12aS)-4-dimetilamino-3,10,12,12a-tetrahidroksi-7-

[(metoksi(metil)amino)-metil]-1,11-diokso-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-oktahidro-naftasen-2-karboksilik asit amidin kristalli *mono* sülfat tuzu, kristalli tuzunun sentezinden sonra Şekil 7’de gösterildiği gibi büyük ölçüde XRPD paternine sahiptir.

- 5 Tercih edilen bir yapılandırılarda, kristalli *mono* sülfat tuzu, XRPD ile ölçüldüğü gibi en azından yaklaşık 15, yaklaşık 17.8 ve yaklaşık 23.5 görünen 2-teta derece kırınım açısında karakteristik piklere sahiptir. Daha çok tercih edilen bir yapılandırılarda, kristalli *mono* sülfat tuzu, XRPD ile ölçüldüğü gibi en az yaklaşık 15, yaklaşık 17.8, yaklaşık 22.5 ve yaklaşık 23.5 görünen 2-teta derece kırınım açısında karakteristik piklere sahiptir. Daha çok tercih edilecek
- 10 şekilde, XRPD ile ölçüldüğü gibi kristalli *mono* sülfat tuzu, en az yaklaşık 15, yaklaşık 17.8, yaklaşık 19.0, yaklaşık 22.5 ve yaklaşık 23.5 görünen 2-teta derece kırınım açısında karakteristik piklere sahiptir.

- Belirli bir yapılandırılarda, (4S,4aS,5aR,12aS)-4-dimetilamino-3,10,12,12a-tetrahidroksi-7-[(metoksi(metil)amino)-metil]-1,11-diokso-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-oktahidro-naftasen-2-
- 15 karboksilik asit amidin kristalli *mono* sülfat tuzu, büyük ölçüde Şekil 8’de gösterildiği gibi bir DSC eğrisi sergilemektedir. Tercihen, DSC ile analiz edilen kristalli *mono* sülfat tuzu, kristalli tuzunun degradasyonuna kadar herhangi bir eylem sergilememektedir.

- 20 Belirli bir yapılandırılarda, (4S,4aS,5aR,12aS)-4-dimetilamino-3,10,12,12a-tetrahidroksi-7-[(metoksi(metil)amino)-metil]-1,11-diokso-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-oktahidro-naftasen-2-karboksilik asit amidin kristalli *mono* sülfat tuzu, büyük ölçüde Şekil 9’da gösterildiği gibi bir TGA eğrisi sergilemektedir. Tercihen, TGA analiz edilen *mono* sülfat tuzu, yaklaşık 30°C ile yaklaşık 200°C arasında yaklaşık %1 ile yaklaşık %5 arasında bir ağırlık kaybı ve 200°C ile
- 25 yaklaşık 250°C arasında yaklaşık %12 ile yaklaşık %16 bir ağırlık kaybı ve daha çok tercih edilecek şekilde, yaklaşık 30°C ile yaklaşık 200°C arasında yaklaşık %3 ile yaklaşık %4 bir ağırlık kaybı ve yaklaşık 200°C ile yaklaşık 250°C arasında yaklaşık %13 ile yaklaşık %14 arasında bir ağırlık kaybı sergilemektedir.

- 30 Mevcut buluşun belirli bir yapılandırılarda (4S,4aS,5aR,12aS)-4-dimetilamino-3,10,12,12a-tetrahidroksi-7-[(metoksi(metil)amino)-metil]-1,11-diokso-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-oktahidro-naftasen-2-karboksilik asit amidinin kristalli *mono* sülfat tuzu stabildir ve yaklaşık 40°C’de ve yaklaşık 0. günde β-izomer içeriğinden daha büyük yaklaşık %20 pik alanından daha fazla olmayan yaklaşık %75 RH’de yaklaşık 75 gün boyunca depolamadan sonra bir β-izomer
- 35 içeriğine sahiptir. Tercih edilen bir yapılandırılarda, tuz, yaklaşık 40°C’de ve yaklaşık 0. günde

β -izomer içeriğinden daha büyük olan yaklaşık %10 pik alanından daha fazla olmayan yaklaşık %75 RH'de 75 gün depolama sonrasında bir β -izomer içeriğine sahiptir; daha çok tercih edilecek bir yapılandırılmasında, yaklaşık 40°C'de ve %75 RH'de yaklaşık 75 gün boyunca depolamadan sonraki β -izomer içeriği, yaklaşık 0. günde β -izomer içeriğinden daha büyük yaklaşık %1 pik alanından daha fazla değildir; ve tercih edilen bir diğer yapılandırılmasında, yaklaşık 40°C'de ve %75 RH'de yaklaşık 75 gün boyunca depolamadan sonraki β -izomer içeriği, yaklaşık 0. günde β -izomer içeriğine eşittir.

Belirli bir yapılandırılmasında, 0. günde (4S,4aS,5aR,12aS)-4-dimetilamino-3,10,12,12a-tetrahidroksi-7-[(metoksi(metil)amino)-metil]-1,11-diokso-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-oktahidro-naftasen-2-karboksilik asit amidinin kristalli *mono* sülfat tuzunun β -izomer içeriği, yaklaşık %3.0 ila yaklaşık %26.0 pik alanı, tercihen yaklaşık %5.0 ila yaklaşık %20.0 pik alanı ve en çok tercih edilecek şekilde yaklaşık %6.0 ila yaklaşık %10.0 pik alanı.

Farmasötik Bileşimler

Buluşun bir yapılandırılması (4S,4aS,5aR,12aS)-4-dimetilamino-3,10,12,12a-tetrahidroksi-7-[(metoksi(metil)amino)-metil]-1,11-diokso-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-oktahidro-naftasen-2-karboksilik asit amidin bir kristalli tuzunu içeren, tuzun, kristalli *mono* hidroklorür, *mono* mezilat ve *mono* sülfattan oluşan bir gruptan seçildiği bir farmasötik bileşim ve farmasötik olarak kabul edilebilir bir ekspiyana yönlendirilmektedir.

Mevcut buluşun farmasötik bileşimi, söz konusu kristalli tuzunun etkili bir miktarı, farmasötik olarak kabul edilebilir bir ekspiyana içermektedir ve bazı yapılandırılmalarda, bir veya birden fazla ek aktif içeriği içerebilmektedir. Mevcut buluşun farmasötik bileşiminde kristalli tuzun içeriği, diğerler değişkenler arasında uygulama süresine, uygulama yoluna ve hedef hastalığa bağlı olarak değişkenlik göstermektedir. Mevcut buluşun farmasötik bileşimi, oral olarak, topik olarak (örn. transdermal ve benzeri), vajinal olarak, rektal olarak veya parenteral olarak (örn. intravenöz ve benzeri) uygulanabilmektedir. Tercihen, mevcut buluşun farmasötik bileşimi, bakteriyel enfeksiyonlar ve inflamatuvar cilt bozukluklarının tedavisi için kullanılabilmektedir. Örneğin, mevcut buluşun farmasötik bileşimi, aknenin ve/veya gül hastalığının tedavisi için, örneğin gram pozitif bakterilerle aknenin veya enfeksiyonların tedavisi için kullanılabilmektedir, burada gram pozitif bakteri, *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumonia*, *Streptococcus pyogenes* ve *Clostridium difficile* arasından oluşan gruptan seçilmektedir.

Farmasötik bileşimin topik uygulamasının örnekleri, transdermal, bukal veya sublingual uygulamayı içermektedir. Topik uygulamalar için, farmasötik bileşim, bir jel, bir merhem, bir losyon veya bir krem gibi farmasötik olarak inert bir topik taşıyıcıda uygun bir şekilde karıştırılabilmektedir. Bu tarz farmakolojik olarak inert topik taşıyıcılar, su, gliserol, alkol, propilen glikol, yağlı alkoller, trigliseritler, yağ asidi esterleri veya mineral yağlar içermektedir. Diğer olası farmakolojik olarak inert topik taşıyıcılar, sıvı vazelin, izopropilpalmitat, polietilen glikol, %95 etanol, suda %5 polioksietilen monolauriat, suda %5 sodyum lauril sülfat ve benzeridir. Ek olarak, antioksidanlar, nem çekiciler, viskozite stabilizörler ve benzeri gibi malzemeler de eklenebilmektedir.

Oral uygulama için, mevcut buluşun kristalli tuzu, bir kapsül, tablet veya granül olarak uygulanabilmektedir. Tabletler, polivinilpirolidon, sukroz, jelatin ve akasya benzeri granülasyon bağlayıcılarla birlikte nişasta (ve tercihen mısır patates veya tapyoka nişastasından) aljinik asit ve bazı kompleks silikatlar gibi çeşitli parçalayıcılarla birlikte mikrokristalli selüloz, sodyum sitrat, kalsiyum karbonat, dikalsiyum fosfat ve glisin gibi çeşitli ekşiyanlar içerebilmektedir. Belirli bir yapılandırılma, tablet, film kaplı olabilmektedir. Ek olarak, magnezyum stearat, sodyum lauril sülfat ve talk gibi yağlayıcı maddeler genel olarak tabletler için kullanılmaktadır. Diğer katı bileşimler ayrıca jelatin kapsüllerde dolgu maddeleri olarak kullanılabilmektedir; bu bağlantıda tercih edilen malzemeler, laktoz veya süt şekerini, ayrıca yüksek moleküler ağırlıta polietilen glikolleri içermektedir. Sulu süspansiyonlar ve/veya eliksirler, oral uygulama için arzu edildiğinde, kristalli tuz, çeşitli tatlandırıcılar veya tat verici ajanlar, renklendirici madde veya boyalar veya arzu edilmesi halinde su, etanol, propilen glikol, gliserin ve bunların çeşitli benzer kombinasyonları olarak seyrelticilerle birlikte emülsifiye edici ve/veya askıya alıcı maddelerle birleştirilebilmektedir. Buluşun farmasötik bileşimler, kristalli tuzun, uygulama sonrasındaki zaman zarfı boyunca salındığı şekilde formüle edilebilmektedir.

Farmasötik olarak kabul edilebilir bir ekşiyan ve tercihe bağlı olarak bir ek aktif içeriği ile birlikte mevcut buluşun kristalli tuzunun farmasötik bileşimlerinin hazırlanması tekniğinde bilinen herhangi bir geleneksel teknik ile tamamlanabilmektedir.

Bir yapılandırılma, farmasötik bileşimde mevcut kristalli tuz, ağırlık cinsinden tüm bileşime göre yaklaşık %0.01 ila yaklaşık %90'dır. Kristalli tuzunun uygun terapötik olarak etkili bir miktar, tipik olarak günlük vücut ağırlığı cinsinden yaklaşık 0.01 mg/kg ila yaklaşık 1 g/kg;

bir diğ er yapılandırıl mada, g ünlük v ücut ağırlığı cinsinden yaklaşık 1 mg/kg il a yaklaşık 600 g/kg; bir diğ er yapılandırıl mada, g ünlük v ücut ağırlığı cinsinden yaklaşık 1 mg/kg il a yaklaşık 250 g/kg; bir diğ er yapılandırıl mada, g ünlük v ücut ağırlığı cinsinden yaklaşık 10 mg/kg il a yaklaşık 400 g/kg; bir diğ er yapılandırıl mada, g ünlük v ücut ağırlığı cinsinden yaklaşık 10 mg/kg il a yaklaşık 200 g/kg; bir diğ er yapılandırıl mada, g ünlük v ücut ağırlığı cinsinden yaklaşık 10 mg/kg il a yaklaşık 100 g/kg; bir diğ er yapılandırıl mada, g ünlük v ücut ağırlığı cinsinden yaklaşık 10 mg/kg il a yaklaşık 25 g/kg; bir diğ er yapılandırıl mada, g ünlük v ücut ağırlığı cinsinden yaklaşık 1 mg/kg il a yaklaşık 10 g/kg; bir diğ er yapılandırıl mada, g ünlük v ücut ağırlığı cinsinden yaklaşık 0.001 mg/kg il a yaklaşık 100 g/kg; bir diğ er yapılandırıl mada, g ünlük v ücut ağırlığı cinsinden yaklaşık 0.001 mg/kg il a yaklaşık 10 g/kg; bir diğ er yapılandırıl mada, g ünlük v ücut ağırlığı cinsinden yaklaşık 0.001 mg/kg il a yaklaşık 1 g/kg aralığı nda olacaktı r. Belirli bir yapılandırıl mada, burada aç ılanan bir farmasötik bileşim oral olarak uygulandı ğı nda, kristalli tuzunun uygun terapötik olarak etkili bir miktarı g ünlük al ınan v ücut ağırlığı cinsinden kilogram baş ına yaklaşık 0.01 il a yaklaşık 100 miligramdı r tercihen g ünlük al ınan v ücut ağırlığı cinsinden kilogram baş ına yaklaşık 0.1 il a yaklaşık 50 miligramdı r daha çok tercih edilecek ř ekilde g ünlük al ınan v ücut ağırlığı cinsinden kilogram baş ına yaklaşık 0.1 il a yaklaşık 20 miligramdı r ve hatta daha çok tercih edilecek ř ekilde, g ünlük al ınan v ücut ağırlığı cinsinden kilogram baş ına yaklaşık 0.1 il a yaklaşık 10 miligramdı r Arzu edilen doz g ünde bir kez veya g ün boyunca uygun aralıklarda veya diğ er uygun programda örneğ in 2 il a 5 bölünm üç doz gibi çeşitli bölünm üç dozlar halinde uygulanabilmektedir.

Burada kullanıldı ğı gibi "farmasötik olarak kabul edilebilir ekspiyan", k ullanılmayacak ř ekilde aşağ ınakiler aras ından bir veya birden fazlas ını içermektedir: polimerler, reğ ineler, plastikleştiriciler, dolgu maddeleri, kayganlaştı rıcı lar, seyrelticiler, bağ layıcı lar, parç alayıcı lar, ç özücüler, yard ı mcı ç özücüler, sü rfaktanlar, tampon sistemleri, koruyucular, tatlandırıcı maddeler, k ıvam arttı rıcı maddeler, farmasötik dereceli boyalar veya pigmentler, ř elatlayıcı maddeler, viskozite maddeleri ve bunlar ın kombinasyonları Farmasötik olarak kabul edilebilir ekspiyanlar, dozaj formun, bir başka ifadeyle çek irdek tablet veya kaplaman ın oluşturulmas ında herhangi bir bileşende kullan ılabilmektedir. Burada kullanı lı olanlar aras ından k ıvam arttı rıcı maddeler ve boyalar ve pigmentler, k ullanılmayacak ř ekilde Handbook of Pharmaceutical Excipients (4. Bas., Pharmaceutical Press 2003) referans ında aç ılananlar ın içermektedir. Uygun ko-solventler, k ullanılmayacak ř ekilde etanol, izopropanol, aseton ve bunlar ın kombinasyonları ın içermektedir. Uygun sü rfaktantlar, k ullanılmayacak ř ekilde polioksietilen sorbitan yağ asidi esterleri, polioksietilen monoalkil

eterleri, sükroz monoesterleri, simetikon emülsiyonu, sodyum lauril sülfat, Tween 80® ve lanolin esterleri, eterler ve bunların kombinasyonları içermektedir. Uygun koruyucular, kolay olmayacak şekilde fenol, parahidroksibenzoik asidin alkil esterleri, benzoik asit ve bunların tuzları, borik asit ve bunların tuzları, sorbik asit ve bunun tuzları, klorbütanol, benzil alkol, timerosal, fenilmerkürük asetat ve nitrat, nitromersol, benzalkonyum klorür, setilpiridinyum klorür, metil paraben, propil paraben ve bunların kombinasyonları içermektedir. Uygun dolgu maddeleri, kolay olmayacak şekilde nişasta, laktoz, sukroz, maltodekstrin ve mikrokristalli selülozu içermektedir. Uygun plastikleştiriciler, kolay olmayacak şekilde trietil sitrat, polietilen glikol, propilen glikol, dibütil ftalat, hint yağı, asetillenmiş monogliseritler, triasetin ve bunların kombinasyonları içermektedir. Uygun polimerler, kolay olmayacak şekilde etilselüloz, selüloz asetat trimellitit, hidroksipropilmetilselüloz ftalat, selüloz asetat ftalat, polivinil asetat ftalat ve Eudragit® L 30-D, Eudragit® L 100-55, Eudragit® F530D ve Eudragit® S 100 (Rohm Pharma GmbH ve Co. KG, Darmstadt, Almanya), Acryl-EZE® ve Sureteric® (Colorcon, Inc., West Point, Pa.) ve bunların kombinasyonları içermektedir. Uygun yağlayıcılar, kolay olmayacak şekilde magnezyum stearat, stearik asit, talk ve bunların kombinasyonları içermektedir.

