

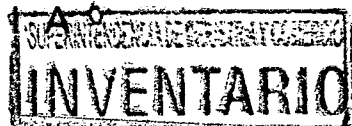
OF



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

PCT



Delegatura de Propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

10-160851

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION



21. EXPEDIENTE No.

54. TÍTULO

SALES Y POLIMORFOS DE UN COMPUESTO DE TETRACICLINA

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL

71. SOLICITANTE

PARATEK PHARMACEUTICALS, INC.

DOMICILIO

BOSTON, MASSACHUSSETS, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

74. APODERADO

LUZ CLEMENCIA DE PAEZ

C.C. 35.456.344 de Usaquén

22. BOGOTÁ, D. C.,

ritale, Paez, C.
23-12-2010



PETITORIO

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-160851- -00000-0000

Fecha: 2010-12-22 12:14:16 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 170

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

SOLICITUD DE:

- 1

☒ Patente de Invención.

☒ Capítulo I.
- ☐ Patente de Modelo de Utilidad.

☐ Capítulo II.

2

SOLICITANTE
(71)

Nombre: **PARATEK PHARMACEUTICALS, INC.**
sociedad constituida y existente bajo las leyes del Estado de Massachussets, Estados Unidos de América.

Dirección: 75 Kneeland Street, Boston, Massachussets 02111, Estados Unidos de América

Domicilio: Boston, Massachussets, Estados Unidos de América

IDENTIFICACIÓN

C.C.

☐

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual

Número

3

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: LUZ CLEMENCIA DE PÁEZ
Dirección: Carrera 4ª. No. 72-35
Teléfono: 347 36 11
Fax: 211 86 50
E-mail: clientes@cavelier.com
Domicilio: Bogotá, Colombia.

IDENTIFICACIÓN

C.C.

☒

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual

Número

35.456.344

T.P

23.555

4

INVENTOR (ES)
(72)

1. Raymond CVETOVICH
4 Beacon Way, Apartment #1408, Jersey City, New Jersey 07304, Estados Unidos de América

2. Tadeusz WARCHOL
177 South Street, Northborough, Massachussets 01532, Estados Unidos de América

5

PCT (86)
Solicitud Internacional No. PCT/US2009/045143 Fecha: 26 de mayo de 2009
Publicación Internacional No. WO 2009/143509 A1 Fecha: 26 de noviembre de 2009

6

Título (54)

SALES Y POLIMORFOS DE UN COMPUESTO DE TETRACICLINA (61/514)

7

Clasificación Internacional (51) A01N 037/018

8	Prioridad SI ☒ NO ☐	(33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
		<u>US</u>	<u>23 de mayo de 2008</u>	<u>61/128,712</u>

9

Comprobante de pago No.: 10-104,176 Fecha: 7 de diciembre de 2010
Comprobante de pago No.: 10-104,274 Fecha: 7 de diciembre de 2010
Comprobante de pago No.: 10-107,365 Fecha: 16 de diciembre de 2010
Comprobante de pago No.: 10-107,366 Fecha: 16 de diciembre de 2010
Comprobante de pago No.: 10-108,528 Fecha: 20 de diciembre de 2010

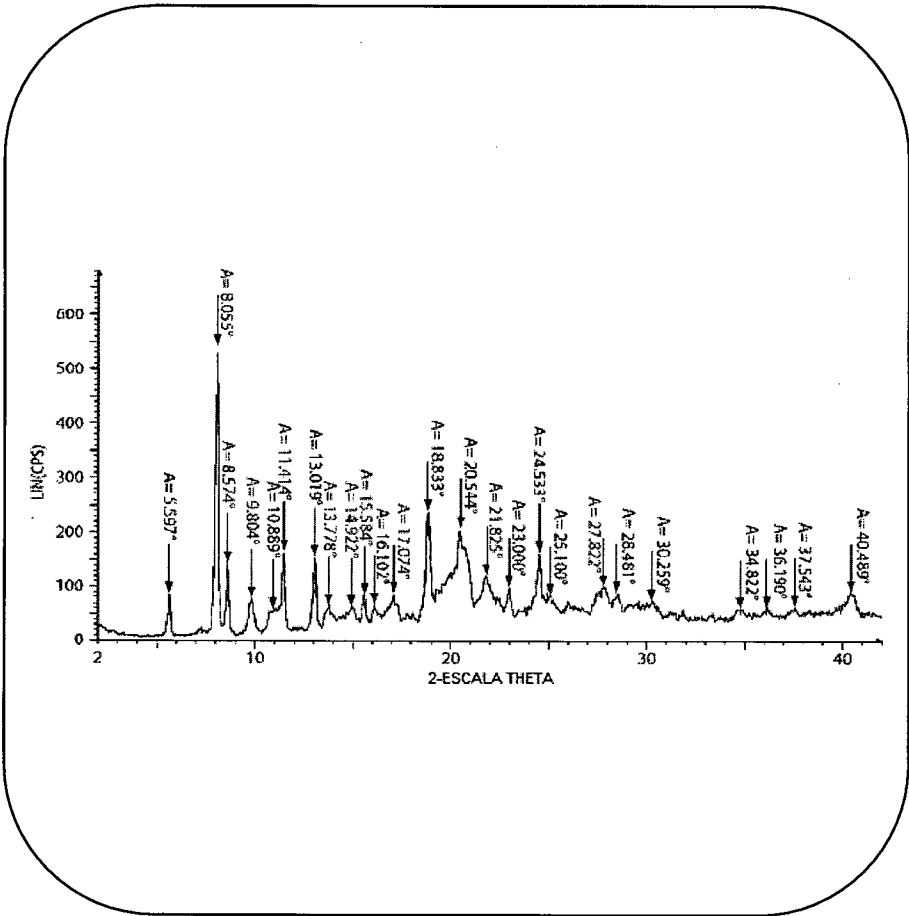
10

Anexos:

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud por \$ 554.000.oo.
- ☒ Comprobante de pago por 19 reivindicaciones adicionales después de la décima reivindicación por \$494.000.oo.
- ☐ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☐ Poderes, si fuere el caso.
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones.
- ☒ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ Traducción del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- ☒ Arte final 12x12
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☒ Otros: VER HOJA DE DOCUMENTOS ANEXOS

11

FIGURA CARACTERÍSTICA



12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: LUZ CLEMENCIA DE PÁEZ

FIRMA: Luz Clemencia Górriz
C.C. 35.456.344 de Usaquén T.P. 23.555

DOCUMENTOS ANEXOS

1. ☒ Publicación Internacional WO 2009/143509 A1

Descripción:

Páginas 48 en el idioma original

Páginas 81 en español

Reivindicaciones: Número (s) 29

Figuras: Número (s) 10

2. ☒ **Forma PCT/ISA/210.** Informe de Búsqueda Internacional.

3. ☒ Extracto de publicación.

**NO SE REALIZARON MODIFICACIONES EN LA
FASE INTERNACIONAL**

4

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
26 November 2009 (26.11.2009)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2009/143509 A1

- (51) International Patent Classification:
A01N 37/18 (2006.01)
- (21) International Application Number:
PCT/US2009/045143
- (22) International Filing Date:
26 May 2009 (26.05.2009)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
61/128,712 23 May 2008 (23.05.2008) US
- (63) Related by continuation (CON) or continuation-in-part (CIP) to earlier application:
US 61/128,712 (CIP)
Filed on 23 May 2008 (23.05.2008)
- (71) Applicant (for all designated States except US):
PARATEK PHARMACEUTICALS, INC. [US/US]; 75 Kneeland Street, Boston, MA 02111 (US).
- (72) Inventors; and
- (75) Inventors/Applicants (for US only): CVETOVICH, Raymond [US/US]; 4 Beacon Way, Apartment #1408, Jersey City, NJ 07304 (US). WARCHOL, Tadeusz [US/US]; 177 South Street, Northborough, MA 01532 (US).