Burada kullanılan gibi "ek aktif içerik" terimi, farmasötik bileşim tarafından tedavi edilen koşulun semptomlarını tedavi ettiği, önlediği veya azalttığı teknikte bilinen herhangi bir maddeyi içermektedir. Bu tarz maddeler, kolay olmayacak şekilde bakteriyel enfeksiyonların ve inflamatuvar cilt bozukluklarının semptomlarını tedavi ettiği, önlediği veya azalttığı bilinen maddeleri içermektedir.

Mevcut buluşun kristalli tuzlarının gelişmiş stabilitesi, kristallerin daha az higroskopik olduğu, bir başka ifadeyle neme daha az duyarlı olduğu anlamına gelmektedir, böylelikle kristalli tuzu içeren bir farmasötik bileşim, öncesinde bilinen farmasötik bileşimlerden daha uzun bir zaman zarfı boyunca depolanabilmektedir.

Belirli bir yapılandırılma farmasötik bileşim, (4S,4aS,5aR,12aS)-4-dimetilamino-3,10,12,12a-tetrahidroksi-7-[(metoksi(metil)amino)-metil]-1,11-diokso-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-oktahidro-naftasen-2-karboksilik asit amidin bir kristalli tuzunu içeren, tuzun, *mono* hidroklorür tuzunu ve farmasötik olarak kabul edilebilir bir ekisiyan içermektedir. Bir diğer yapılandırılma, farmasötik bileşim, (4S,4aS,5aR,12aS)-4-dimetilamino-3,10,12,12a-tetrahidroksi-7-[(metoksi(metil)amino)-metil]-1,11-diokso-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-oktahidro-naftasen-2-karboksilik asit amidin bir kristalli tuzunu içeren, tuzun, *mono* mezilat tuzunu ve farmasötik

olarak kabul edilebilir bir ekşiyanııçermektedir. Bir diğey yapııandınada, farmasötik bileşim, (4S,4aS,5aR,12aS)-4-dimetilamino-3,10,12,12a-tetrahidroksi-7-[(metoksi(metil) amino)-metil]-1,11-diokso-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-oktahidro-naftasen-2-karboksilik asit amidin bir kristalli tuzunu içeren, tuzun, *mono* sülfat tuzunu ve farmasötik olarak kabul edilebilir bir ekşiyanııçermektedir.

Belirli bir yapııandınada, mevcut buluş, örneğın *Streptococcus pyogenes* ve *Clostridium difficile* bakteriyel enfeksiyonu gibi bir bakteriyel enfeksiyonun tedavisinde kullanıı için (4S,4aS,5aR,12aS)-4-dimetilamino-3,10,12,12a-tetrahidroksi-7-[(metoksi(metil) amino)-metil]-1,11-diokso-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-oktahidro-naftasen-2-karboksilik asit amidi veya bunları farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzunu içeren bir farmasötik bileşime ve farmasötik olarak kabul edilebilir bir ekşiyanıı yönlendirilmektedir. Mevcut buluşun tercih edilen bir yapııandınada, farmasötik bileşim, *mono* hidroklorür, *mono* mezilat ve *mono* sülfat tuzdan oluşan gruptan seçilen (4S,4aS,5aR,12aS)-4-dimetilamino-3,10,12,12a-tetrahidroksi-7-[(metoksi(metil) amino)-metil]-1,11-diokso-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-oktahidro-naftasen-2-karboksilik asit amidin bir kristalli tuzunu içermektedir, burada tuz, *mono* hidroklorür, *mono* mezilat ve *mono* sülfattan oluşan bir gruptan seçilmektedir.

Burada kullanıııı gibi bir bileşığın "farmasötik olarak kabul edilebilir tuzu" ifadesi, farmasötik olarak kabul edilebilir olan ve mevcut bileşığın arzu edilen farmakolojik aktivitesine sahip bir tuz anlamına gelmektedir. Farmasötik olarak kabul edilebilir tuzlar, buluşun bir bileşiginde mevcut asidik veya bazık grupları tuzlarııçermektedir. Farmasötik olarak kabul edilebilir asit eklentisi tuzlarıkılmayııılmayacak şekilde hidroklorür, hidrobromid, hidroiyot, nitrat, mezilat, sülfat, bisülfat, fosfat, asit fosfat, izonikotinat, asetat, laktat, salisilat, sitrat, tartrat, pantotenat, bitartrat, askorbat, suksinat, maleat, gentisinat, fumarat, glukonat, glukoronat, sakarat, format, benzoat, glutamat, metansülfonat, etansülfonat, benzensülfonat, p-tolüensülfonat ve pamoat (yani, 1,1'-metilen-bis- (2-hidroksi-3-naftoat)) tuzlarııçermektedir. Uygun bazık tuzlar, kılmayııılmayacak şekilde alüminyum, kalsiyum, lityum, magnezyum, potasyum, sodyum, çınko ve dietanolamin tuzlarııçermektedir. Tercihen, farmasötik olarak kabul edilebilir tuz, bir kristalli tuzdur. Hatta daha çok tercih edilecek şekilde, farmasötik olarak kabul edilebilir tuz, *mono* hidroklorür, *mono* mezilat ve *mono* sülfat arasından seçilen bir kristalli tuzdur.

Kullanıı Yöntemleri

Buluşun bir yapılandırılması bir süjeye, (4S,4aS,5aR,12aS)-4-dimetilamino-3,10,12,12a-tetrahidroksi-7-[(metoksi(metil)amino)-metil]-1,11-diokso-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-oktahidro-naftasen-2-karboksilik asit amidinin bir kristalli tuzunu terapötik olarak etkili bir miktarda uygulanması içeren akne ve gül hastalığının tedavisine yönelik bir yöntemde kullanıma yönelik buluşun kristalli tuzları ve farmasötik bileşimlerine yönlendirilmektedir, burada kristalli tuz, *mono* hidroklorür, *mono* mezilat ve *mono* sülfattan oluşan bir gruptan seçilmektedir. Bir yapılandırılma, buluş, aknenin tedavi edilmesine yönelik bir yöntemde kullanıma yönelik buluşun kristalli tuzları ve farmasötik bileşimlerine yönlendirilmektedir. Bir diğer yapılandırılma, buluş, gül hastalığının tedavisine yönelik bir yöntemde

Burada kullanıldığı gibi "tedavi etme" terimi, burada açıklanan aknenin ve/veya gül hastalığının veya diğer koşulların terapötik ve/veya profilaktik tedavisini içermektedir. Tedavi, burada açıklanan akne ve/veya gül hastalığı ile ilişkili en az bir semptomun veya bir diğer koşulla ilişkili en az bir semptomun ortadan kaldırılması veya hafifletilmesini içermektedir.

Burada kullanıldığı üzere "terapötik olarak etkili miktar" terimi, sağlam tıbbi yargının kapsamı içerisinde, tedavi edilecek semptomlar ve/veya koşulu pozitif olarak modifiye edecek kadar yüksek olan, fakat ciddi yan etkileri (makul bir risk/fayda oranında) önleyecek kadar düşük olan bir bileşik veya bileşim miktarı anlamına gelmektedir. Burada buluşun yönteminde kullanıma yönelik aktif içeriğin terapötik olarak etkili miktarı tedavi edilen özel koşula, tedavi edilecek hastanın yaş ve fiziksel koşulu, koşulun şiddeti, tedavinin süreci, eşzamanlı terapinin yapısı, kullanılan özel aktif içerik, kullanılan özel farmasötik olarak kabul edilebilir ekspanyanlar ve teknikte tecrübe sahibi hekimin veya veterinerin bilgisi ve uzmanlığı içerisinde kalan benzer faktörlere göre değişkenlik gösterecektir. Çeşitli uygun terapötik olarak etkili miktarlar, yukarıda açıklanmaktadır.

Burada kullanıldığı gibi "süje" terimi, bir hayvandır "Süje", kısıtlı olarak bir insan, fare, sıçan, kobay, köpek, kedi, at, inek, domuz, maymun, şempanze, maymun veya al yanaklı maymunu içermektedir. Bir yapılandırılmalarda, "süje", bir memelidir. Bir diğer yapılandırılma, "süje", bir insandır.

Belirli bir yapılandırılma, (4S,4aS,5aR,12aS)-4-dimetilamino-3,10,12,12a-tetrahidroksi-7-[(metoksi(metil)amino)-metil]-1,11-diokso-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-oktahidro-naftasen-2-

karboksilik asit amidin kristalli *mono* hidroklorür tuzunun terapötik olarak etkili bir miktarında, bir süjeye uygulanması içeren aknenin tedavisine yönelik bir yöntemde kullanma yönelik buluşun kristalli tuzları ve farmasötik bileşimlerine yönlendirilmektedir. Bunların bir yapılandırılmasında, kullanılan *mono* hidroklorür miktarı yaklaşık 10 mg ve yaklaşık 2000 mg arasında ve tercihen yaklaşık 25 mg ve yaklaşık 500 mg arasında. Belirli bir yapılandırılma, *mono* hidroklorür tuz, en azından ayda bir defa, tercihen haftalık olarak, daha çok tercih edilecek şekilde haftada iki defa uygulanmaktadır ve daha çok tercih edilecek şekilde, *mono* hidroklorür tuz günlük olarak uygulanmaktadır.

10 Bir diğer yapılandırılma, (4S,4aS,5aR,12aS)-4-dimetilamino-3,10,12,12a-tetrahidroksi-7-[(metoksi(metil)amino)-metil]-1,11-diokso-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-oktahidro-naftasen-2-karboksilik asit amidin kristalli *mono* mezilat tuzunun terapötik olarak etkili bir miktarında, bir süjeye uygulanması içeren aknenin tedavisine yönelik bir yöntemde kullanma yönelik buluşun kristalli tuzları ve farmasötik bileşimlerine yönlendirilmektedir. Bunların belirli bir yapılandırılmasında, kullanılan *mono* mezilat miktarı yaklaşık 10 mg ve yaklaşık 2000 mg arasında ve tercihen yaklaşık 25 mg ve yaklaşık 500 mg arasında. Belirli bir yapılandırılma, *mono* mezilat tuz, en azından ayda bir defa, tercihen haftalık olarak, daha çok tercih edilecek şekilde haftada iki defa uygulanmaktadır ve en çok tercih edilecek şekilde, *mono* mezilat tuz günlük olarak uygulanmaktadır.

20

Belirli bir yapılandırılma, (4S,4aS,5aR,12aS)-4-dimetilamino-3,10,12,12a-tetrahidroksi-7-[(metoksi(metil)amino)-metil]-1,11-diokso-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-oktahidro-naftasen-2-karboksilik asit amidin kristalli *mono* sülfat tuzunun terapötik olarak etkili bir miktarında, bir süjeye uygulanması içeren aknenin tedavisine yönelik bir yöntemde kullanma yönelik buluşun kristalli tuzları ve farmasötik bileşimlerine yönlendirilmektedir. Belirli yapılandırılmalarda, kullanılan *mono* sülfat miktarı yaklaşık 10 mg ve yaklaşık 2000 mg arasında ve tercihen yaklaşık 25 mg ve yaklaşık 500 mg arasında. Belirli bir yapılandırılma, *mono* sülfat tuz, en azından ayda bir defa, tercihen haftalık olarak, daha çok tercih edilecek şekilde haftada iki defa uygulanmaktadır ve en çok tercih edilecek şekilde, *mono* sülfat tuz günlük olarak uygulanmaktadır.

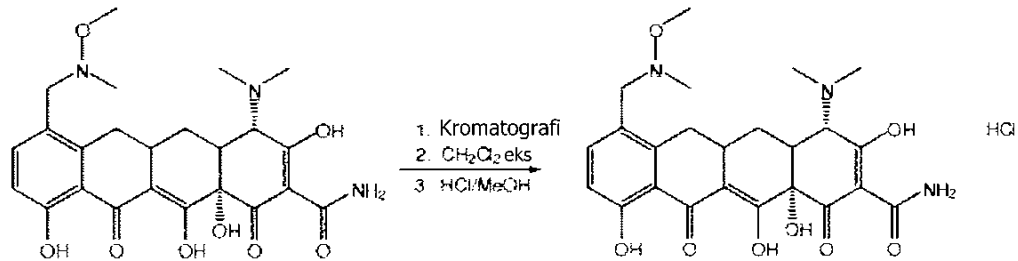
30

Buluşun bir diğer yapılandırılması, (4S,4aS,5aR,12aS)-4-dimetilamino-3,10,12,12a-tetrahidroksi-7-[(metoksi(metil)amino)-metil]-1,11-diokso-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-oktahidro-naftasen-2-karboksilik asit amidin kristalli tuzunun terapötik olarak etkili bir miktarında, bir süjeye uygulanması içeren bir gram pozitif bakteriyel enfeksiyonun tedavisine yönelik bir

35

N,N-dimetilasetamitte (15 mL) 7-formilsanisiklin TFA tuzu (2.23 g) ve N,O-dimetilhidroksilamin hidroklorürün (780 mg) bir çözeltisi, argon atmosferi altında oda sıcaklığında 10 dakika boyunca karıştırılmıştır. Bu çözeltiye, sodyum siyanoborohidrit (302 mg) eklenmiştir. Çözelti, 5 dakika boyunca karıştırılmış ve LC-MS ile takip edilmiştir. Reaksiyon karışımı dietil etere dökülmüştür ve elde edilen çökeltiler, vakum altında filtrasyon ile toplanmıştır. Ham ürün, bir C18 kolonunu kullanarak prep-HPLC ile saflaştırılmıştır (20 mM sulu trietanolamin, pH 7.4'te lineer gradyan %10 ila 40 asetronitril). Prep-HEPLC fraksiyonları toplanmış ve organik solvent (asetronitril), azaltılmış basıncı altında buharlaştırılmıştır. Elde edilen sulu çözelti, bir temiz PDVB SPE kolonuna yüklenmiş, distile su, bir 0.1 M sodyum asetat çözeltisi ve ardından distile su ile yıkanmıştır. Ürün, asetronitril ile ayrılmıştır. Eluent, azaltılmış basıncı altında konsantre edilmiştir, 385 mg, serbest baz olarak elde edilmiştir.

(4S,4aS,5aR,12aS)-4-dimetilamino-3,10,12,12a-tetrahidroksi-7-[(metoksi(metil)amino)-metil]-1,11-diokso-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-oktahidro-naftasen-2-karboksilik asit amidin kristalli *mono* hidroklorür tuzunun sentezi ("Kristalli *Mono* Hidroklorür Tuzu").



Ham (4S,4aS,5aR,12aS)-4-dimetilamino-3,10,12,12a-tetrahidroksi-7-[(metoksi(metil)amino)-metil]-1,11-diokso-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-oktahidro-naftasen-2-karboksilik asit amidi (100 g, yaklaşık %35 deney), preparatif kolon kromatografisinde saflaştırılmıştır. Arzu edilen fraksiyonlar (8 ila 10 litre) birleştirilmiştir ve pH, amonyum hidroksit kullanılarak 7.0 ila 7.5'e ayarlanmıştır. Bu sulu çözelti, diklorometan ile 3 defa ekstrakte edilmiştir (her defasında 4 litre). Diklorometan katmanları birleştirilmiş ve azaltılmış basıncı altında konsantre edilmiştir. Kalıntı etanolde (800 ml) askıya alınmıştır ve 20 ml su eklenmiştir. pH, metanolde 1.25M hidroklorik asit kullanarak kademeli olarak pH 1.6 ila 1.3'e ayarlanmıştır ve karıştırılarak, serbest baz tamamen çözöldüğü noktada 20 ila 60 dakika boyunca karıştırılmıştır. Çözelti, 200 ila 250 ml miktara azaltılmış basıncı altında konsantre edilmiştir ve (4S,4aS,5aR,12aS)-4-

dimetilamino-3,10,12,12a-tetrahidroksi-7-[(metoksi(metil)amino)-metil]-1,11-diokso-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-oktahidro-naftasen-2-karboksilik asit amit mono HCl kristalleri (100 ila 200 mg) ile tohumlanmıştır. Karıştırma işlemi 2 ila 18 saat boyunca devam ettirilirken, bulamaç $\leq 5^{\circ}\text{C}$ 'de tutulmuştur. Elde edilen kristaller filtrelenmiş, etanol (50 mL) ile yıkanmış ve bir sabit ağırlığa azaltılmış basınç altında kurutulmuştur. 20g kristalli (4S,4aS,5aR,12aS)-4-dimetilamino-3,10,12,12a-tetrahidroksi-7-[(metoksi(metil)amino)-metil]-1,11-diokso-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-oktahidro-naftasen-2-karboksilik asit amit mono hidroklorür, $\geq \%90$ saflıkta ve $\geq \%90$ deneyde izole edilmiştir.

10 **(4S,4aS,5aR,12aS)-4-dimetilamino-3,10,12,12a-tetrahidroksi-7-[(metoksi(metil)amino)-metil]-1,11-diokso-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-oktahidro-naftasen-2-karboksilik asit amidin kristalli *mono* mezilat tuzunun sentezi ("Kristalli Mezilat Tuzu").**

15 (4S,4aS,5aR,12aS)-4-dimetilamino-3,10,12,12a-tetrahidroksi-7-[(metoksi(metil)amino)-metil]-1,11-diokso-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-oktahidro-naftasen-2-karboksilik asit amit serbest baz (74 mg), etanolde (740 μL) askıya alınmıştır ve 60°C 'ye (banyo sıcaklığı) karıştırılarak iletmiştir. Metan sülfonik asit (11 eşdeğer, THF'de 1M çözeltisi olarak 167 μL) eklenmiştir ve çoğu katı çözülmüştür. Beş dakikadan sonra, süspansiyon, yaklaşık olarak 1.75 saat (yağ banyosunda kontrol edilmemiştir) boyunca ortam sıcaklığında soğutulmuştur. 53°C ile, azaltılmış basınç altında ortam sıcaklığında filtrelenmiş katı çökelmiştir. Etanolün (200 μL) bir diğer bölümü, süspansiyon akışkan olurken, filtrasyona yardımcı etmek için eklenmiştir. Kek, n-hekzan (400 μL) ile yıkanmış ve 58 mg (%67 verimlilik) sarı katı sunmak için yaklaşık olarak 30 dakika boyunca filtrede hava ile kurutulmuştur.

25

(4S,4aS,5aR,12aS)-4-dimetilamino-3,10,12,12a-tetrahidroksi-7-[(metoksi(metil)amino)-metil]-1,11-diokso-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-oktahidro-naftasen-2-karboksilik asit amidin kristalli *mono* sülfat tuzunun sentezi ("Kristalli Sülfat Tuzu").

30 (4S,4aS,5aR,12aS)-4-dimetilamino-3,10,12,12a-tetrahidroksi-7-[(metoksi(metil)amino)-metil]-1,11-diokso-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-oktahidro-naftasen-2-karboksilik asit amit serbest baz (86 mg), etanolde (500 μL) askıya alınmıştır ve çoğu serbest bazın çözüldüğü sıcaklıkta 63°C 'ye (banyo sıcaklığı) karıştırılarak iletmiştir. Sülfürik asit (suda 1M çözelti olarak 1.1 eşdeğer, 194 μL) eklenmiştir ve tüm katı çözülmüştür. Çözelti, herhangi bir katı çökelmediği sıcaklıkta yaklaşık olarak 1.75 saat (yağ banyosunda kontrol edilmemiştir) boyunca ortam

35

sıcaklığına soğutulmuştur. Metil t-bütil eter (MtBE), bir antisolvent (4 x 50µL) olarak eklenmiştir. Her bir eklenti, bir bulut noktasına yol açmıştır fakat katılaşmada yeniden çözülmüştür. Çözelti, katılaşma çökeldiği süreden sonra yaklaşık olarak 3 saat boyunca bir stoper ile karıştırılmıştır. Katılaşma azaltılmış basınç altında filtrelenmiştir ve MtBE (3 x 200µL) ile yıkanmıştır ve 93 mg (%90 verimlilik) sarı katılaşma sunmak için yaklaşık olarak 45 dakika boyunca filtrede hava ile kurutulmuştur.

KARŞILAŞTIRMALI ÖRNEK 1

10 **(4S,4aS,5aR,12aS)-4-dimetilamino-3,10,12,12a-tetrahidroksi-7-[(metoksi(metil) amino)-metil]-1,11-diokso-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-oktahidro-naftasen-2-karboksilik asit amidin amorf *bis* hidroklorür tuzunun sentezi.**

(4S,4aS,5aR,12aS)-4-dimetilamino-3,10,12,12a-tetrahidroksi-7-[(metoksi(metil)amino)-metil]-1,11-diokso-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-oktahidro-naftasen-2-karboksilik asit amit serbest bazı (1 g), metanolde (50mL) askıya alınmıştır. Serbest baz, fazla metanolik HCl eklenerek, ardından 1.1 g sarı katılaşma elde etmek için azaltılmış basınçlı buharlaşma altında hidroklorür tuza dönüştürülmüştür: MS (M_z+1 = 488). ¹H NMR (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). Bir XRPD paterni, Şekil 10'da gösterilmektedir ve kapsanan bir TGA ve DSC eğrisi, Şekil 11'de gösterilmektedir.

KARŞILAŞTIRMALI ÖRNEK 2

25

(4S,4aS,5aR,12aS)-4-dimetilamino-3,10,12,12a-tetrahidroksi-7-[(metoksi(metil) amino)-metil]-1,11-diokso-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-oktahidro-naftasen-2-karboksilik asit amidin amorf *mono* hidroklorür tuzunun sentezi.

30 Kristalli *Mono* Hidroklorür Tuzunun (2.09 g) bir numunesi, suda (250 ml, 120 hac) çözülmüş, filtrelenmiş ve -78°C bir banyoda dondurulmuştur. Su, XRPD analizi ile amorf olduğu onaylanmış olan, bir yumuşak sarı katılaşma olarak amorf *mono* hidroklorür tuzu sunmak için 110 saat boyunca bir liyofilizer kullanılarak katılaşma numuneden çıkarılmıştır.

35 TEST ETME

Kristalli *Mono* Hidroklorür Tuzun stabilitesini belirlemek için, tuzun β -izomer içeriği, HPLC-UV analizi ile belirlenmiştir ve ortam koşullarında yaklaşık olarak 75 gün boyunca bir amber cam ilaç şişesinde tuz depolandıktan sonra hesaplanmıştır. β -izomer içerikle karşılaştırılmıştır. Sonuçlar, aşağıda bulunan Tablo 1’de gösterilmektedir. Toplanan veri ile kanıtlandığı üzere, β -izomer içeriği, zamanla artmamıştır ve bu şekilde, depolama, Kristalli *Mono* Hidroklorür Tuzun kimyasal saflığını negatif olarak etkilememiştir.

Tablo 1: Depolamadan Sonra Kristalli *Mono* Hidroklorür Tuzda β -izomerin Oluşumu

Numune	0. günde Kimyasal Saflık	75. günde Kimyasal Saflık
Kristalli <i>Mono</i> Hidroklorür Tuz	%93.8 (%3.8 β -izomer)	%94.8 (%3.8 β -izomer)

10 Kristalli *Mono* Hidroklorür Tuzun diğer numuneleri, HPLC-UV ile analiz edilmiştir ve sentetik sürece ufak varyasyonlardan dolayı 0. günde saflık %93.8 (%3.5 β -izomer) ve %95.8 (%3.4 β -izomer) olduğu bulunmuştur. Depolamadan sonra bu numunelere yönelik kimyasal saflık test edilmemiştir.

15 Stabilitenin diğer kanıtı 0. günde HPLC-UV ile Kristalli *Mono* Hidroklorür tuzunun toplam içeriğinin ve depolamadan sonra, yaklaşık 40°C’de ve yaklaşık %75 RH’de 6 ay boyunca analizi ile sergilenmiştir ve sırasıyla %4 pik alan ve %6 pik alan olduğu bulunmuştur.

Yaklaşık 40°C ve yaklaşık %75 RH’de depolamadan hemen 48 saat sonra Karşılaştırılmal Örnek 1’in stabilitesinde yürütülen testlerde, β -izomer içeriği, 0. günde %3.6 pik alanından %31.7 pik alanına artmıştır. Yaklaşık 25°C ve yaklaşık %60 RH’de 36 gün boyunca depolamadan sonra, β -izomer içeriği, %8.7 pik alan olarak hesaplanmıştır. Bir diğer testte, Karşılaştırılmal Örnek 1’in bileşiği, 0. günde %4.2 pik alan ve yaklaşık 40°C’de ve yaklaşık %75 RH’de yaklaşık 2 gün boyunca depolamadan sonra %34.6 pik alan bir toplam katkı içeriğine sahip olmuştur. Dolayısıyla, Karşılaştırılmal Örnek 1, toplam katkı içeriğinde çok daha yüksek bir artış sergilemiştir ve Kristalli *Mono* Hidroklorür Tuzdan önemli ölçüde daha az stabil olmuştur.

Karşılaştırılmal Örnek 2’nin β -izomer içeriği de 0. günde HPLC-UV analizi ile belirlenmiştir ve bileşik, ortam koşullarında yaklaşık 75 gün boyunca bir berrak cam ilaç şişesinde depolandıktan sonra hesaplanan β -izomer içeriği ile karşılaştırılmıştır. Sonuçlar, aşağıda bulunan Tablo 2’de gösterilmektedir. Veriler ile kanıtlandığı üzere, 75 gün boyunca depolamadan

sonra, β -izomer içeriği, %80'in üzerine artmıştır ve bu şekilde, depolama, Karşılaştırmalı Örnek 2'nin kimyasal saflığına negatif olarak etkilemiştir.

Tablo 2: Depolamadan sonra Karşılaştırmalı Örnek 2'nin β -izomerin Oluşumu

Numune	0. günde Kimyasal Saflık	75. günde Kimyasal Saflık
Karşılaştırmalı Örnek 2	%94.3 (%4.4 β -izomer)	%90.4 (%7.8 β -izomer)

5

Kristalli *Mono* Hidroklorür Tuzun stabilitesi, Karşılaştırmalı Örnek 2'nin amorf *mono* hidroklorür tuzu ile kıyaslanmıştır. Kristalli *Mono* Hidroklorür Tuzun ve Karşılaştırmalı Örnek 2'nin avantajları ve dezavantajları sergileyen çeşitli testlerin sonuçları aşağıda bulunan Tablo 3'te gösterilmektedir.

10

Tablo 3: Kristalli *Mono* Hidroklorür Tuzun ve Karşılaştırmalı Örnek 2'nin avantajları ve dezavantajları

Katı form	Avantajlar	Dezavantajlar
Kristalli <i>Mono</i> Hidroklorür Tuz	%90 RH'ye higroskopik değil	Presleme ve öğütmeden sonra belirli kristallik kaybı
	Öğütme veya presleme sonrasında formda veya β -izomer içeriğinde herhangi bir değişim yok	-
	Ortam koşullarında depolamadan sonra β -izomer içerikte herhangi bir artış yok	-
Karşılaştırmalı Örnek 2	Yüksek cam geçişi (166°C)	%70'in üzerinde RH'ye higroskopik
	Depolama ve iletme/soğutma döngüsünden sonra kristalizasyona stabil	%75 RH'nin üzerinde gözlemlenen Kristalli <i>Mono</i> Hidroklorür tuz formda (kristalli amorf) değişim
	-	%63 RH'de depolamadan sonra β -izomer içeriğindeki artış
	-	Presleme ve öğütmeden sonra β -izomer içeriğindeki artış
	-	Ortam koşullarında depolamadan sonra β -izomer içeriğindeki artış
	-	Kristalli <i>Mono</i> Hidroklorür Tuz ile kıyaslandığında üzerine solvante maruziyetten sonra β -izomer oluşumunun daha hızlı oran

HPLC-UV ve XRPD analizi, 0. günde ve 40°C ve %75 RH'de 7 gün boyunca depolamadan sonra Kristalli *Mono* Hidroklorür Tuzunun, Kristalli Mezilat Tuzunun ve Kristalli Sülfat Tuzunun numunelerinde yürütülmüştür. Şekil 1, 4 ve 7, 0. günde ve kıyaslama için kapsanan grafiklerle 40°C ve %75 RH'de depolamadan sonra Kristalli *Mono* Hidroklorür Tuzunun, Kristalli Mezilat Tuzunun ve Kristalli Sülfat Tuzunun XRPD analizini göstermektedir. Şekil 1'de

15

gösterildiği üzere, Kristalli *Mono* Hidroklorür Tuz, depolamadan sonra kristal formda herhangi bir değişim sergilememiştir. Şekil 4'te gösterildiği üzere, Kristalli Mezilat Hidroklorür Tuz, depolamadan sonra kristal formda herhangi bir değişim sergilememiştir. Şekilde gösterilen değişimler, mevcut olması halinde kristal formdaki değişimi gösterecek olan pik konumdan ziyade bir yoğunlukta ve çözünürlüktedir. Dolayısıyla, Kristalli *Mono* Hidroklorür Tuz ve Kristalli Mezilat Tuz, Şekil 1 ve 4'te gösterildiği gibi fiziksel olarak stabildir. Şekil 7'de gösterildiği üzere, Kristalli Sülfat Tuzu, depolamadan sonra kristalli içerik sergilemiştir.

Kristalli Mezilat Tuzunun ve Kristalli Sülfat Tuzunun aynı numunelerine yönelik HPLC-UV analizinin sonuçları Tablo 4'te gösterilmektedir. β -izomer içeriği, depolamadan sonra artmadığı için, bu tuzlar depolama ile negatif olarak etkilenmemiştir.