(74) Agents: ELRIFI, Ivor, R. et al.; Mintz, Levin, Cohn, Ferris, Glovsky and Popeo PC, One Financial Center, Boston, MA 02111 (US).

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

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:
— with international search report (Art. 21(3))

(54) Title: SALTS AND POLYMORPHS OF A TETRACYCLINE COMPOUND

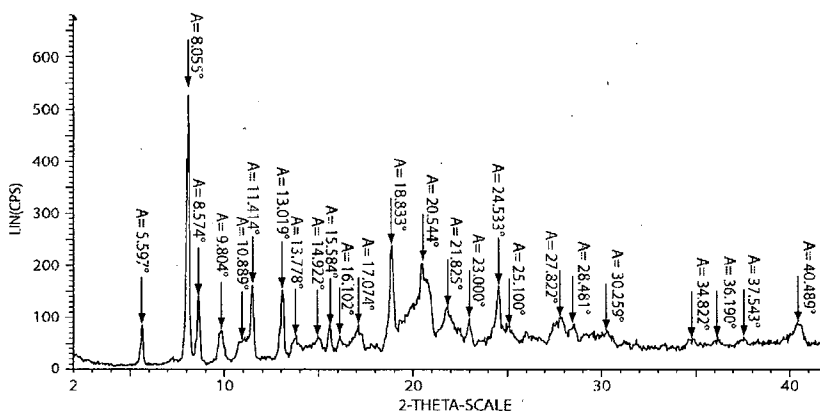


Fig. 8

(57) Abstract: Crystalline forms, including salts and polymorphs, of a compound useful in the treatment of tetracycline compound-responsive states are provided herein. The crystalline compounds are useful for the treatment or prevention of conditions and disorders such as bacterial infections and neoplasms, as well as other known applications for tetracycline compounds in general.

WO 2009/143509 A1

SALTS AND POLYMORPHS OF A TETRACYCLINE COMPOUND

Related Application

[0001] This application claims the benefit of priority under 35 U.S.C. 119(e) to pending U.S. Provisional Application No. 61/128,712, filed on May 23, 2008, the entire contents of which are incorporated herein by reference.

Background of the Invention

[0002] The development of the tetracycline antibiotics was the direct result of a systematic screening of soil specimens collected from many parts of the world for evidence of microorganisms capable of producing bactericidal and/or bacteriostatic compositions. The first of these novel compounds was introduced in 1948 under the name chlortetracycline. Two years later, oxytetracycline became available. The elucidation of the chemical structure of these compounds confirmed their similarity and furnished the analytical basis for the production of a third member of this group in 1952, tetracycline. A new family of tetracycline compounds, without the ring-attached methyl group present in earlier tetracyclines, was prepared in 1957 and became publicly available in 1967; and minocycline was in use by 1972.

[0003] Recently, research efforts have focused on developing new tetracycline antibiotic compositions effective under varying therapeutic conditions and routes of administration. New tetracycline analogues have also been investigated which may prove to be equal to or more effective than the originally introduced tetracycline compounds. Examples include U.S. Patent Nos. 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; and 4,126,680. These patents are representative of the range of pharmaceutically active tetracycline and tetracycline analogue compositions.

[0004] Historically, soon after their initial development and introduction, the tetracyclines were found to be highly effective pharmacologically against rickettsiae; a number of gram-positive and gram-negative bacteria; and the agents responsible for lymphogranuloma venereum, inclusion conjunctivitis, and psittacosis. Hence, tetracyclines became known as "broad spectrum" antibiotics. With the subsequent establishment of their in vitro antimicrobial activity, effectiveness in experimental infections, and pharmacological properties, the tetracyclines as a class rapidly became widely used for therapeutic purposes. However, this widespread use of tetracyclines for both major and minor illnesses and

6

diseases led directly to the emergence of resistance to these antibiotics even among highly susceptible bacterial species both commensal and pathogenic (*e.g.*, pneumococci and *Salmonella*). The rise of tetracycline-resistant organisms has resulted in a general decline in use of tetracyclines and tetracycline analogue compositions as the antibiotic of choice.

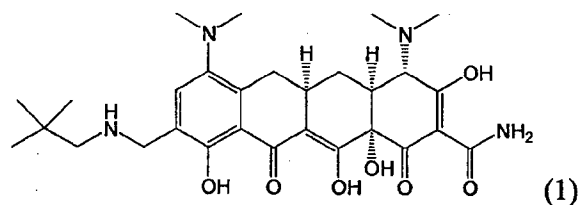
[0005] Each pharmaceutical compound has an optimal therapeutic blood concentration and a lethal concentration. The bioavailability of the compound determines the dosage strength in the drug formulation necessary to obtain the ideal blood level. If the drug can crystallize as two or more polymorphs differing in bioavailability, the optimal dose will depend on the polymorph present in the formulation. Some drugs show a narrow margin between therapeutic and lethal concentrations. Chloramphenicol-3-palmitate (CAPP), for example, is a broad-spectrum antibiotic known to crystallize in at least three polymorphic forms and one amorphous form. The most stable form, A, is marketed. The difference in bioactivity between this polymorph and another form, B, is a factor of eight, thus creating the possibility of fatal overdosages of the compound if unwittingly administered as form B due to alterations during processing and/or storage. Therefore, regulatory agencies, such as the United States Food and Drug Administration, have begun to place tight controls on the polymorphic content of the active component in solid dosage forms. In general, for drugs that exist in polymorphic forms, if anything other than the pure, thermodynamically preferred polymorph is to be marketed, the regulatory agency may require batch-by-batch monitoring. Thus, it becomes important for both medical and commercial reasons to produce and market the pure drug in its most thermodynamically stable polymorph, substantially free of other kinetically favored polymorphs.

[0006] For instance, salt forms of a compound, and polymorphic forms of the free compound or salt, are known in the pharmaceutical art to affect, for example, the solubility, dissolution rate, bioavailability, chemical and physical stability, flowability, fractability, and compressibility of the compound as well as the safety and efficacy of drug products based on the compound (see, *e.g.*, Knapman, *Modern Drug Discovery*, 2000, 3(2): 53).

[0007] Accordingly, identification of a salt form or free base of a compound with optimal physical and chemical properties will advance the development of tetracycline compounds as pharmaceuticals. The most useful of such physical and chemical properties include: easy and reproducible preparation, crystallinity, non-hygroscopicity, aqueous solubility, stability to visible and ultraviolet light, low rate of degradation under accelerated stability conditions of temperature and humidity, low rate of isomerization between isomeric forms, and safety for long-term administration to humans.

Summary of the Invention

[0008] In one embodiment, the invention pertains, at least in part, to a stable solid state form, such as a crystalline form, of the aminoalkyl tetracycline compound, Compound 1:



(4S,4AS,5AR,12AS)-4-7-Bis(dimethylamino)-9{[(2,2-dimethylpropyl)amino]methyl}-3,10,12,12A-tetrahydroxy-1,11-dioxo-1,4,4A,5,5A,6,11,12A-octahydrotetracene-2-carboxamide
(9-(2,2-dimethyl-propyl-aminomethyl)-minocycline).

[0009] In another embodiment, the invention pertains, at least in part, to an HCl salt of Compound 1. In another embodiment, the invention pertains, at least in part, to a tosylate (p-toluenesulfonate) salt of Compound 1. In another embodiment, the invention pertains, at least in part, to a mesylate salt of Compound 1

[00010] In another embodiment, the invention pertains, at least in part, to a stable crystalline form of Compound 1.

[00011] In another embodiment, the invention pertains, at least in part, to a stable crystalline form of a salt of Compound 1. For example, the stable crystalline form of a salt is a stable crystalline form of a tosylate, HCl or mesylate salt of Compound 1.

[00012] In another embodiment, the invention pertains, at least in part, to a polymorph of Compound 1.

[00013] In another embodiment, the invention pertains, at least in part, to a polymorph of a salt of Compound 1.

[00014] For example, the invention relates to a polymorph of a tosylate salt of Compound 1. The invention relates, in part to a form 1 polymorph of Compound 1. The invention relates, in part to a form 2 polymorph of Compound 1. The invention relates, in part to a form 3 polymorph of Compound 1.

[00015] For example, a form 1 polymorph of a tosylate salt of Compound 1 has X-ray powder diffraction peaks at approximately 8.06, 13.02, and 18.83 °2θ using Cu Kα radiation. In some embodiments, the form 1 polymorph of a tosylate salt of Compound 1 has X-ray powder diffraction peaks at approximately 8.06, 11.41, 13.02, 18.83, 20.54, and 24.53 °2θ

using Cu K α radiation. In some embodiments, the form 1 polymorph of a tosylate salt of Compound 1 has X-ray powder diffraction peaks at approximately 5.60, 8.06, 8.57, 11.41, 13.02, 15.58, 18.83, 20.54, and 24.53 $^{\circ}2\theta$ using Cu K α radiation.

[00016] For example, a form 1 polymorph of a tosylate salt of Compound 1 is stable at temperature in a range from about 0 $^{\circ}\text{C}$ to about 70 $^{\circ}\text{C}$. In some embodiments, the form 1 polymorph of a tosylate salt of Compound 1 is stable at temperature in a range from about 5 $^{\circ}\text{C}$ to about 50 $^{\circ}\text{C}$. In some embodiments, the form 1 polymorph of a tosylate salt of Compound 1 is stable at temperature in a range from about 20 $^{\circ}\text{C}$ to about 30 $^{\circ}\text{C}$.

[00017] The form 1 polymorph of a tosylate salt of Compound 1 can be obtained by crystallizing the tosylate salt of said Compound 1 from isopropanol.

[00018] For example, a form 2 polymorph of a tosylate salt of Compound 1 has X-ray powder diffraction pattern peaks at 7.82, 11.88, 16.12 and 21.46 $^{\circ}2\theta$ using Cu K α radiation.

[00019] For example, a form 3 polymorph of a tosylate salt of Compound 1 has X-ray powder diffraction pattern peaks at 5.11, 8.89, 10.34, 11.76 and 15.60 $^{\circ}2\theta$ using Cu K α radiation.

[00020] In yet another embodiment, the invention includes pharmaceutical compositions comprising a crystalline form of Compound 1 and a pharmaceutically acceptable diluent, excipient or carrier.

[00021] For example, the pharmaceutical composition of the invention includes a composition comprising a polymorph of Compound 1 and a pharmaceutically acceptable diluent, excipient or carrier.

[00022] In another embodiment, the pharmaceutical composition of the invention includes a salt of Compound 1 and a pharmaceutically acceptable diluent, excipient or carrier. For example, the salt can be an HCl salt, a tosylate salt, or a mesylate salt.

[00023] In one embodiment, the pharmaceutical composition of the invention includes a polymorph of a salt of Compound 1 and a pharmaceutically acceptable diluent, excipient or carrier. For example, the polymorph can be a polymorph of tosylate salt, HCl salt, or mesylate salt of Compound 1.

[00024] In some embodiments, the pharmaceutical composition comprises a polymorph of Compound 1, or salt thereof in a pure form.

[00025] In another embodiment, the pharmaceutical composition of the invention includes a polymorph of the tosylate salt of Compound 1 and a pharmaceutically acceptable

9

diluent, excipient or carrier. For example, the polymorph can be a form 1, a form 2, or a form 3 polymorph of tosylate salt of Compound 1.

[00024] In some embodiments, the pharmaceutical composition comprises a polymorph of tosylate salt, HCl salt, or mesylate salt of Compound 1 in a pure form.

[00025] In another aspect of the invention, the salt of Compound 1 is more stable than the free base of Compound 1.

[00026] In another embodiment, the invention includes a method for preparing a stable crystalline form of Compound 1.

[00027] In another embodiment, the invention includes a method for preparing a stable crystalline form of a salt of Compound 1. For example, the stable crystalline can be a crystalline of a tosylate, HCl, or mesylate salt of Compound 1.

[00028] In another embodiment, the invention includes a method for preparing a polymorph of a salt of Compound 1. For example, the polymorph can be a polymorph of a tosylate, HCl, or mesylate salt of Compound 1.

[00031] In another embodiment, the invention includes a method for preparing a polymorph of a tosylate salt of Compound 1. For example, the polymorph can be a form 1, a form 2, or a form 3 polymorph of a tosylate salt of Compound 1.

[00032] In one embodiment, the invention includes a method for preparing a form 1 of polymorph of a tosylate salt of Compound 1, wherein the method comprises: combining Compound 1 with a solvent to produce a slurry; and adding p-toluenesulfonic acid. For example, the solvent can be an alcoholic solvent, such as isopropanol. The p-toluenesulfonic acid is provided in an amount of from 25 to 75 wt % relative to the amount of said Compound 1, for example, from 25 to 50 wt%, from 30 to 40 wt%, or 33 wt % relative to the amount of said Compound 1. For example, the p-toluenesulfonic acid is provided in a form of p-toluenesulfonic acid monohydrate

[00033] For example, the slurry is warmed prior to the addition of p-toluenesulfonic acid.

[00034] For example, the slurry is stirred after the addition of p-toluenesulfonic acid. For example, the stirring is conducted at a temperature in a range from 20 to 25 °C. For example, the stirring is conducted for 10 to 24 hours.

[00035] For example, the slurry is dried. For example, the water content of the supernatant of said slurry is in a range from 0.2 to 1.0 mg/mL, or in a range from 0.4 to 0.8 mg/mL.

[00034] In yet another embodiment, the invention includes a method for preparing a form 1 polymorph of a tosylate salt of Compound 1, wherein the method comprises: preparing a solution of Compound 1 in a solvent or a combination of solvents; and adding a solution of p-toluenesulfonic acid in a solvent or a combination of solvents.

[00036] For example, the solvent is an alcoholic solvent, such as methanol, ethanol, or isopropanol. For example, the combination of solvents includes an alcoholic solvent. For example, the combination of solvents further comprises a second alcoholic solvent. For example, the combination of solvents includes ethanol and isopropanol. For example, the combination of solvents further includes an anti-solvent, such as ketone, ether, and ester. For example, the ether includes, but is not limited to, methyl-t-butyl ether. For example, the combination of solvents includes an alcoholic solvent and an anti-solvent. For example, the combination of solvents includes methanol and methyl-t-butyl ether.

[00037] For example, p-toluenesulfonic acid is provided in an amount of from 25 to 75 wt %, from 30 to 50 wt%, from 35 to 45 wt%, or 40 wt % relative to the amount of said Compound 1. For example, p-toluenesulfonic acid is provided in a form of a p-toluenesulfonic acid monohydrate.

[00038] For example, the solution is prepared at a temperature in a range from 0 to 60 °C, at a temperature in a range from 15 to 45 °C, or at a temperature in a range from 20 to 25 °C.

[00039] For example, the solution is warmed after it is prepared. For example, the solution is maintained at a temperature in a range from 20 to 50 °C, or at about 45 °C.

[00040] For example, the method further comprises adding a seed crystal of monotosylate salt of Compound 1 to produce a slurry. The slurry may be stirred for 10 to 24 hours or for about 22 hours. The slurry may be stirred at a temperature in a range from 15 to 45 °C or at about 20 °C. The slurry may be dried. For example, the water content of the slurry is in a range of 1 to 10 wt%, or in a range of 2 to 6 wt%, or about 3 wt%.

[00041] In another embodiment, the invention includes a method for preparing a form 1 polymorph of a tosylate salt of Compound 1, wherein the method comprises: dissolving a freebase of Compound 1 in a first solvent or combination of solvents to form a first solution; dissolving p-toluenesulfonic acid in a second solvent or combination of solvents to form a second solution; and combining said first and second solution to form a third solution.