Tablo 4: Depolamadan sonra Kristalli Mezilat Tuzunda ve Kristalli Sülfat Tuzunda β -izomerin oluşumu

Numune	0. günde Kimyasal Safılık	7 gün, 40°C ve %75 RH'de Kimyasal Safılık
Kristalli Mezilat Tuzu	%92 (%3 β -izomer)	%98 (%2 β -izomer)
Kristalli Sülfat Tuzu	%88 (%9 β -izomer)	%91 (%9 β -izomer)

Ek olarak, sentezden sonra Kristalli *Mono* Hidroklorür Tuzun, Kristalli Mezilat Tuzunun ve Kristalli Sülfat Tuzunun diferansiyel tarama kalorimetrisi (DSC) ve termo-gravimetrik (TGA) analizi yürütülmüştür. DSC eğrileri, Şekil 2, 5 ve 8'de gösterilmektedir ve TGA eğrileri, Şekil 3, 6 ve 9'da gösterilmektedir. Bu şekiller, DSC analizi ile, tuzların degradasyonuna kadar herhangi bir eylemin mevcut olmadığını göstermektedir, bu şekilde yüksek sıcaklıklarda tuzların stabilitesini onaylamaktadır. TGA eğrileri, herhangi bir hidrat veya solvat mevcut olmadığını göstermektedir. Gözlemlenen görünür ağırlık kaybı, makinenin instabilitesinden kaynaklanmaktadır.

Tablo 5, kristalli serbest bazla ve Karşılaştırmalı Örnek 1 ile mevcut buluşun kristalli tuzların DSC ve TGA analizini kıyaslamaktadır.

Tablo 5: Kristalli *Mono* Hidroklorür Tuzun, Kristalli Mezilat Tuzun ve Kristalli Sülfat Tuzunun, Kristalli Serbest Bazın DSC ve TGA Analizi ve Karşılaştırmalı Örnek 1.

Numune	Diferansiyel Tarama Kalorimetrisi	Termo-Gravimetrik Analiz
Kristalli <i>Mono</i> Hidroklorür Tuz	Degradasyona herhangi bir eylem yok	yaklaşık 30°C ila yaklaşık 200°C arasında %3 ağırlık kaybı yaklaşık 200°C ila yaklaşık 250°C arasında %14 ağırlık kaybı

Kristalli Mezilat Tuzu	Degradasyona herhangi bir eylem yok	yaklaşık 30°C ila yaklaşık 200°C arasında %3 ağırlık kaybı yaklaşık 200°C ila yaklaşık 250°C arasında %7 ağırlık kaybı
Kristalli Sülfat Tuzu	Degradasyona herhangi bir eylem yok	yaklaşık 30°C ila yaklaşık 200°C arasında %3 ağırlık kaybı yaklaşık 200°C ila yaklaşık 250°C arasında %14 ağırlık kaybı
Kristalli Serbest Baz	175°C'de endotermik pik (ΔH 72 J.g ⁻¹)	yaklaşık 30°C ile 220°C'den daha az dekompozisyon arasında %15 ağırlık kaybı
Karşılaştırılmal Örnek 1	Yaklaşık 20°C ve yaklaşık 200°C arasında geniş endotermik pik	yaklaşık 30°C ila yaklaşık 106°C arasında %7 ağırlık kaybı yaklaşık 106°C ila yaklaşık 200°C arasında %8 ağırlık kaybı yaklaşık 200°C ila yaklaşık 300°C arasında %23 ağırlık kaybı

Dolayısıyla, Kristalli *Mono* Hidroklorür Tuz, Kristalli Mezilat Tuz ve Kristalli Sülfat Tuz, kristalli serbest bazdan ve Karşılaştırılmal Örnek 1'den daha stabildir.

5 ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTE

Kristalli *Mono* Hidroklorür Tuzunun antimikrobiyal aktivitesi, burada ayrıntılandırıldığı gibi anti-anaerobik aktiviteye, eylem mekanizmasında ve *in vivo* verimlilik çalışmalarında göre değerlendirilmiştir. (4S,4aS,5aR,12aS)-4-dimetilamino-3,10,12,12a-tetrahidroksi-7-

10 [(metoksi(metil)amino)-metil]-1,11-diokso-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-oktahidro-naftasen-2-karboksilik asit amidin amorf *bis* hidroklorür tuz veya kristalli *mono* hidroklorür tuz, bu çalışmalara yönelik numuneleri hazırlamak için kullanıldığı veya kullanılabileceği, bileşik, testten önce çözeltiye yerleştirildiği için, verimlilik verisinin, tüm tuz formları için aynı olduğu teknikte iyi anlaşılmaktadır. Dolayısıyla, (4S,4aS,5aR,12aS)-4-dimetilamino-3,10,12,12a-tetrahidroksi-

15 7-[(metoksi(metil)amino)-metil]-1,11-diokso-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-oktahidro-naftasen-2-karboksilik asit amidin Kristalli *Mono* Hidroklorür Tuzu veya amorf *bis* hidroklorür tuzu ile başlayarak, serbest baz (yukarıda tanımlandığı gibi; burada "aktif") test edilmektedir.

Aşağıdaki çalışmalar için, numuneler, *bis* hidroklorür tuzu ile hazırlanmıştır ve veri, serbest baza ("aktif") bağlanarak eksprese edilmektedir. Kristalli *Mono* Hidroklorür Tuzunun genel anti-anaerobik mikrobiyal aktivitesi, anaerobik bakterinin 37 temsil suşuna karşı aktifin *in vitro* çalışmasıyla görülebilmektedir ve sonuçlar, Tablo 6'da derlenmiştir. Aktif, *P.acnes* dahil Gram-pozitif bakterinin bir çok türüne karşı nispeten potansiyelli aktivite sergilemiştir (bir başka ifadeyle, 4 µg/mL veya daha az minimum inhibitör konsantrasyonu

25 (MIC). Genel olarak, aktif aktivitesi, tetrasiklininkine ve doksiklininkine benzer olmuştur, fakat

minosiklininkinden daha az olmuştur Aktife yönelik yüksek MIC değerlerine (MIC $\geq$ 16 $\mu\text{g/mL}$) sahip organizmalar, *C. perfringens* ve *S. constellatus* içermiştir.

- 5 Gram-negatif anaerobların MIC değerleri, tablo 6'da gösterilmektedir. Tetrasikline dirençli suşlar, aktife çapraz dirençli olmuştur. Aktif ve diğer tetrasiklinler, *E. corrodens* ve *Fusobacterium* türüne karşı potansiyelli aktivite, *P. melaninogenica* (2 suştan 1'i) ve *V. parvula*'ya karşı orta aktivite ve *P. asaccharolytica*'ya karşı zayıf aktivite sergilemiştir.

Tablo 6: Anaerobik Gram Pozitif ve Gram Negatif Bakterilere Karşı Aktifin *in vitro* MIC testinin Kısa Açıklaması

Organizma/Mikromiks No.	ATCC No.	Aktif MIC ($\mu\text{g/mL}$)	TET MIC ($\mu\text{g/mL}$)	DOX MIC ($\mu\text{g/mL}$)	MIN MIC ($\mu\text{g/mL}$)
<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
<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 melaninogenica</i> 3437	--	32	>16	16	16
<i>Prevotella melaninogenica</i> 3443	--	4	8	1	1
<i>Prevotella</i> türleri 3564	--	4	1	1	0.25
<i>Prevotella</i> türleri 3568	--	2	4	1	0.25
<i>Veillonella parvula</i> 1272	17745	4	1	1	0.5
"TET", tetrasiklidir; "DOX", doksisisiklidir; "MIN", minosiklidir; "ATCC", Amerikan Tip Kültür Koleksiyonudur.					

Eylemin Antibakteriyel Spektrumu

- Aktif aktivitesinin antibakteriyel spektrumunun bir değerlendirmesi, çeşitli Gram pozitif ve Gram negatif aerobik ve anaerobik organizmalarla yönelik *in vitro* MIC sapmasıyla çeşitli çalışmalarda belirlenmiştir. Bu deneylerin sonuçları (Tablo 7'de özetlenmektedir), aktif, klinik olarak kullanılan tetrasiklinlerden daha dar bir aktivite spektrumuna sahip propionibakteri ve diğer Gram pozitif organizmalara karşı aktivite sergilemektedir. Tetrasikline dirençli suşlar, aktive çapraz dirençlidir. Her bir organizma grubunun aktivitesi, aşağıdaki tablodaki metinde açıklanmaktadır

Tablo 7: Propionibakteriye ve aerobik Gram pozitif ve Gram negatif organizmalara karşı *in vitro* MIC testinin Kısa Açıklaması

Organizma [Tip] (İzolot no.)	Bileşik	MIC Aralığı (µg/mL)	MIC ₅₀ (µg/mL)	MIC ₉₀ (µg/mL)
Propionibakteriler				
<i>P.acnes</i> [tetS] (13)	Aktif	0.25 - 4	0.5	2
	Tetrasiklin	0,5 - 4	0.5	4
	Doksisisiklin	0.25 - 1	0.25	1
	Minosiklin	<0.06 - >8	0.125	1
<i>P.acnes</i> [tetR]	Aktif	>8 - >8		
	Tetrasiklin	>8 - >8		

(2)	Doksisiklin	8 - 8		
	Minosiklin	2 - 2		
<i>P. acnes</i> [klinik izolatlar] (55)	Aktif	0.5 - 16	0.5	4
	Tetrasiklin	0.5 - 32	1	2
	Doksisiklin	0.25 - 16	0.5	2
	Minosiklin	0.125 - 8	0.25	1
	Klindamisin	≤0.06 - 64	<0.06	4
	Eritromisin	<0.06 - >128	<0.06	>128
<i>P. acnes</i> [tetS]	Aktif	0.25 - 1		
	Tetrasiklin	0.25 - 1		
	Doksisiklin	0.12 - 0.5		
	Minosiklin	0.06 - 0.5		
(2)	Klindamisin	0.06 - 0.25		
	Metronidazol	>32 - >32		
	Penisilin	0.03 - 0.5		
	Vankomisin	0.5 - 0.5		
<i>P. granulosum</i> [klinik izolatlar] (3)	Aktif	1 - 1		
	Tetrasiklin	1 - 2		
	Doksisiklin	0.5 - 1		
	Minosiklin	0.25 - 0.5		
	Klindamisin	<0.06 - <0.06		
	Eritromisin	≤0.06 - <0.06		
<i>P. avidum</i> [klinik izolatlar] (4)	Aktif	1 - 4		
	Tetrasiklin	1 - 8		
	Doksisiklin	0.5 - 4		
	Minosiklin	0.25 - 2		
	Klindamisin	≤0.06 - 0.5		
	Eritromisin	0.125 - 0.125		
<u>Gram pozitif aerobik bakteri</u>				
<i>S. aureus</i> [tetS] (20)	Aktif	≤0.06 - 0.25	0.125	0.25
	Tetrasiklin	≤0.06 - 0.25	0.25	0.25
	Doksisiklin	≤0.06 - 0.25	<0.06	0.25
	Minosiklin	0.125 - 0.5	0.25	0.5
<i>S. aureus</i> [tetR] (10)	Aktif	0.125 - 32	4	16
	Tetrasiklin	2 - 64	64	64
	Doksisiklin	1 - 16	4	16
	Minosiklin	0.25 - 16	0.5	8
	Aktif	0.12 - 2	0.25	2
	Tetrasiklin	0.12 - 2	0.25	2
	Doksisiklin	0.06 - 1	0.12	1

<i>S. epidermidis</i> [MSSE] (31)	Minosiklin	0.06 - 0.25	0.06	0.25
	Eritromisin	0.12 - >32	0.25	>32
	Klindamisin	<0.03 - >32	0.12	>32
	Oksasilin	0.06 - 0.25	0.12	0.25
	Vankomisin	1 - 2	2	2
	Aktif	0.25 - 2	0.5	2
	Tetrasiklin	0.25 - >32	1	2
<i>S. epidermidis</i> [MRSE] (32)	Doksisiklin	0.12 - 8	0.5	1
	Minosiklin	0.06 - 0.5	0.12	0.25
	Eritromisin	0.12 - >32	>32	>32
	Klindamisin	0.06 - >32	>32	>32
	Oksasilin	0.5 - >32	32	>32
	Vankomisin	1 - 2	2	2
<i>S. pneumoniae</i> [tetS] (5)	Aktif	≤0.06 - 0.125		
	Tetrasiklin	≤0.06 - 0.25		
	Doksisiklin	≤0.06 - 0.125		
	Minosiklin	0.25 - 0.25		
<i>S. pneumoniae</i> [tetR] (5)	Aktif	4 - 32		
	Tetrasiklin	32 - 64		
	Doksisiklin	4 - 4		
	Minosiklin	8 - 16		
Organizma [Tip] (İzolat no.)	Bileşik	MIC Aralığı (µg/mL)	MIC₅₀ (mg/mL)	MIC₉₀ (mg/mL)
<i>S. pneumoniae</i> [PSSP] (32)	Aktif	<0.03-32	0.12	0.25
	Tetrasiklin	0.06->32	0.12	0.25
	Doksisiklin	0.03->16	0.06	0.12
	Minosiklin	<0.015->16	0.06	0.12
	Eritromisin	<0.015->16	0.03	2
	Klindamisin	<0.015->16	0.03	0.06
	Penisilin	<0.015-0.12	<0.015	0.06
	Vankomisin	0.06-0.25	0.25	0.25
<i>S. pyogenes</i> (32)	Aktif	0.12-16	0.12	8
	Tetrasiklin	0.12-32	0.12	32
	Doksisiklin	0.06-8	0.12	4
	Minosiklin	0.03-8	0.06	8
	Eritromisin	0.03->16	0.06	0.06
	Klindamisin	0.03->16	0.03	0.06
	Penisilin	<0.015-0.25	<0.015	<0.015
	Vankomisin	0.25-0.5	0.25	0.25
<i>S. pyogenes</i> [tetS]	Aktif	≤0.06 - 0.25		
	Tetrasiklin	≤0.06 - 0.125		

(5)	Doksisiklin	≤0.06 - 0.1 25		
	Minosiklin	0.25 - 0.5		
	Aktif	4 - 16		
<i>S. pyogenes</i> [tetR] (5)	Tetrasiklin	32 - 64		
	Doksisiklin	4 - 8		
	Minosiklin	4 - 8		
<i>S. agalactiae</i> (31)	Aktif	0.12-32	16	16
	Tetrasiklin	0.12->32	32	>32
	Doksisiklin	0.06-16	8	16
	Minosiklin	0.03-16	16	16
	Eritromisin	0.03->16	0.06	>16
	Klindamisin	0.03->16	0.06	>16
	Penisilin	<0.015-2	0.03	1
	Vankomisin	0.25-2	0.5	0.5
<i>S. agalactiae</i> [tetS] (3)	Aktif	0.125 - 0.25		
	Tetrasiklin	0.25 - 0.25		
	Doksisiklin	0.25 - 0.25		
	Minosiklin	0.5 - 0.5		
<i>S. agalactiae</i> [tetR] (7)	Aktif	16 - 32		
	Tetrasiklin	16 - 64		
	Doksisiklin	8 - 16		
	Minosiklin	8 - 16		
<i>S. haemolyticus</i> (33)	Aktif	0.12-2	0.12	2
	Tetrasiklin	0.12->32	1	>32
	Doksisiklin	0.06-16	0.5	16
	Minosiklin	<0.03-0.5	0.06	0.5
	Eritromisin	0.12->32	>32	>32
	Klindamisin	0.06->32	0.12	1
	Oksasilin	0.00->32	0.25	>32
	Vankomisin	0.5-2	1	1
<i>Streptococcus</i> spp. [Grup C] (30)	Aktif	0.12-16	0.25	16
	Tetrasiklin	0.12->32	0.25	32
	Doksisiklin	0.06-16	0.12	8
	Minosiklin	0.03-8	0.06	8
	Eritromisin	≤0.015->16	0.06	4
	Klindamisin	≤0.015->16	0.06	0.12
	Penisilin	≤0.015-0.03	<0.015	<0.015
	Vankomisin	0.25-1	0.25	0.5
<i>E. faecalis</i>	Aktif	≤0.06 - ≤0.06		
	Tetrasiklin	0.25 - 0.5		