[00042] In one embodiment, the first and second solvent or combination of solvents can be the same or different. In another embodiment, the solvent can be an alcoholic solvent, such as methanol, ethanol, and isopropanol. In another embodiment, the combination of

solvents is a combination of two alcoholic solvents, including, but not limited to ethanol and isopropanol. In a preferred example, the volume-to-volume ratio of ethanol and isopropanol is 2 to 1. In yet another embodiment, the combination of solvents is a combination includes, but is not limited to, an alcoholic solvent and an anti-solvent (e.g., a ketone, an ether, an ester, *etc.*). For example, the combination of solvents is a combination that includes, but is not limited to, methanol and methyl-t-butyl ether. In a preferred example, the volume-to-volume ratio of methanol and methyl-t-butyl ether is 1 to 1.2.

[00043] In another embodiment, the method further comprises adding a form 1 polymorph tosylate salt of Compound 1 to the third solution to form a fourth solution. For example, the form 1 polymorph tosylate salt is a seed crystal. In some embodiments, the fourth solution forms a slurry upon stirring. The slurry may be washed with a solvent or a combination of solvents, which may be the same or different from the first solvent or combination of solvent, or the second solvent or combination of solvents. The slurry may be dried.

[00044] In another embodiment, the invention relates to a pure composition comprising Compound 1, where in the composition is about 90-100%, preferably 95-100%, more preferably 98-100% (wt./wt.) or 99-100% (wt./wt.) pure; e.g. less than about 10%, less than about 5 %, less than about 2% or less than about 1% impurity is present. Such impurities include, e.g., degradation products, oxidized products, epimers, solvents, and/or other undesirable impurities.

[00045] In yet another embodiment, the invention includes a method for treating a tetracycline responsive state in a subject, by administering to the subject an effective amount of a crystalline form of Compound 1. For example, the subject is a human subject.

[00047] In yet another embodiment, the invention includes a method for treating a tetracycline responsive state in a subject, by administering to the subject an effective amount of a stable salt of Compound 1. For example, the stable salt is a tosylate, an HCl, or a mesylate salt of Compound 1.

[00048] In yet another embodiment, the invention includes a method for treating a tetracycline responsive state in a subject, by administering to the subject an effective amount of a polymorph of Compound 1.

[00049] In yet another embodiment, the invention includes a method for treating a tetracycline responsive state in a subject, by administering to the subject an effective amount of a polymorph of salt of Compound 1. For example, the polymorph can be a polymorph of a tosylate, an HCl, or a mesylate salt of Compound 1.

12

[00050] In yet another embodiment, the invention includes a method for treating a tetracycline responsive state in a subject, by administering to the subject an effective amount of a polymorph of tosylate salt of Compound 1. For example, the polymorph of tosylate can be a form 1, a form 2, or a form 3 polymorph of tosylate salt of Compound 1.

[00051] For example, the tetracycline responsive state is a bacterial infection. The bacterial infection can be associated with gram positive bacteria, or gram negative bacteria. In some embodiments, the bacterial infection is associated with *E. coli*, *S. aureus*, or *E. faecalis*.

[00052] In some embodiments, the bacterial infection is resistant to other tetracycline antibiotics, which include, but are not limited to, tetracycline, minocycline, doxycycline, sancycline, chlortetracycline, demeclocycline, oxytetracycline, chelocardin, rolitetracycline, lymecycline, methacycline, apicycline, clomocycline, pipacycline, mepylcycline, meglucycline, guamecycline, penimocycline, and etamocycline.

Brief Description of the Drawings

FIG. 1 provides an X-ray powder diffraction pattern of a sample comprising crystalline Compound 1 at 25 °C;

FIG. 2 provides an X-ray powder diffraction pattern at 25 °C of the starting material (E00285), form 1 tosylate salt, form 2 tosylate salt, form 3 tosylate salt, and the amorphous tosylate salt form of Compound 1;

FIG. 3 provides a comparison of X-ray powder diffraction patterns at 25 °C for crystalline Compound 1 (E00285) and a sample comprising form 1 tosylate salt, obtained from recrystallization of amorphous tosylate salt of Compound 1 in IPA;

FIG. 4 provides a comparison of X-ray powder diffraction patterns at 25 °C for samples comprising form 1 tosylate salt, form 2 tosylate salt, and form 3 tosylate salt that were dried overnight in a vacuum;

FIG. 5 provides a variable temperature X-ray powder diffraction analysis of samples comprising form 2 tosylate salt;

FIG. 6 provides a variable temperature X-ray powder diffraction analysis of samples comprising form 3 tosylate salt;

FIG. 7 provides a variable temperature X-ray powder diffraction analysis of samples comprising a slurry of a 50:50 mixture of form 1 tosylate salt and form 3 tosylate salt in IPA;

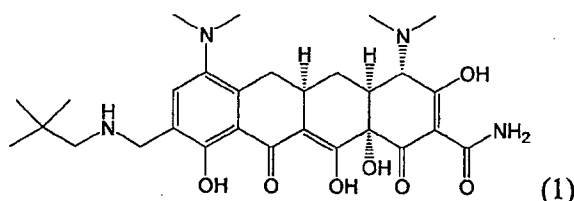
FIG. 8 provides a high resolution X-ray powder diffraction pattern of a sample comprising form 1 tosylate salt of Compound 1;

FIG. 9 provides a high resolution X-ray powder diffraction pattern of a sample comprising form 2 tosylate salt of Compound 1 (93.2% HPLC purity);

FIG. 10 provides a high resolution X-ray powder diffraction pattern of a sample comprising form 3 tosylate salt of Compound 1 (96.7% HPLC purity).

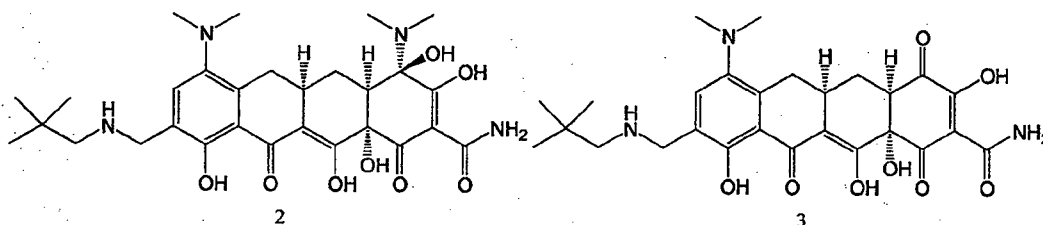
Detailed Description of the Invention

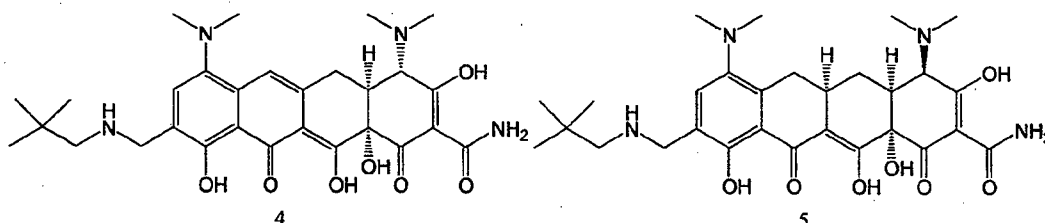
[00053] Tetracycline-type antibiotic compounds have long been known to have limited stability in the solid phase freebase form. One such non-crystalline tetracycline analog compound, (4S,4AS,5AR,12AS)-4-7-Bis(dimethylamino)-9-[(2,2-dimethylpropyl)amino]methyl}-3,10,12,12A-tetrahydroxy-1,11-dioxo-1,4,4A,5,5A,6,11,12A-octahydrotetracene-2-carboxamide (Compound 1; MW = 556.66, MF = C₂₉H₄₀N₄O₇), has limited stability in the solid phase upon exposure to air, light and/or moisture.



(4S,4AS,5AR,12AS)-4-7-Bis(dimethylamino)-9-[(2,2-dimethylpropyl)amino]methyl}-3,10,12,12A-tetrahydroxy-1,11-dioxo-1,4,4A,5,5A,6,11,12A-octahydrotetracene-2-carboxamide.

[00054] Specifically, Compound 1 is a yellow amorphous solid that is unstable at temperatures higher than 0 °C and when exposed to air. Compound 1 must be stored at temperatures below 0 °C with limited exposure in the solid phase to air, light and moisture. Outside of these limited exposure conditions, Compound 1 degrades to produce degradation products including air degradation products 2, 3 and 4, as well as the 4-epi-isomer 5.





[00055] Prior to this disclosure, no stable crystalline forms or stable crystalline acid salts of Compound 1 were known.

[00056] The present invention relates to crystalline Compound 1, salt forms of Compound 1, polymorphic forms of Compound 1 or polymorphic forms of salts of Compound 1; pharmaceutical compositions comprising the crystalline forms, salt forms, polymorphic forms, or polymorphic forms of salts of Compound 1; methods of making the crystalline forms, salt forms, polymorphic forms, or polymorphic forms of salts of Compound 1; and methods of their use for the treatment of tetracycline-responsive states.

1. Solid Form Compounds

[00057] Compound 1 is a tetracycline compound. The term "tetracycline compound" includes many compounds with a similar ring structure to tetracycline. Examples of tetracycline compounds include: tetracycline, chlortetracycline, oxytetracycline, demeclocycline, methacycline, sancycline, doxycycline, and minocycline.

[00058] The free base and certain pharmaceutically acceptable salts of Compound 1 are described in U.S. application Ser. No. 10/786,881, corresponding to U.S. Publication. No. 2005/0026876 A1. There is no teaching or suggestion of crystalline forms of Compound 1, or that any of the described salt forms are superior to the others, as judged by the list of properties described above.

[00059] Thus, the present invention addresses the need for improved tetracycline compounds and the need for improved solid state forms of tetracycline compounds for manufacturing and bioavailability.

[00060] The solid state form of the tetracycline compound, Compound 1, can be a crystalline form. The crystalline form of the compound can be a free base. Crystalline forms of different salts of the free base compound can be formed. Examples of acids which can be used to convert the free base to a salt include, but are not limited to, HCl, p-toluenesulfonic acid, trifluoroacetic acid, methanesulfonic acid, benzenesulfonic acid, and acetic acid.

[00061] The neutral forms of the compounds may be regenerated by contacting the salt with a base or acid and isolating the parent compound in the conventional manner. The

75

parent form of the compound may differ from the various salt forms in certain physical properties, such as solubility in polar solvents.

[00062] As described herein, a process through which different crystalline forms of Compound 1 can be generated has been developed. More specifically, the inventors have shown that the crystalline form obtained mainly depends on the nature of the solvent used in the process. For the purposes of this description the term "crystalline form" refers to either a polymorphic form or a non-amorphous form, without distinction. "Polymorphic form" refers to an organized structure involving only molecules of the solute and having a characteristic crystalline signature.

[00063] The terms, "polymorphs" and "polymorphic forms" and related terms herein refer to crystalline forms of the same molecule, and different polymorphs may have different physical properties such as, for example, melting temperatures, heats of fusion, solubilities, dissolution rates and/or vibrational spectra as a result of the arrangement or conformation of the molecules in the crystal lattice. The differences in physical properties exhibited by polymorphs affect pharmaceutical parameters such as storage stability, compressibility and density (important in formulation and product manufacturing), and dissolution rates (an important factor in bioavailability). Differences in stability can also result from changes in chemical reactivity (*e.g.*, differential oxidation, such that a dosage form discolors more rapidly when comprised of one polymorph than when comprised of another polymorph) or mechanical property (*e.g.*, tablets crumble on storage as a kinetically favored polymorph converts to thermodynamically more stable polymorph) or both (*e.g.*, tablets of one polymorph are more susceptible to breakdown at high humidity). As a result of solubility/dissolution differences, in the extreme case, some polymorphic transitions may result in lack of potency or, at the other extreme, toxicity. In addition, the physical properties of the crystal may be important in processing, for example, one polymorph might be more likely to form solvates or might be difficult to filter and wash free of impurities (*i.e.*, particle shape and size distribution might be different between polymorphs).

[00064] Polymorphs of a molecule can be obtained by a number of methods, as known in the art. Such methods include, but are not limited to, melt recrystallization, melt cooling, solvent recrystallization, desolvation, rapid evaporation, rapid cooling, slow cooling, vapor diffusion and sublimation.

[00065] Techniques for characterizing polymorphs include, but are not limited to, differential scanning calorimetry (DSC), X-ray powder diffractometry (XRPD), single crystal X-ray diffractometry, vibrational spectroscopy, *e.g.*, IR and Raman spectroscopy, solid state

16

NMR, hot stage optical microscopy, scanning electron microscopy (SEM), electron crystallography and quantitative analysis, particle size analysis (PSA), surface area analysis, solubility studies and dissolution studies.

[00066] The term, "solvate", as used herein, refers to a crystal form of a substance which contains solvent. The term "hydrate" refers to a solvate wherein the solvent is water.

[00067] A desolvated solvate is a crystal form of a substance which can only be made by removing the solvent from a solvate.

[00068] The term, "amorphous form", as used herein, refers to a noncrystalline form of a substance.

[00069] As used herein, the term "pure" means about 90-100%, preferably 95-100%, more preferably 98-100% (wt./wt.) or 99--100% (wt./wt.) pure compound; e.g. less than about 10%, less than about 5 %, less than about 2% or less than about 1% impurity is present. Such impurities include, e.g., degradation products, oxidized products, epimers, solvents, and/or other undesirable impurities.

[00070] As used herein, a compound is "stable" where significant amounts of degradation products are not observed under constant conditions of humidity, light exposure and at temperatures higher than 0 °C over a period of four weeks. A compound is not considered to be stable at a certain condition when degradation impurities appear or an area percentage of existing impurities begins to grow. The amount of degradation growth as a function of time is important in determining compound stability.

[00071] All ranges set forth herein are intended to encompass the indicated endpoints of the range as well as all included values and ranges, including those not specifically set forth.

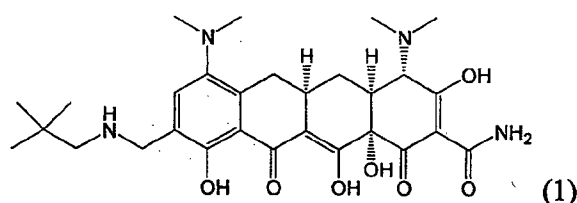
[00072] The present invention is directed to crystalline forms, salt forms and polymorphs of Compound 1; compositions comprising the crystalline forms, salts and polymorphs alone or in combination with other active ingredients; methods of preparing the crystalline, salts and polymorphs; and methods of their use in the modulation of tetracycline compound receptive states. While not intending to be bound by any particular theory of operation, the storage stability, compressibility, density or dissolution properties of the crystalline forms, salts and polymorphs are beneficial for manufacturing, formulation and bio-availability of the tetracycline compound.

[00073] Preferred salts and polymorphs of the invention are those that are characterized by physical properties, e.g., stability, solubility, hygroscopicity and dissolution rate, appropriate for clinical and therapeutic dosage forms. Preferred polymorphs of the

invention are those that are characterized by physical properties, *e.g.*, crystal morphology, compressibility and hardness, suitable for manufacture of a solid dosage form. Such properties can be determined using techniques such as X-ray diffraction, microscopy, IR spectroscopy, thermal analysis and hygroscopicity analysis, as described herein and known in the art.

1.1 Salts of Compound 1

[00074] In one aspect, the present invention provides crystalline forms of particular pharmaceutically acceptable salts of Compound 1. This aspect of the invention provides crystalline forms of HCl, mesylate and tosylate salts of Compound 1:



(4S,4AS,5AR,12AS)-4-7-Bis(dimethylamino)-9{[(2,2-dimethylpropyl)amino]methyl}-3,10,12,12A-tetrahydroxy-1,11-dioxo-1,4,4A,5,5A,6,11,12A-octahydrotetracene-2-carboxamide.