[tetS] (4)	Doksisiklin	≤0.06 - 0.125		
	Minosiklin	0.25 - 0.5		
<i>E. faecalis</i> [tetR] (6)	Aktif	8 - 32		
	Tetrasiklin	32 - 64		
	Doksisiklin	2- 16		
	Minosiklin	4 - 16		
<i>E. faecalis</i> [VSE] (31)	Aktif	0.25 - 32	32	32
	Tetrasiklin	0.25 - >64	32	64
	Doksisiklin	0.12-16	8	8
	Minosiklin	0.06- 16	8	16
	Eritromisin	0.25 - >32	>32	>32
	Klindamisin	4 - >32	>32	>32
	Amfisilin	0.5-8	1	1
	Vankomisin	0.5 - 4	1	2
<i>E. faecium</i> [tetS] (4)	Aktif	≤0.06 - ≤0.06		
	Tetrasiklin	0.125 - 0.25		
	Doksisiklin	≤0.06 - ≤0.06		
	Minosiklin	0.25 - 0.5		
<i>E. faecium</i> [tetR] (6)	Aktif	8 - 32		
	Tetrasiklin	32 - 64		
	Doksisiklin	4 - 16		
	Minosiklin	2 - 32		
<i>E. faecium</i> [VSE] (32)	Aktif	0.12 - 32	0.5	32
	Tetrasiklin	0.12 - >64	1	>64
	Doksisiklin	0.06 - 32	0.5	16
	Minosiklin	≤0.03 - 16	0.12	16
	Eritromisin	0.06 - >32	>32	>32
	Klindamisin	0.12 - >32	>32	>32
	Amfisilin	0.12->64	64	>64
	Vankomisin	0.25 - 2	1	1
<i>E. faecium</i> [VRE] (30)	Aktif	0.12 - 32	2	32
	Tetrasiklin	0.12 - >64	2	>64
	Doksisiklin	0.06 - 16	1	8
	Minosiklin	≤0.03 - 16	0.25	16
	Eritromisin	0.12 - >32	>32	>32
	Klindamisin	0.06 - >32	>32	>32
	Amfisilin	8->64	>64	>64
	Vankomisin	>64	>64	>64
<u>Gram negatif aerobik bakteri</u>				

<i>E.coli</i> [tetS] (7)	Aktif	4 - 32		
	Tetrasiklin	1 - 4		
	Doksisiklin	0.5 - 4		
	Minosiklin	0.5 - 4		
<i>E. coli</i> [tetR] (3)	Aktif	>64 - >64		
	Tetrasiklin	>64 - >64		
	Doksisiklin	64 - 64		
	Minosiklin	8 - 16		
<i>E. coli</i>	Aktif	2->64	16	>64
Organizma [Tip] (İzolat no.)	Bileşik	MIC Aralığı (µg/mL)	MIC₅₀ (µg/mL)	MIC₉₀ (µg/mL)
(33)	Tetrasiklin	1->64	2	>64
	Doksisiklin	0.5->32	2	32
	Minosiklin	0.25>32	1	8
	Amfisilin	1->64	>64	>64
	Siprofloksasin	0.008->2	0.01 5	>2
	Sefalotin	2->64	32	>64
	Tmp/Sxt	≤ 0.06/1.19- >64/1216	0.25/4.75	>64/1216
<i>K. pneumoniae</i> [tetS] (7)	Aktif	16 - 64		
	Tetrasiklin	0.5 - 4		
	Doksisiklin	0.5 - 8		
	Minosiklin	1 - 16		
<i>K. pneumoniae</i> [tetR] (5)	Aktif	>64 - >64		
	Tetrasiklin	8 - >64		
	Doksisiklin	16 - 64		
	Minosiklin	16 - >64		
<i>K. pneumoniae</i> (31)	Aktif	16->64	>64	>64
	Tetrasiklin	1->64	8	>64
	Doksisiklin	1->32	8	>32
	Minosiklin	1->32	4	>32
	Amfisilin	>64	>64	>64
	Siprofloksasin	0.03->2	>2	>2
	Sefalotin	>64	>64	>64
	Tmp/Sxt	0.12/2.38- >64/1216	>64/1216	>64/1216
<i>E. cloacae</i> (30)	Aktif	0.25->64	32	>64
	Tetrasiklin	0.5->64	2	>64
	Doksisiklin	0.06->32	2	32
	Minosiklin	≤0.03->32	1	16
	Amfisilin	4->64	64	>64
	Siprofloksasin	0.008->2	0.25	>2

	Sefalotin	2->64	>64	>64
	Tmp/Sxt	≤0.06/1.19->64/1216	0.25/4.75	>64/1216
<i>P.mirabilis</i> (30)	Aktif	>64	>64	>64
	Tetrasiklin	16->64	32	64
	Doksisiklin	32->32	>32	>32
	Minosiklin	8->32	16	>32
	Amfisilin	0.5->64	4	>64
	Siprofloksasin	0.015->2	>2	>2
	Sefalotin	2->64	8	>64
	Tmp/Sxt	≤0.06/1.19->64/1216	2/38	>64/1216
<i>P. aeruginosa</i> (11)	Aktif	32->64	>64	>64
	Tetrasiklin	4->64	64	64
	Doksisiklin	4->32	>32	>32
	Minosiklin	8->32	>32	>32
	Amfisilin	>64	>64	>64
	Siprofloksasin	0.12->2	>2	>2
	Sefalotin	>64	>64	>64
	Tmp/Sxt	2/38->64/1216	16/304	>64/1216
<i>Salmonella</i> spp. (35)	Aktif	8->64	16	>64
	Tetrasiklin	1->64	2	>64
	Doksisiklin	2->32	2	32
	Minosiklin	1->32	2	8
	Amfisilin	0.5->64	1	>64
	Siprofloksasin	0.015-0.25	0.015	0.03
	Sefalotin	1->64	2	16
	Tmp/Sxt	≤0.06/1.19->64/1216	≤0.06/1.19->64/1216	0.12/2.38

Tablo 7'de kullanılan kısaltmalar: tetS, tetrasikline duyarlı tetR, tetrasikline dirençli; VSE, vankomisine hassas *Enterococcus*; VRE, vankomisine dirençli *Enterococcus*; MSSE, metisiline hassas *Staphylococcus epidermidis*; MRSE, metisiline dirençli *Staphylococcus epidermidis*; PSSP, metisiline hassas *Streptococcus pneumoniae*; MIC, minimum inhibitör konsantrasyonu; %50 izolatın inhibe edildiği MIC₅₀, MIC; %90 izolatın inhibe edildiği MIC₉₀, MIC.

Propionibakteriye Karşı Aktifin İn Vitro Antibakteriyel Aktivitesi

- 5 Akne vulgaris patojen *P. acnes*'e karşı aktifin *in vitro* antimikrobiyal aktivitesi, anaeroblara yönelik Klinik ve Laboratuvar Standartlar Kurumu (CLSI)-onaylı agar seyrelti yöntemini kullanarak değerlendirilmiştir. Duyarlılık testi, çeşitli makrolide dirençli suşlar dahil *P. acnes*'in bir tarama paneline karşı MIC'nin ölçülmesi ile uygulanmıştır. Aktif için belirlenmiş değerler, klinik olarak kullanılan akne terapötikleri, doksisiklin ve minosiklin dahil antibiyotiklerin

tetrasiklin sınıflarına benzer elemanlarla karşılaştırılmıştır (Tablo 7). 13 tetrasikline duyarlı *P. acnes*'in bir paneline karşı aktif, doksisisiklin ve minosiklin ile karşılaştırılabilir MIC'leri sergilemiştir.

- 5 Genişletilmiş bir çalışmada, aktif, çeşitli tetrasiklin komparatörleri ile birlikte propionibakterinin 62 güncel klinik izolatına karşı test edilmiştir (Tablo 7). Geçmiş 3 yıl içerisinde elde edilen 26 izolat dahil geçen 7 yıl içerisinde izole edilmiş *P. acnes*'in 55 suşuna karşı aktif, doksisisiklininkine benzer aktivite sergilemiştir.

10 *Staphylococci'ye Karşı Aktifin İn Vitro Antibakteriyel Aktivitesi*

- On üç suş *S. aureus*, aktive (Tablo 7) ve geleneksel tetrasiklinlere (tetrasiklin, doksisisiklin ve minosiklin) karşı test edilmiştir. Bilinen dirençli mekanizmalar, ribozomal koruma ve aktif akışa sahip yazılmış suşlar dahil edilmiştir. Aktivite değişken olmuştur ve doksisisiklin ve minosiklin ile karşılaştırılmıştır

Streptococci'ye Karşı Aktifin İn Vitro Antibakteriyel Aktivitesi

- On üç suş streptococci (10 her bir *S. pyogenes*, *S. agalactiae* ve *S. pneumoniae*), aktif ve geleneksel tetrasiklinlere (tetrasiklin, doksisisiklin ve minosiklin) karşı test edilmiştir. *tetM* veya *tetO* ile yönlendirilen ribozomal korumanın özelliği olan tetrasikline ve minosikline bilinen direnç sahip yazılmış suşlar dahil edilmiştir. *Staphylococci*'ye benzer olarak, MIC aralıkları ve MIC₉₀ değerleri (Tablo 7), minosikline ve doksisisikline en yakın olmuştur. Aktif, doksisisiklin ve minosiklin ile karşılaştırılabilir MIC'ler *S. pyogenes*'in duyarlı suşlarına karşı iyi aktivite sergilemiştir.

- Aktif, 0.25 µg/mL veya daha azında inhibe edilmiş 7 suşla *S. agalactiae*'nin MIC değerlerinin bir bimodal dağılımı ve inhibisyon için 16 ila 32 µg/mL gerektiren izolatların geri kalanını sergilemiştir. Yükselmiş MIC değerleri, tetrasikline dirençle takip edilmiştir. Aktifin MIC₅₀ ve MIC₉₀ değerleri, doksisisiklin ve minosiklininkilere benzer olmuştur, fakat tetrasiklinkinden daha az olmuştur.

- Aktif, tümü ile PSSP'ye karşı potansiyelli aktif sergilemiştir, fakat 3 suş, 0.25 µg/mL veya daha azında inhibe etmiştir. Yükselmiş MIC değerleri, tetrasikline dirençle takip edilmiştir. Aktivite, tetrasiklininkine, doksisisiklininkine ve minosiklininkine benzer olmuştur.

Aktif, tümü ile *S. pyogenes*'e karşı potansiyelli aktif sergilemiştir, fakat 6 suş, 0.25 µg/mL veya daha azında inhibe etmiştir. Yükselmiş MIC'ler (≥ 4 µg/mL), tetrasikline dirençle takip edilen 5 suş için gözlemlenmiştir. Aktifin MIC₉₀ değeri, doksisiklin ve minosiklinine benzer olmuştur, fakat tetrasiklinkinden daha az olmuştur.

Aktif, 0.25 µg/mL veya daha azında inhibe edilmiş 19 suşla Grup C streptococci'nin MIC değerlerinin bir bimodal dağılımı ve inhibisyon için 4 ila 16 µg/mL gerektiren izolatların geri kalanını sergilemiştir. Yükselmiş MIC değerleri, tetrasikline dirençle takip edilmiştir. Aktifin MIC₅₀ ve MIC₉₀ değerleri, tetrasiklininkilere benzer olmuştur, fakat doksisiklininkilerden ve minosiklininkilerden daha yüksek olmuştur.

Enterococci'ye Karşı Aktifin İn Vitro Antibakteriyel Aktivitesi

Yirmi enterokokkal suş (10 her bir *E. faecalis* ve *E. faecium*), 11 iyi karakterize edilmiş tetrasikline dirençli suşlar dahil aktif geleneksel tetrasiklinlere (tetrasiklin, doksisiklin ve minosiklin) karşı test edilmiştir (Tablo 7). Staphylococci'nin aksine, aktif, aktif (*tetK* veya *tetL* ile yönlendirilmektedir) ile veya ribozomal koruma (*tetM* veya *tetO*) ile herhangi bir tetrasikline dirençli suşa karşı aktif olmamıştır. Aktif, doksisiklininki ile kıyaslanabilir *E. faecalis* ve *E. faecium*'un tetrasikline duyarlı suşlara karşı aktivite sergilememiştir.

Aktif, 0.5 µg/mL veya daha azında inhibe edilmiş 8 suşla vankomisine duyarlı *E. faecalis*'in MIC değerlerinin bir bimodal dağılımı ve inhibisyon için 16 ila 32 µg/mL gerektiren izolatların geri kalanını sergilemiştir. Yükselmiş MIC değerleri, tetrasikline dirençle takip edilmiştir. Aktifin MIC₅₀ ve MIC₉₀ değerleri, tetrasiklininkilere benzer olmuştur ve doksisiklininkilerden ve minosiklininkilerden daha yüksek olmuştur.

Aktif, 0.5 µg/mL veya daha azında inhibe edilmiş 17 suşla vankomisine duyarlı *E. faecium*'nin MIC değerlerinin bir bimodal dağılımı ve inhibisyon için 16 ila 32 µg/mL gerektiren izolatların geri kalanını sergilemiştir. Yükselmiş MIC değerleri, tetrasikline dirençle takip edilmiştir. Aktifin MIC₅₀ ve MIC₉₀ değerleri, tetrasiklininkinden daha düşük bir MIC₉₀ değeri ile doksisiklin ve minosiklininkilere benzer olmuştur.

Aktif, vankomisine dirençli *E. faecium*'a yönelik MIC değerlerinin bir geniş aralığı sergilemiştir. Yükselmiş MIC değerleri, tetrasikline dirençle takip edilmiştir. Aktife yönelik

MIC₅₀ değeri, tetrasiklininkine ve doksisisiklininkine benzer olmuştur ve minosiklininkinden 8 kat yüksek olmuştur. Aktifin MIC₉₀ değerleri, tetrasiklininkinden daha düşük olmuştur ve doksisisiklininkinden ve minosiklininkinden daha büyük olmuştur. Suşların yüksek bir yüzdesi, test maddelerinin geri kalanına dirençli olmuştur.

5

Gram negatif Bakteriye Karşı İn Vitro Antibakteriyel Aktivite

E.coli'nin 7 tetrasikline dirençli suşlarına karşı aktif, doksisisiklininkinden ve minosiklininkinden *in vitro* olarak daha az aktif olmuştur (Tablo 7). Hatta *K. pneumoniae*'nin tetrasikline duyarlı suşlarına karşı aktive yönelik daha az aktivite gözlemlenmiştir. Buna karşın, doksisisiklin ve minosiklin, bu organizmalara karşı aktiften daha büyük aktivite sergilemiştir. Beklendiği üzere, *tetB* veya *tetD* ile yönlendirilen aktif akşın sergileyen 6 tetrasikline dirençli suşlara karşı aktive yönelik herhangi bir aktivite gözlemlenmemiştir.

10

15

Aktif, 1 µg/mL daha azında az sayıda bir suş (30'dan 7) inhibe edilmesine rağmen, *E. cloacae*'ye karşı genel olarak herhangi bir zayıf aktiviteye sahip olmamıştır. MIC₅₀ değeri, diğer tetrasiklininkilerden 16 ila 32 kat daha yüksek olmuştur. Aktife yönelik MIC₉₀ değeri, tetrasiklin ile aynı olmuştur ve doksisisiklininkinden veya minosiklininkinden daha yüksek olmuştur.

20

Aktif, sırasıyla 16 ve >64 µg/mL MIC₅₀ ve MIC₉₀ değerleri ile *E.coli*'ye karşı tetrasiklinlerin en az aktivitesi olmuştur. Aktif, *K. pneumoniae*'ye karşı tetrasiklinlerin en az aktivitesi olmuştur. Aktif genel olarak *Salmonella* türüne karşı zayıf aktiviteye sahip olmuştur ve tetrasiklinlerin en az aktivitesi olmuştur.

25

Eylem Mekanizması

Aşağıdaki çalışmalar için, numuneler, *bis* hidroklorür tuz ile hazırlanmıştır ve veri, serbest baza ("aktif") bağlanarak eksprese edilmektedir. Kristalli *Mono* Hidroklorürü Tuzun eylem mekanizması aşağıda açıklanmış gibi aktifin çalışmasıyla iki farklı yaklaşımla belirlenmiştir.

30

Birinci yaklaşımda, Eylemin Antibakteriyel Mekanizması Bakteriyel Transkripsiyonun ve Çevrimin İn Vitro İnhibisyonu, aktifin, bakteriyel protein sentezini inhibe edebilme kabiliyeti, bir *in vitro* hücre içermeyen bakteriyel transkripsiyonu ve çevrim deneyini kullanarak

35

değerlendirilmiştir (Promega Corporation, Madison, WI'dan ticari olarak temin edilebilmektedir) (Beckler, G., Promega Notes 31 (1991) sayfa 3-6). Aktif, bir IC₅₀ 8.3 ± 0.18 µM ile bildirici proteinin sentezini inhibe etmiştir. Bu değer, komparatör tetrasiklinler, doksisisiklin ve minosiklin için belirlenmiş IC₅₀ değerleri ile kıyaslanabilmektedir (sırasıyla 4.7 ± 0.48 ve 2.4 ± 0.22 µM IC₅₀ değerleri). Bu sonuçlar, aktifin, bakteriyel protein sentezini inhibe ederek bir klasik tetrasiklin olarak işlev gösterdiğine dair kanıt sağlamaktadır.

İkinci yaklaşımda, Eylemin Antibakteriyel Mekanizması *Staphylococcus aureus*'da Makromoleküler Sentezin İnhibisyonu, aktifin, bakteriyel protein sentezini aktif hale getirebilme kabiliyeti, Gram pozitif organizmada, *S.aureus* makromoleküler sentezin bir tüm hücre deneyinde onaylanmıştır. Aktif, doza bağlı bir şekilde, MIC'nin (0.063 ila 2 µg/mL) 0.25 ila 8 kat konsantrasyon aralığı içerisinde büyüme organizmasındaki proteinlerine [³H]-lösinin dahil edilmesini inhibe etmiştir. Tetrasiklin komparatörleri doksisisiklin ve minosiklin için elde edilen değerler ile kıyaslanabilen MIC'nin 8 katında %80 bir maksimum inhibisyon gözlemlenmiştir. Buna karşın, MIC'nin 8 katında aktif, test bakterilerinin hücre çeperi, DNA, RNA ve lipid bileşenlerinin sentezi için %20'den daha az inhibisyonu sergilemiştir. Çalışmanın sonuçları aktifin, bilinen tetrasiklinlerle kıyaslanabilen konsantrasyonlarda bakteriyel protein sentezinin bir seçici inhibitörü olarak hareket ettiğini göstermektedir.

Yukarıda açıklanan *in vitro* duyarlılık çalışmaları karakterize edilmiş tetrasikline dirençli genlere sahip tetrasikline dirençli suşları içermiştir. En yaygın tetrasikline dirençli genleri barındıran suşlar seçilmiştir: aktif (*tetK*, *tet38*, *tetL*, *tetS*, *tetB*, ve *tetD*), ribozomal koruma (*tetM* ve *tetO*), ayrıca rRNA noktası mutasyonu ile dirençli *P.acnes*. Bu seçilen suşlara yönelik MIC değerleri, Tablo 8'de gösterildiği gibi, aktif ve diğer tetrasiklinler arasında bir çapraz direnç derecesi sergilemiştir. Bir tetrasikline dirençli genin mevcudiyeti, doksisisiklininkilere ve/veya minosiklininkilere benzer, fakat tetrasiklininkilerden daha düşük MIC değerleri ile duyarlı suşlara (*S. aureus*'da *tetK*'nin hariç tutulmasıyla) göre aktifin MIC'sini arttırmıştır.

Tablo 8: Karakterize Edilmiş Tetrasikline Dirençli Mekanizmalar ile Bakteriye Suşlarına Karşı Aktifin Aktivitesi

Organizma	Suş PBS#	Mek./Gen otip	Aktif MIC (µg/mL)	Doksisisiklin MIC (µg/mL)	Minosiklin MIC (µg/mL)
<i>P. acnes</i>	1073	16S rRNA nokta mutasyonu	>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

Enfeksiyonun Hayvan Modelleri

Aşağıdaki çalışmalar için, numuneler, *bis* hidroklorür tuz ile hazırlanmıştır ve veri, serbest baza ("aktif") bağlanarak eksprese edilmektedir. *İn vivo* verimlilik çalışmaları üç ayrı hayvan modeli ve bir inflamasyon modeli ile yürütülmüştür. Aktife kıyaslanabilir aktiviteye sahip olarak, çalışmalar aşağıdakileri göstermektedir: 1) *P. acnes* ile benzer *in vitro* duyarlılıkla temsili Gram-pozitif patojenlere karşı ticari olarak mevcut tetrasiklin akne ilaçları (doksisisiklin ve minisoklin) kıyaslanan Kristalli *Mono* Hidroklorür Tuzun anti-efektif verimlilik ve 2) Kristalli *Mono* Hidroklorür Tuzun anti-inflamatuvar aktivitesi.

Komparatörler, steril suyun bir vehikülünde 10 mg/mL bir konsantrasyonda dozlanmıştır ve aktif parçaların yüzdesi için ayarlanmıştır. Uyluk yarası ve sıçan ayak pedi ödem çalışmaları haricinde, tüm çalışmalar, CD-1 erkek farelerde yürütülmüştür. Uyluk yarası modeli, CD-1 dişi fareleri kullanarak yürütülmüştür ve sıçan ayak pedi ödem çalışmaları Sprague-Dawley erkek sıçanlarla yürütülmüştür.

Tablo 9, aktif verimliliğini değerlendiren aşağıdaki üç çalışmadan toplanan veriyi sunmaktadır

Birinci çalışma, bir *S. aureus* Sistemik İntraperitoneal Uygulama (IPC) Modelinde aktifi değerlendirmiştir. Amaç, akne vulgarise yönelik ticari olarak mevcut tetrasiklin tedavilerine kıyasla bir akut bulaşıcı modelde bir Gram-pozitif organizmasında karşı aktifin *in vivo*

- aktivitesini değerlendirmek olmuştur. Bakteriyel kültürler, gece boyunca tetrasikline hassas *S. aureus* RN450-1'i gece boyunca büyüterek hazırlanmıştı daha sonrasında steril fosfat tamponlu salinle (PBS) seyreltilmektedir. Her bir deney için, toplam 30 fare, %5 steril bakteriyolojik musinde 500 µl 7.5×10^7 CFU ile intraperitoneal boşluğa enjeksiyon ile enfekte edilmiştir. 5 farenin dört ila beş tedavi grubu, steril suda 0.01 ila 0.5 mg/kg aralığında dozlarda aktif, doksisisiklin ve/veya minosiklinin tek bir enjeksiyonu ile tedavi edilmiştir. Dozlar, enfeksiyondan 1 saat sonra subkütanöz (SC) olarak uygulanmıştı 5 fareden bir ek enfekte grup, bir negatif kontrol (tedavi edilmemiş) grup olarak dahil edilmiştir. Tüm alışmalar için, fakat bir pozitif kontrol grubu (rn. doksisisiklin, minosiklin veya siprofloksasin) dahil edilmiştir.
- 10 Fareler, 7 güne kadar sağkalın için takip edilmiştir. Verimlilik, enfeksiyondan 48 saat sonra PD₅₀ hesaplanarak belirlenmiştir. PD₅₀ (koruyucu doz, %50), %50 sağkalın elde etmek için gerekli dozdur. Bildirilen PD₅₀ değerleri, test edilen her bir ilacın 2 ila 3 bağlımsız deneyinin bir ortalamasıdır.
- 15 Aktif, bir 0.25 mg/kg PD₅₀'ye neden olacak şekilde *S. aureus* RN450-1'e karşı potansiyel aktivite sergilemiştir ve bir temsili Gram-pozitif patojene karşı doksisisikline benzer aktivite sergilemiştir.
- İkinci alışma, bir *S. aureus* Uyluk Yarası Enfeksiyon Modelinde Aktifin Verimliliği, bir doku tabanlı enfeksiyon modelinde bir temsili Gram-pozitif enfeksiyona karşı aktifin aktivitesine bakmıştı Aktifin verimliliği, immün sistemi baskılanmış farelerin bir uyluk yarası modelinde *S. aureus* RN450-1'e karşı incelenmiştir. Toplam 40 fare (grup başına n=4 ila 8 fare), enfeksiyondan dört gün önce (150 mg/kg) ve bir gün önce (100 mg/kg) siklofosfamid tedavisi ile uygulanan nötrofenik olmuştur. Bakteriyel kültürler, gece boyunca *S. aureus* RN450-1'i büyüterek ve steril PBS ile seyreltilerek hazırlanmıştı Steril PBS'de 100 µL of $\sim 1 \times 10^6$ CFU/mL bir enjeksiyon, uyluğa enjekte edilmiştir. Her bir ilaç için dört fare grubu, enfeksiyondan 2 ve 6 saat sonra 0.33, 1, 3 veya 9 mg/kg dozlar intravenöz olarak almıştı Tedavi edilmemiş farelerin bir ek grubu, bir negatif kontrol grubu olarak hareket etmiştir. Enfeksiyondan 24 saat sonra, uyluklar aseptik olarak toplanmışı homojenize edilmiş ve uyluk başına bakteriyel yükü numaralandırnak için plakalanmıştı Veriler, ED₅₀ değerleri olarak bildirilmektedir. ED₅₀ (%50 etkili doz), tedavi edilmemiş kontrollere kıyasla hedef ortanda bakteriyel yükte (koloni oluşturma birimleri [CFU]/tüm organ) bir 2 log₁₀ azalmayı elde etmek için gerekli dozdur.
- 30 Tablo 9'da gösterildiği gibi, aktif, *S. aureus* uyluk yarası modelinde akne vulgaris için yaygın
- 35

olarak kullanılan tedavi ileri olan doksisikline eşdeğer verimlilik sergilemiştir.

Üçüncü çalışma, bir Akut *S. pneumoniae* Respiratuvar Yolu Enfeksiyonu (RTI) modelinde Aktifin Verimliliği, doksisikline kıyasla bir ek doku tabanlı enfeksiyon modelinden aktifin 5 aktivitesini sergilemiştir. Aktif ve doksisiklin, immün sistemi bastırılmış farelerde bir *S. pneumoniae* ile indüklenmiş akut pnömoniye karşı bağışıklık bir şekilde test edilmiştir. Her bir deneyde, 35 fare, enfeksiyondan dört gün önce (150 mg/kg) ve bir gün önce (100 mg/kg) siklofosfamidin bir intraperitoneal (IP) enjeksiyonu ile nötrofenik uygulanmış Tetrasikline duyarlı *S. pneumoniae* PBS1339, gece boyunca plakalarda büyütülmüştür, koloniler 10 toplanmış ve steril PBS'de yeniden askıya alınmıştır. Fareler, $\sim 6 \times 10^6$ CFU/fareyi içeren 50 μ L bu bakteriyel süspansiyonla intranazal olarak enfekte edilmiştir. Enfeksiyondan 2 saat sonra, 5 farenin 4 ila 5 grubu, steril suda çözülmuş 5 (sadece aktif), 10, 20, 40 veya 80 mg/kg aktifin veya doksisiklinin tek bir intravenöz (IV) dozu ile tedavi edilmiştir. Her bir çalışma ayrıca bir tedavi edilmemiş kontrol grubuna ve bir pozitif kontrol bileşiği (örn. 20 15 mg/kg IV vankomisin) alan bir gruba sahip olmuştur. Verimlilik, enfeksiyondan 72 saat sonra PD₅₀ hesaplanarak belirlenmiştir.

Aktifin tek bir IV dozu, 4.66 mg/kg bir PD₅₀'de bir nötrofenik, letal *S. pneumoniae* RTI modelinde aktivite sergilemiştir (Tablo 9'da gösterildiği gibi). Bu doz, doksisikline yönelik 20 PD₅₀'yi elde etmek için gerekli 7.18 mg/kg dozdan hafif daha düşük olmuştur. Aktif, doksisiklininkine ile kıyaslanmıştır veya doksisiklininkinden hafif daha iyi olan bu ek doku tabanlı enfeksiyon modelinde aktivite sergilemiştir.

Tablo 9: Mürin Enfeksiyonu Modellerinde Aktifin ve Komparatörlerin Verimliliğin Kısa Açıklaması

Bileşik	<i>S. aureus</i> RN450-1 IPC PD ₅₀ (mg/kg)	<i>S. aureus</i> RN450-1 Uyluk ED ₅₀ (mg/kg)	<i>S. pneumoniae</i> PBS1339 RTI PD ₅₀ (mg/kg)
Aktif	0.25	8.23	4.66
Doksisiklin	0.30	8.31	7.18
Minosiklin	0.03	--	--

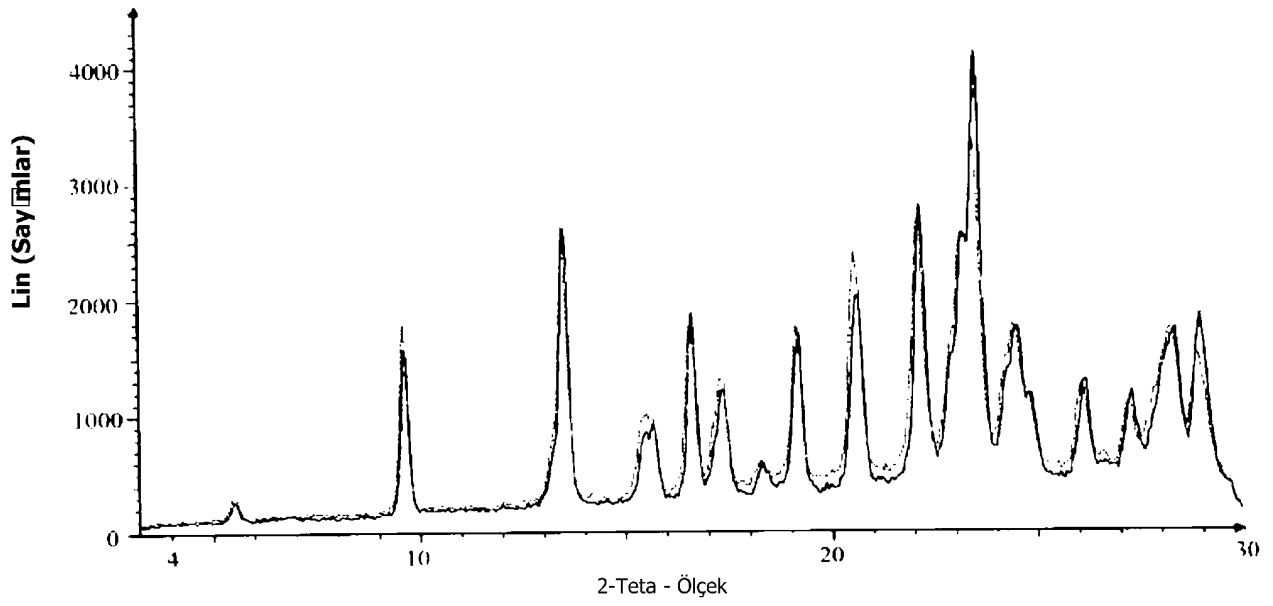
Sıçan Karajenen ile İndüklenmiş Ayak Pedi Ödeminin bir İnflamasyon Modelinde Aktifin *In Vivo* Verimliliğine dair çalışma, minosiklin ve doksisikline kıyasla aktifin anti-inflatuvar özelliklerini değerlendirmek için yürütülmüştür. 3 ila 8 sıçan grupları arka ayakta inflamatuvar karajenen çözeltisinin (1mg/100 μ L) 5 dakika önce aktif, doksisiklin, minosiklin ve/veya salin kontrolü ile IP olarak enjekte edilmiştir. Her bir çalışma ayrıca bir salinle tedavi edilmiş kontrol grubuna (3-8 sıçan/grup) sahip olmuştur. Aktif, 5, 10, 25, 50, 75, 100 veya 30

150 mg/kg miktarda test edilmiştir. Minosiklin, 25, 50, 75 veya 100 mg/kg miktarda test edilmiştir ve doksisisiklin, 75 ve 100 mg/kg miktarda test edilmiştir. Karejnan enjeksiyonunda hemen sonra ve enjeksiyondan 3 saat sonra, arka ayak pençesi hacmi, bir dijital su Pletismometre ile ölçülmüştür. Sonuçlar, 3 saat boyunca pençe hacminde bir değişim yüzdesi olarak hesaplanmıştır. Temel pençe hacmi ile bölünmüştür ve tedavi edilmemiş kontrollerde ortalama inflamasyon yüzdesi için ayarlanmıştır ve Tablo 10'da temsil edilmektedir. Aktif, doksisisiklin ve minosiklin, tüm test edilen dozlarda anti-inflamatuvar aktivite sergilemiştir. Aktif, akne vulgarisin tedavisi için yaygın olarak kullanılan diğer ticari olarak mevcut tetrasiklinlerle karşılaştırılabilen inflamasyonun bir standart hayvan modelinde anti-inflamatuvar aktivite sergilemiştir.