[00075] Each salt of the invention can be made from a preparation of Compound 1. Compound 1 can be synthesized or obtained according to any method apparent to those of skill in the art. In preferred embodiments, Compound 1 is prepared according to the methods described in detail in the examples below. See, *e.g.*, U.S. Publication No. 2005/0026876 A1, the contents of which are hereby incorporated by reference in their entirety.

[00076] Alternatively, Compound 1 can be prepared by isolating a particular salt of Compound 1 and converting such a salt of Compound 1 to the neutral form by treatment with an appropriate base. For example, Compound 1 can be prepared by isolating the hydrochloride salt of Compound 1 by filtration, then converting it to the neutral form by treatment with monobasic sodium carbonate in ethyl acetate, or other suitable base.

[00077] Compound 1 prepared by any method can be contacted with an appropriate acid, either neat (*i.e.*, free from admixture or dilution) or in a suitable inert solvent or solvents, to yield the salt forms of the invention. For example, Compound 1 can be contacted with a *p*-toluenesulfonic acid to yield the tosylate salt forms of the invention.

[00078] Stability studies were performed on the free base Compound 1 and an amorphous diHCl salt of Compound 1. This salt was formed by dissolving the compound in aqueous solution, adjusting the pH of the solution to approximately 4.2, followed by lyophilization. The free base degraded in less than one month at 40 °C, and approximately

178

three months at 4 °C. In contrast, the diHCl salt of Compound 1 was stable for 6 months at 40 °C, and for two years at room temperature (25 °C).

[00079] As shown in detail in the examples below, the tosylate salt of Compound 1, and polymorphs thereof, display desirable properties.

1.2 Polymorphs of Compound 1

[00080] The present invention also provides polymorphs of Compound 1. In certain embodiments, the polymorphs of the invention are polymorphs of the tosylate salt of Compound 1.

[00081] Each polymorph of the invention can be made from a preparation of Compound 1. Solid Compound 1 can be dissolved and then crystallized from the solvent mixtures described below to yield the polymorphic forms of the invention. In particular embodiments of the invention, a tosylate salt of Compound 1 can be dissolved and then crystallized from the solvent mixtures described below to yield certain polymorphic forms of the invention. In some embodiments of the invention, free base of Compound 1 can be dissolved and then acid is added to form a crystalline salt of Compound 1.

[00082] In one embodiment, the present invention provides a polymorph of a tosylate salt of Compound 1.

[00083] In a further embodiment, the invention provides a form 1 polymorph of the tosylate salt of Compound 1, having an X-ray powder diffraction pattern similar to that of FIG. 8, the characteristics of the diffraction pattern all shown in Table 1. For example, a particular form 1 polymorph of the invention has X-ray powder diffraction pattern peaks at 5.60, 8.06, 8.57, 11.41, 13.02, 15.58, 18.83, 20.54 and 24.53 °2θ using Cu Kα radiation. For example, a particular form 1 polymorph of the invention has X-ray powder diffraction pattern peaks at 8.06, 11.41, 13.02, 18.83, 20.54 and 24.53 °2θ using Cu Kα radiation. For example, a particular form 1 polymorph of the invention has X-ray powder diffraction pattern peaks at 8.06, 13.02, 18.83 and 24.53 °2θ. For example, a particular form 1 polymorph of the invention has major X-ray powder diffraction pattern peaks at 8.06 and 18.83 °2θ.

Table 1

Angle (2-Theta °)	d value (Angstrom)	Intensity (Counts)	Intensity (%)
5.60	15.78	347	15.9
8.06	10.97	2184	100.0
8.57	10.30	581	26.6
9.80	9.01	308	14.1
10.89	8.12	233	10.7
11.41	7.75	667	30.5
13.02	6.79	626	28.7
13.78	6.42	261	12.0
14.92	5.93	252	11.5
15.58	5.68	346	15.8
16.10	5.50	262	12.0
17.07	5.19	345	15.8
18.83	4.71	979	44.8
20.54	4.32	838	38.4
21.83	4.07	489	22.4
23.00	3.86	395	18.1
24.53	3.63	661	30.3
25.10	3.55	341	15.6
27.82	3.20	404	18.5
28.48	3.13	357	16.3
30.26	2.95	302	13.8
34.82	2.57	236	10.8
36.19	2.48	254	11.6
37.54	2.39	247	11.3
40.49	2.23	368	16.8

[00084] In another embodiment, the present invention provides form 2 of the tosylate salt of Compound 1. In one embodiment, the form 2 polymorph of the tosylate salt of Compound 1 has an X-ray powder diffraction pattern similar to that of FIG. 9, the characteristics of the diffraction pattern all shown in Table 2. For example, a particular form 2 polymorph of the invention has X-ray powder diffraction pattern peaks at 7.82, 11.88, 12.68, 16.12, 18.63, 21.46 and 23.74 °2 θ using Cu K α radiation. For example, a particular form 2 polymorph of the invention has major X-ray powder diffraction pattern peaks at 7.82,

11.88, 16.12 and 21.46 °2θ. For example, a particular form 2 polymorph of the invention has X-ray powder diffraction pattern peaks at 11.88 and 16.12 °2θ.

Table 2

Angle (2-Theta °)	d value (Angstrom)	Intensity (Counts)	Intensity (%)
5.317	16.62224	135	10.6
6.272	14.09246	275	21.5
6.511	13.57561	274	21.5
7.108	12.43554	137	10.8
7.821	11.30413	827	64.8
9.712	9.10741	173	13.5
10.783	8.20461	340	26.6
11.875	7.4528	1258	98.6
12.682	6.97995	904	70.8
13.182	6.7162	611	47.9
13.985	6.33261	299	23.4
15.578	5.68838	512	40.1
16.122	5.49766	1100	86.2
16.635	5.32915	467	36.6
17.397	5.09763	697	54.7
18.63	4.76275	967	75.8
20.235	4.38856	647	50.7
20.666	4.298	636	49.8
21.456	4.14147	1276	100
22.51	3.9499	747	58.6
23.744	3.7473	1076	84.3
24.448	3.64103	749	58.7
25.651	3.47293	652	51.1
26.303	3.38824	638	50
27.225	3.27554	678	53.2
27.4	3.25505	747	58.5
27.823	3.20648	763	59.8
28.193	3.16532	588	46.1

[00085] In yet another embodiment, the present invention provides form 3 of Compound 1. In further embodiments, the form 3 polymorph of the tosylate salt of Compound 1 has an X-ray powder diffraction pattern similar to that of FIG. 10, the characteristics of the diffraction pattern all shown in Table 3. For example, a particular form 3 polymorph of the invention has X-ray powder diffraction pattern peaks at 5.11, 8.89, 10.34, 11.76, 13.70, 14.81 and 15.60 °2θ using Cu Kα radiation. For example, a particular form 3 polymorph of the invention has major X-ray powder diffraction pattern peaks at 5.11, 8.89, 10.34, 11.76 and 15.60 °2θ. For example, a particular form 3 polymorph of the invention has major X-ray powder diffraction pattern peaks at 5.11 and 15.60 °2θ.

Table 3

Angle (2-Theta °)	d value (Angstrom)	Intensity (Counts)	Intensity (%)
5.11	17.29	1184	66.4
8.89	9.95	475	26.6
10.34	8.56	431	24.2
11.76	7.53	404	22.7
13.70	6.46	524	29.4
14.81	5.98	552	31
15.60	5.68	1783	100
17.23	5.15	661	37.1
17.93	4.95	1014	56.9
18.35	4.83	832	46.6
18.74	4.74	914	51.3
19.00	4.67	874	49
20.15	4.41	889	49.9
20.36	4.36	913	51.2
20.65	4.30	940	52.7
21.65	4.10	681	38.2
22.59	3.94	923	51.8
23.25	3.83	1206	67.7
23.71	3.75	872	48.9
24.94	3.57	718	40.3
25.43	3.50	551	30.9
26.12	3.41	745	41.8
26.64	3.35	709	39.8
27.15	3.28	689	38.7
27.55	3.24	754	42.3

[00086] The tosylate salt of Compound 1 crystallized as very small, irregular particles, typically 5-8 microns in size. FIG. 1 depicts X-ray powder diffraction (XRPD) of a crystalline solid of the tosylate salt of Compound 1. This compound was shown to melt at 190 °C, followed by decomposition.