Tablo 10: Bir Karajenan ile İndüklenmiş Sığırın Ayak Padi Ödem Modelinde Aktif ile İnflamasyonun Ortalama inhibisyonu

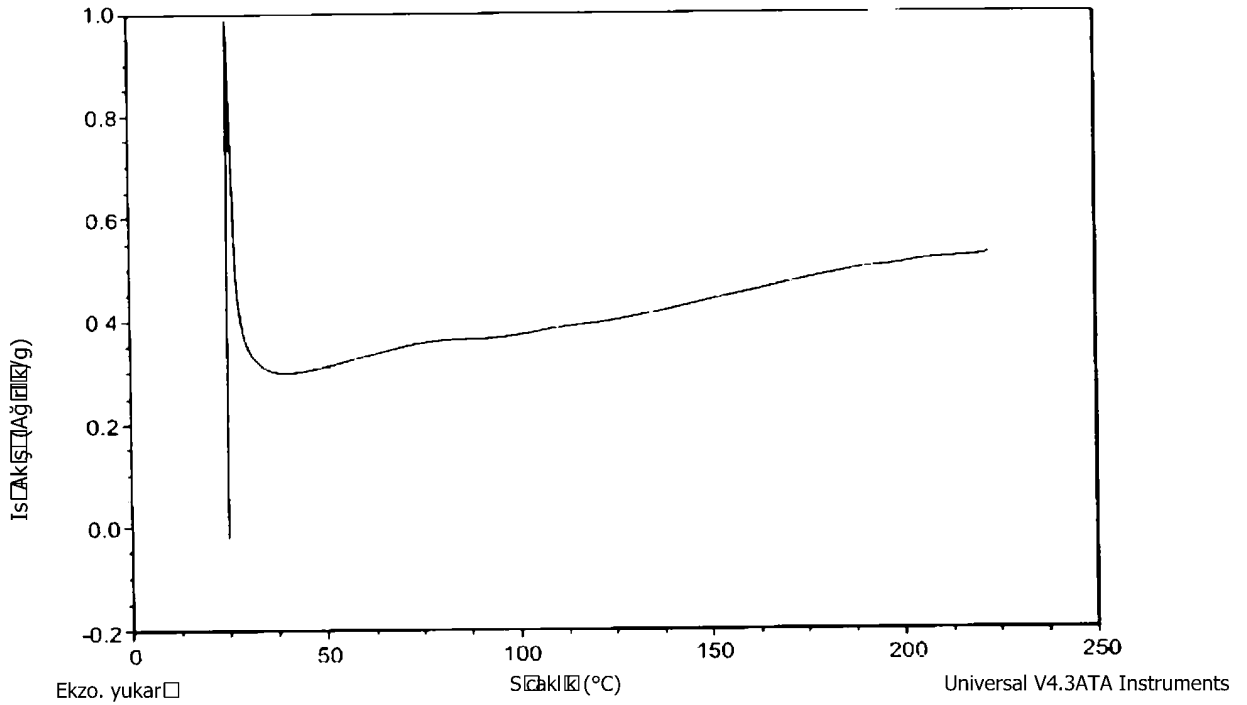
Tedavi Edilmemiş Kontrollerine Karşı Ortalama İnflamasyon Yüzdesi								
Bileşik	150 mg/kg	100 mg/kg	75 mg/kg	50 mg/kg	25 mg/kg	10 mg/kg	5 mg/kg	1 mg/kg
Aktif	26	53	56	52	59	65	78	103
Doksisisiklin	--	36	68	--	--	--	--	--
Minosiklin	--	21	54	33	47	--	--	--

Burada tarif edilen tercih edilen yapılandırmaların sayısal değişimi, modifikasyonu ve varyasyonu, teknikte tecrübe sahibi kişiler tarafından anlaşılacaktır ve ekteki istemlere göre belirtildiği gibi talep edilen buluşun kapsamı içerisinde kalmaları öngörülmektedir ve kalmaları tasarlanmaktadır. Örneğin spesifik yapılandırmalar kapsamlı olarak açıklanmasında rağmen, teknikte tecrübe sahibi kişiler, önceki yapılandırmalar ve varyasyonları, ikamenin, ekin veya alternatif malzemelerin çeşitli tiplerini içerecek şekilde modifiye edilebildiğini anlayacaktır. Dolayısıyla, mevcut buluşun sadece birkaç varyasyonu burada açıklanmasında rağmen, bu ek modifikasyonları ve varyasyonları uygulamasında ve bunların eşdeğerlerinin, aşağıdaki istemlere göre belirlenen buluşun kapsamı içerisinde olduğu anlaşılacaktır.

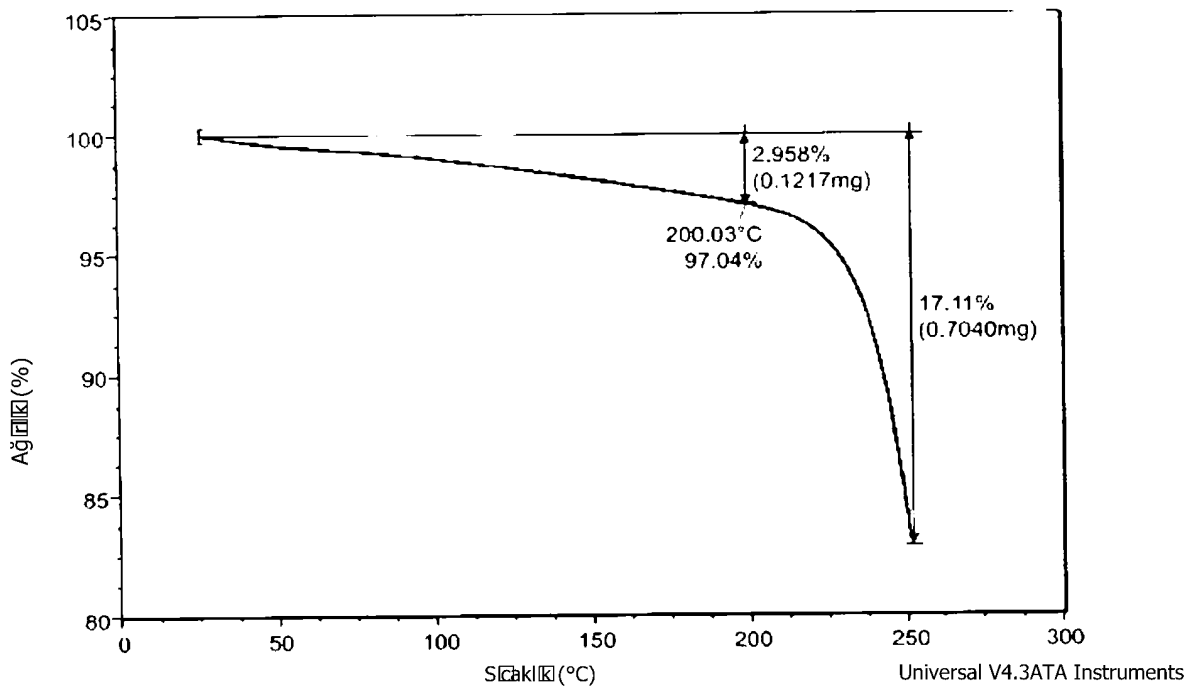


Daha açığolan çizgi, 0. günde sentezden ve izolasyondan sonra XRPD analizidir.
Daha koyu olan çizgi, depolanmadan sonra XRPD analizidir.

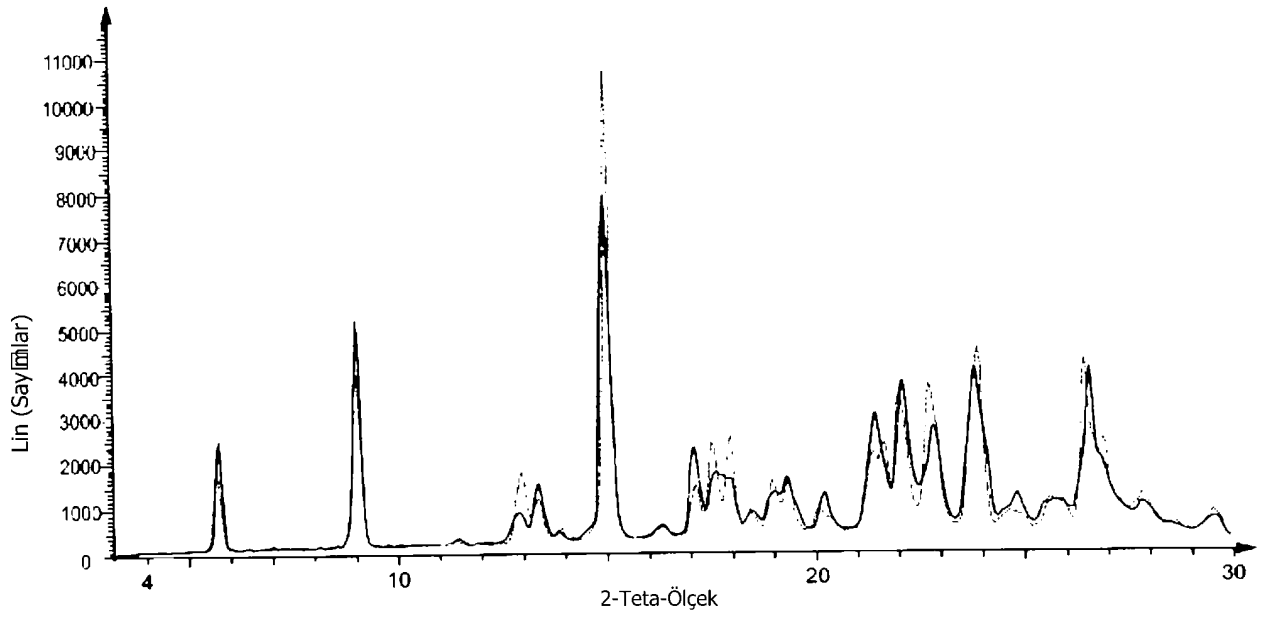
ŞEKİL 1



ŞEKİL 2

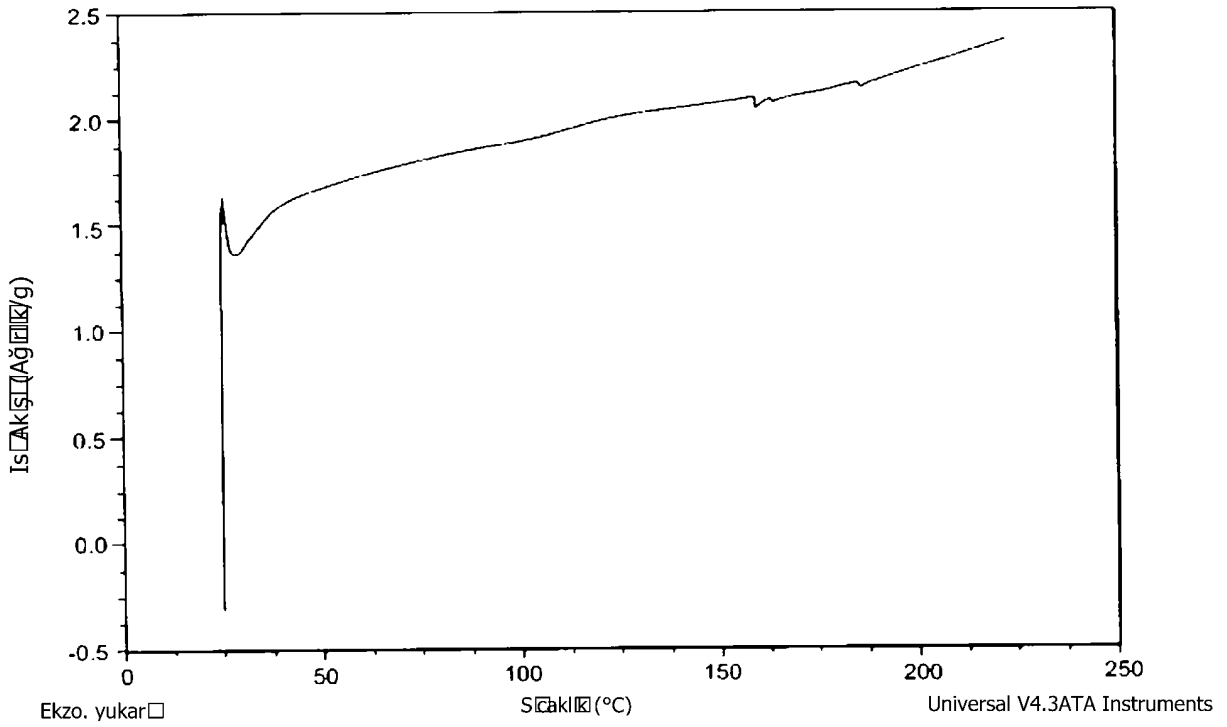


ŞEKİL 3



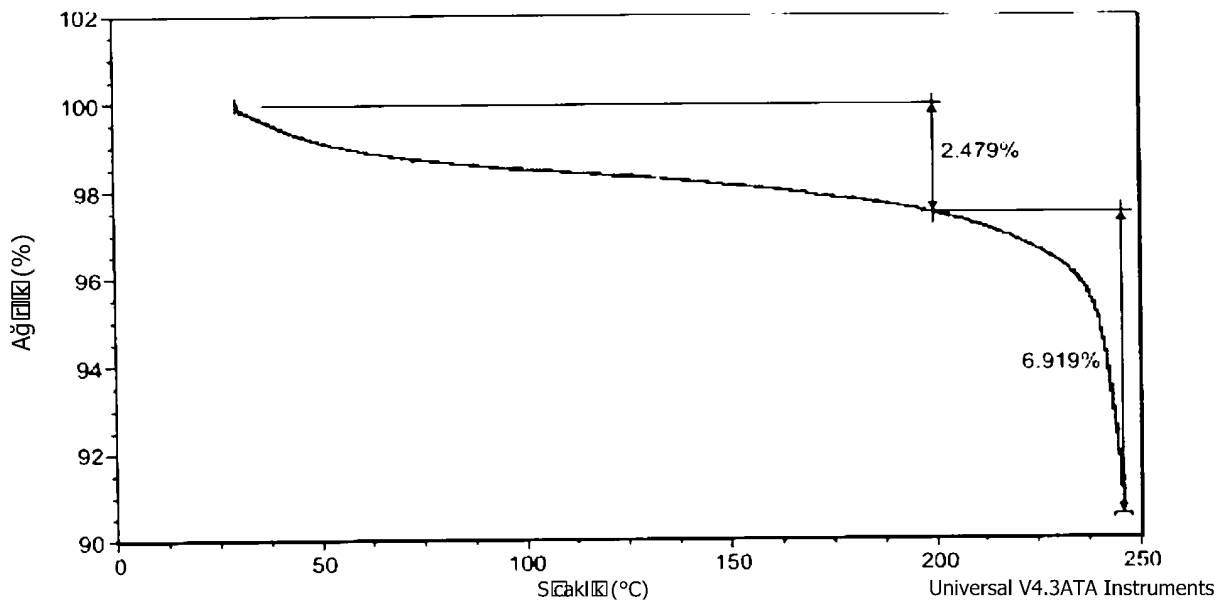
Daha açığı olan çizgi, 0. günde sentezden ve izolasyondan sonra XRPD analizidir.
Daha koyu olan çizgi, depolanmadan sonra XRPD analizidir.