[00087] Gravimetric vapor sorption was performed on Compound 1 or its tosylate salt. It was determined that there were 2.5 molecules of water per molecule of Compound 1. XRPD was performed to compare the starting material (E00285) with the dehydrated material. The data indicated no change in form.

2. Synthesis of Compound 1

[00088] 9-(aminomethyl)-minocycline dihydrochloride (200 mg, 1 eq.), DMF and trimethylacetaldehyde (45 μ L, 1 eq.) were combined in 40 mL flasks and stirred. Triethylamine (150 μ L, 3 eq.) was then added. After stirring at room temperature for several minutes, $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$ (175 mg, 2 eq.) and InCl_3 (9 mg, 0.1 eq.) was added. After one hour, the reaction was clear and red. Liquid chromatography showed a single product for the reaction. The reaction was quenched with methanol, the solvent was removed, and the product was purified using column chromatography.

Purification

[00089] Compound 1 was purified by chromatography by injecting an aqueous low pH solution of the compound into an HPLC in a polar organic solvent gradient, and combining the product fractions, such that the compound was purified. Selection of suitable acidic mobile phases enhanced process stability and selectivity. Organic and mineral acid mobile phases were effective at separating by-products including epimer impurities and closely-eluting by products through pH control or choice of acid. Acidic mobile phases also protected against oxidative degradation of the compound.

[00090] For example, the low pH solution had a pH of about 2 - 3. Examples of solutions that were used include 0.1% aqueous solutions of methane sulfonic acid and 0.1% aqueous solutions of trifluoroacetic acid. In certain embodiments, an isocratic gradient of 94% of the aqueous solution and 6% acetonitrile or another polar organic solvent were used to purify the compound from epimeric and closely eluting by-products.

[00091] The resulting aqueous product fractions may be combined and the pH may be adjusted to about 4.0 - 4.5 using a base (e.g., NaOH). Hydrophobic impurities and oxidative degradants of the compound may be removed by washing the aqueous solution with a non-

23

polar organic solvent (e.g., CH_2Cl_2). The organic layers were discarded and the aqueous layers were combined and retained.

[00092] It should be noted that the organic solvents, such as methylene chloride, can be used to selectively remove late-eluting hydrophobic impurities such as 4-carbonyl by products and other oxidative degradents from the acidic aqueous solution of the compound.

[00093] The pH of the combined aqueous layers may then be adjusted to neutral pH, e.g., about 7.5 to about 8.5. The pH may be adjusted by the addition of a base, such as NaOH. The neutral solution was then washed with a non-polar organic solvent, such as methylene chloride. It should be noted that selective pH adjustment to neutral pH ranges also allowed the compound to be extracted into the organic solvent while retaining undesired β -epimer and by products in the aqueous phase.

[00094] In addition, antioxidants may also be added to the aqueous solutions of compounds described herein. The anti oxidants may be provided to prevent oxidative degradation of the compounds. Antioxidants such as ammonium sulfites or bisulfites can be used.

3. Methods of Preparing Polymorphic Forms of Compound 1

[00095] The invention also pertains to methods of preparing polymorphic forms of crystalline Compound 1.

[00096] In one embodiment, form 1 of the tosylate salt of Compound 1 can be made by any method of making form 1 apparent to those of skill in the art based upon the teachings herein. In certain embodiments, form 1 can be formed from maturation of the amorphous tosylate salt of Compound 1 in isopropanol, acetone, ethyl acetate, methyl pentanone, toluene or acetonitrile solution. Form 1 can also be obtained from recrystallization of the amorphous tosylate salt slurried in isopropanol. Form 1 can also be obtained by dissolving the freebase in an appropriate solvent or combination of solvents such as two alcohols or an alcohol and an anti-solvent such as a ketone, ether, ester, etc. After addition of the acid, the salt can be crystallized slowly in the correct form.

[00097] Solvent system in which impurities and free base of Compound 1 are soluble while the stable crystalline salt of Compound 1 is insoluble, e.g., crystalline slurry can be formed by precipitation, can be selected.

[00098] In another embodiment, form 2 of the tosylate salt of Compound 1 can be made by any method of making form 2 apparent to those of skill in the art based upon the

24

teachings herein. In certain embodiments, form 2 can be formed from maturation of the amorphous tosylate salt of Compound 1 in dichloromethane.

[00099] In another embodiment, form 3 of the tosylate salt of Compound 1 can be made by any method of making form 3 apparent to those of skill in the art based upon the teachings herein. In certain embodiments, form 3 can be formed from maturation of the amorphous tosylate salt of Compound 1 in methyl ethyl ketone, ethyl acetate or methyl pentanone. Form 3 can also be obtained from maturation of form 1 in methyl pentanone.

[000100] In a further embodiment, the polymorphic forms of tosylate salt of Compound 1 described above may be produced by methods that include steps of combining Compound 1 with a solvent to produce a slurry, and adding p-toluenesulfonic acid.

[000101] Any suitable solvent may be used to create the slurry. Solvents that may be used in embodiments include alcoholic solvents, such as isopropanol. Any suitable combination of solvent may be used to create the solution from which the salt crystallizes. Solvent combinations that may be used in embodiments include, but are not limited to, methanol and methyl-*t*-butyl ether or ethanol and isopropanol.

[000102] For example, a slurry of Compound 1 in a solvent or a combination of solvents may be produced at a temperature from about 0 °C to about 60 °C, such as from about 15 °C to about 45 °C, or from about 20 °C to about 25 °C. After it is produced, the slurry may optionally be warmed and/or maintained at a temperature from about 15 °C to about 60 °C, such as from about 20 °C to about 50 °C, or about 45 °C.

[000103] Once the slurry is created, the p-toluenesulfonic acid may be added in an amount sufficient to produce a p-toluenesulfonic acid salt of Compound 1. In one embodiment, the p-toluenesulfonic acid is provided in an amount from about 25 to about 75 wt%, from about 25 to about 50 wt%, from about 30 to about 40 wt%, or about 33 wt% relative to the amount of Compound 1. The p-toluenesulfonic acid may be added in the form of a p-toluenesulfonic acid monohydrate.

[000104] Polymorphic forms of the tosylate salt of Compound 1 can be formed by a solution method. For example, a solution of Compound 1 may be produced at a temperature from about 0 °C to about 60 °C, such as from about 15 °C to about 45 °C, or from about 20 °C to about 25 °C. After it is produced, the solution may optionally be warmed and/or maintained at a temperature from about 15 °C to about 60 °C, such as from about 20 °C to about 50 °C, or about 45 °C.

[000105] Once the solution is created, the p-toluenesulfonic acid may be added in an amount sufficient to produce a p-toluenesulfonic acid salt of Compound 1. In one

embodiment, the p-toluenesulfonic acid is provided in an amount from about 25 to about 75 wt%, from about 30 to about 50 wt%, from about 35 to about 45 wt%, or about 40 wt% relative to the amount of Compound 1. The p-toluenesulfonic acid may be added in the form of a p-toluenesulfonic acid monohydrate.

[000106] In one embodiment, form 1 polymorph used to seed the solution may be added. Any suitable solvent may be used to form the p-toluenesulfonic acid solution. Suitable solvents include alcoholic solvents, such as isopropanol or solvent combinations such as methanol and methyl-*t*-butyl ether. In a preferred embodiment, the vol./vol. ratio of methanol to methyl-*t*-butyl ether is 1:1.2. Suitable solvents include a combination of two or more alcoholic solvents, such as a combination of ethanol and isopropanol. In a preferred embodiment, the vol./vol. ratio of ethanol to isopropanol is 2:1. In particular embodiments, the p-toluenesulfonic acid solution includes the same solvent used to create the slurry or the solution of Compound 1.