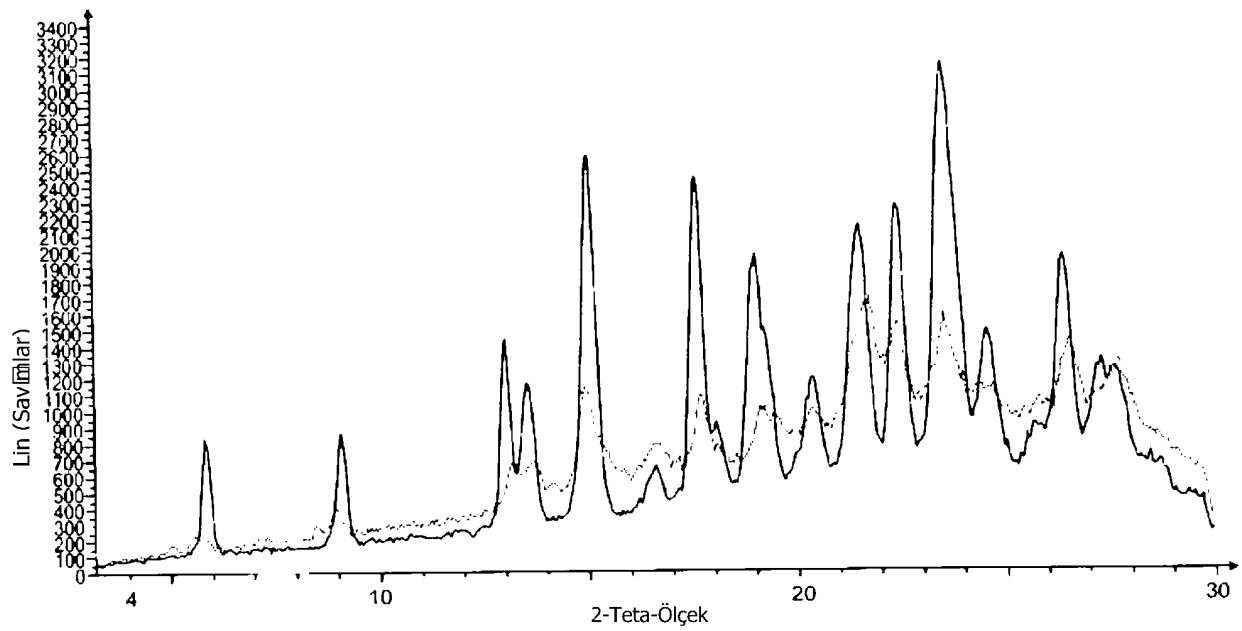
ŞEKİL 4



ŞEKİL 5

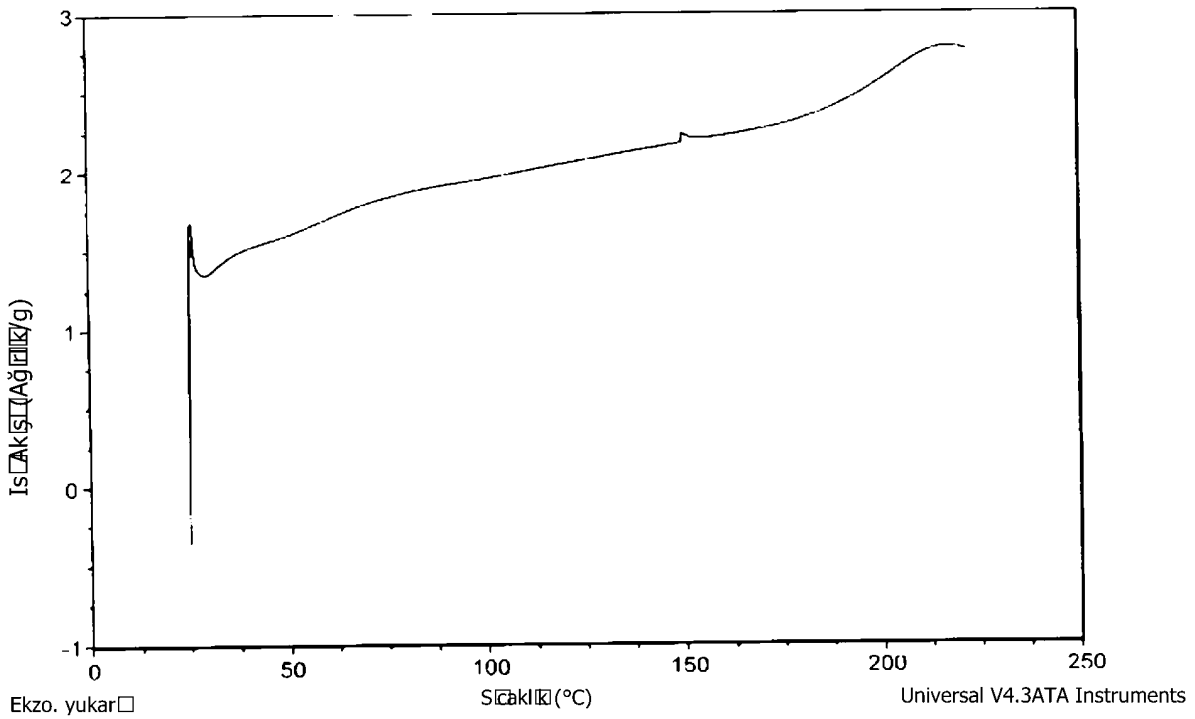
ŞEKİL 6



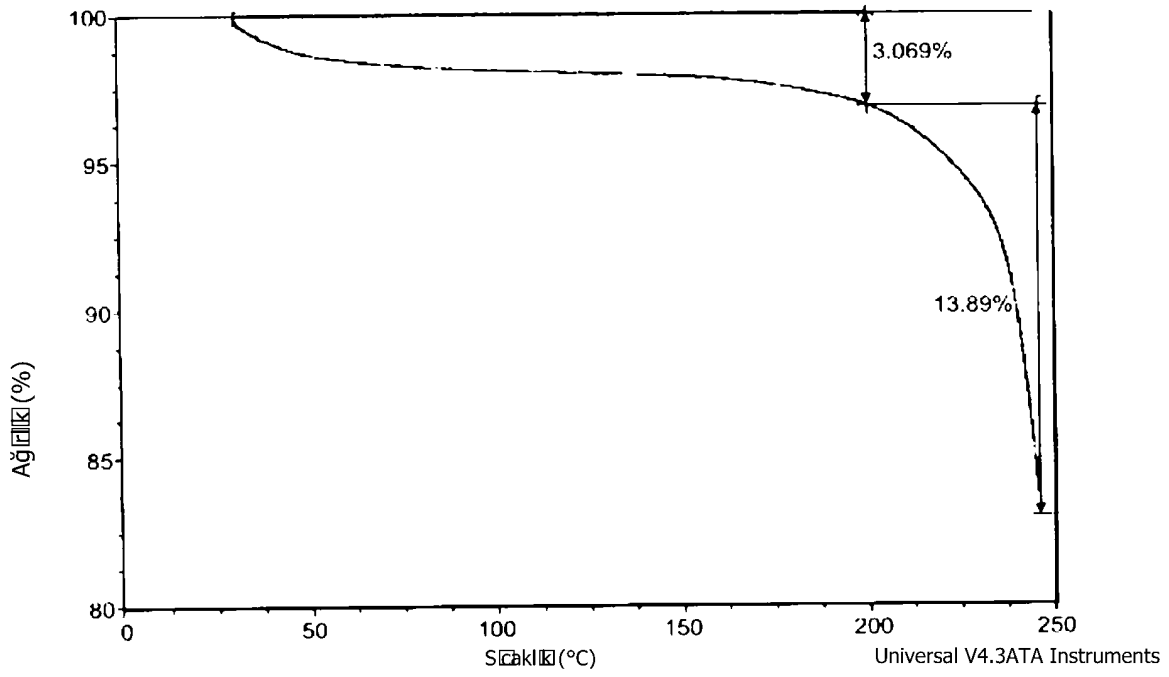


Daha açık olan çizgi, 0. günde sentezden ve izolasyondan sonra XRPD analizidir.
Daha koyu olan çizgi, depolanmadan sonra XRPD analizidir.

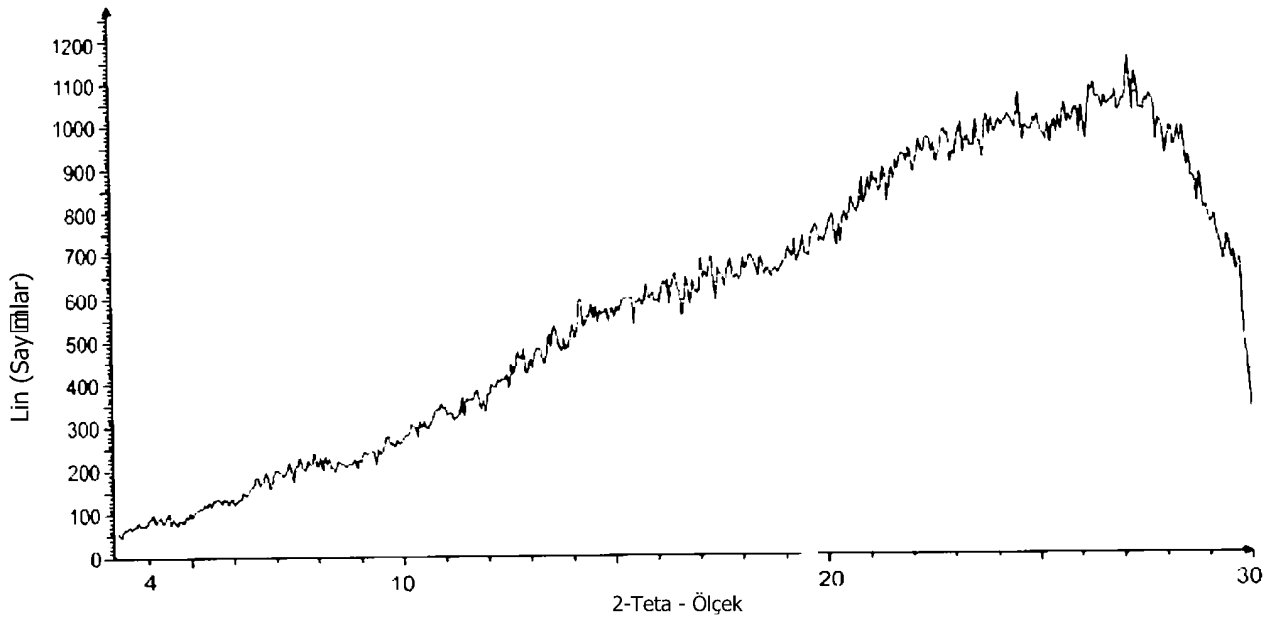
ŞEKİL 7



ŞEKİL 8

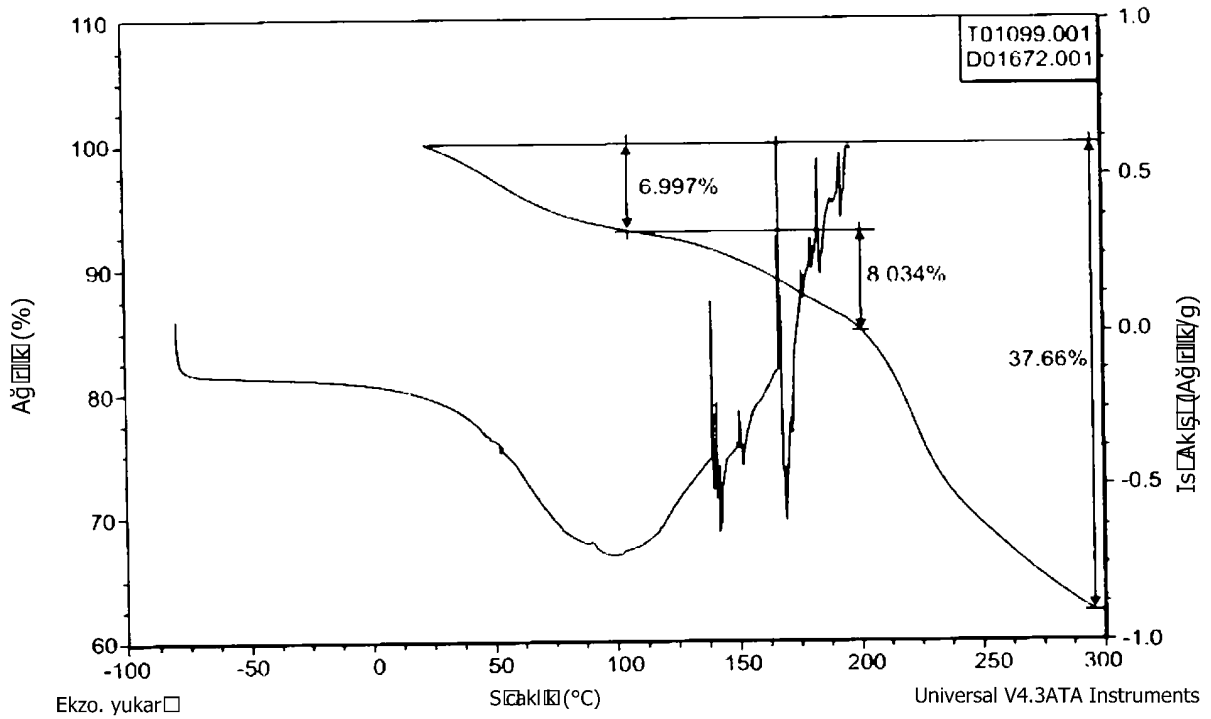


ŞEKİL 9



G00043-File: G00043_01 raw-2-Theta: 3.200 °

ŞEKİL 10



ŞEKİL 11