[000107] After addition of p-toluenesulfonic acid in the appropriate solvent, a slurry of the form 1 polymorph of the tosylate salt of Compound is formed. The water content of the supernatant of the slurry may be adjusted to a suitable level following the addition of the p-toluenesulfonic acid. Typically, the water content of the slurry supernatant may be in a range from about 0.2 to about 1.0 mg/mL, such as from about 0.4 to about 0.8 mg/mL, *e.g.*, about 0.6 mg/mL, about 0.54 mg/mL, *etc.*

[000108] Following the addition of the p-toluenesulfonic acid, the slurry or the solution may be stirred to produce a crystalline slurry. Stirring may be conducted for more than 48 hours. However, stirring is typically conducted for a period of from about 5 to about 36 hours, such as from about 10 to about 24 hours or about 18 hours.

[000109] Stirring may be conducted at any temperature suitable for producing the crystalline slurry. For example, the slurry may be stirred at a temperature from about 0 °C to about 60 °C, such as from about 15 °C to about 45 °C or from about 20 °C to about 25 °C.

[000110] After crystal formation, the crystalline slurry may be filtered to remove the supernatant, and the crystals may be washed with any suitable solvent. In embodiments, the crystals may be washed one to four times, and the solvent may be any solvent suitable for the preparation of the crystalline slurry. In particular, the solvent used to wash the crystals may be the same solvent or solvents used to form the original slurry or solution, or the p-toluenesulfonic acid solution.

[000111] The crystals produced may then be dried to remove excess solvent by any suitable method. For example, drying may be accomplished by one or more methods

including but not limited to elevated temperatures in a range from about 0 °C to about 60 °C, such as from about 15 °C to about 45°C; blowing dry nitrogen over the crystals; and blowing humidified nitrogen over the crystals.

[000112] Maturation studies were performed in which a sample of the tosylate salt of Compound 1 was slurried in different solvents, filtered, and the wet solid was analyzed by XRPD. Three polymorphic forms of the tosylate salt of Compound 1 were observed. FIG. 2 depicts the XRPD spectra of the starting material (E00285), form 1 tosylate salt, form 2 tosylate salt, form 3 tosylate salt, and the amorphous form of Compound 1.

[000113] Table 4 lists the solvents used for maturation experiments.

Table 4

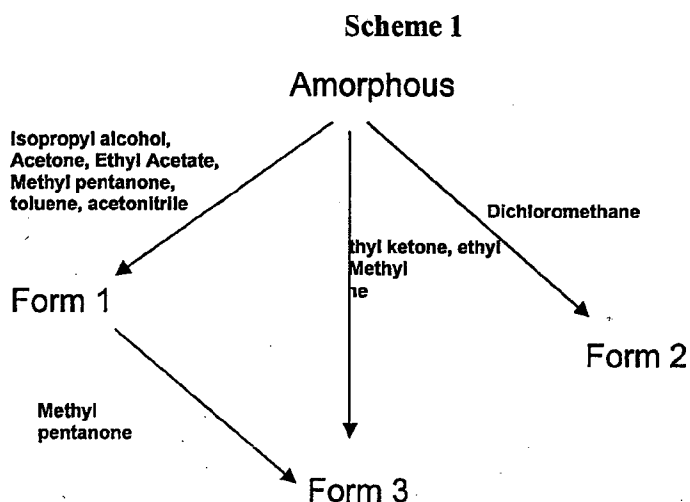
Example No.	Solvent	Form
1	water	Form 1
2	nitromethane	Amorphous
3	anisole	Form 2
4	2-propanol	Form 1
5	methylethyl ketone	Form 3
6	acetone	Form 1
7	ethyl acetate	Form 1
8	dioxane	Amorphous
9	acetonitrile	Form 1
10	toluene	Form 1
11	dichloromethane	Form 2
12	chloroform	Amorphous
13	TBME	Amorphous
14	isopropyl acetate	Form 2
15	NMP	dissolved
16	4-methyl-2-pentanone	Form 3
17	THF	Gum
18	10% EtOAc / cyclohexane	Amorphous
19	10% water EtOH	Amorphous
20	10% water/THF	Amorphous
21	10% water/ACN	Amorphous
22	10% water/2-propanol	Amorphous
23	10% water/acetone	Amorphous
24	10% water/dioxane	Amorphous

[000114] Recrystallization of the amorphous material of Compound 1 was performed in various solvents. Only recrystallization in 2-propanol (isopropyl alcohol, IPA) gave form 1 tosylate salt, as shown in Table 5. FIG. 3 compares XRPD spectra of reference Compound 1 (E00285) and the recrystallized form 1 tosylate salt from IPA.

Table 5

Experiment No.	Solvent	Volume	At 50 °C	XRPD of precipitate of solid
1	nitromethane	24	Soluble	
2	anisole	200	Insoluble	Amorphous
3	2-propanol	60	Soluble	Form 1
4	methylethyl ketone	100	Soluble	Amorphous
5	acetone	80	Soluble	Amorphous
6	ethyl acetate	200	Insoluble	Amorphous
7	dioxane	120	Soluble	Amorphous
8	acetonitrile	80	Soluble	
9	toluene	200	Insoluble	Amorphous
10	dichloromethane	5	Soluble	Amorphous
11	chloroform	5	Soluble	Amorphous
12	TBME	200	Insoluble	Amorphous
13	isopropyl acetate	200	Insoluble	Amorphous
14	4-methyl-2-pentanone	200	Insoluble	Amorphous
15	THF	100	Soluble	Amorphous
16	10% EtOAc / cyclohexane	200	Insoluble	Amorphous

[000115] A summary of the polymorphism the tosylate salt of Compound 1 is presented in Scheme 1:



28

[000116] After recrystallization, samples of form 1, form 2, and form 3 tosylate salt were dried overnight in a vacuum and analyzed by XRPD, as shown in FIG. 4. There was no change in form after drying.

[000117] Variable temperature XRPD was performed on form 2 and form 3 tosylate salt of Compound 1. See FIG. 5 and FIG. 6, respectively.

[000118] The relative stabilities of the polymorphic forms of Compound 1 were analyzed. For example, form 1 tosylate salt was subjected to a maturation experiment for 24 hours in either IPA or methyl pentanone, seeded with either form 2 or form 3 tosylate salt. During this experiment, there was no change of form 1 into form 2 or 3. A slurry of a 50:50 mixture of form 1 and form 3 were analyzed in IPA for 18 hours at 0 °C, 25 °C, 40 °C, and 60 °C, as shown in FIG. 7. There was no change of form 1 into form 3.

[000119] Recrystallization experiments indicated that form 1 tosylate salt can be obtained reproducibly from the amorphous tosylate salt by slurrying in IPA. Form 1 of Compound 1 can also be obtained reproducibly by the addition of tosic acid. A high resolution XRPD scan of form 1 is depicted in FIG. 8 and the characteristic of the diffraction pattern are shown Table 1.

4. Pharmaceutical Compositions Comprising Compounds, Salts, Crystalline Forms or Polymorphs thereof of the Invention

[000120] In a further embodiment, the invention pertains to pharmaceutical compositions comprising a tetracycline compound of the invention (*e.g.*, synthesized, or purified by the methods of the invention) or a pharmaceutically acceptable salt, prodrug or ester thereof. The pharmaceutical compositions may comprise a pharmaceutically acceptable carrier.

[000121] The term "composition" as used herein is intended to encompass a product comprising the specified ingredients (and in the specified amounts, if indicated), as well as any product which results, directly or indirectly, from combination of the specified ingredients in the specified amounts. By "pharmaceutically acceptable" it is meant the diluent, excipient or carrier must be compatible with the other ingredients of the formulation and not deleterious to the recipient thereof.

[000122] As set out above, certain embodiments of the present compounds can contain a basic functional group, such as amino or alkylamino, and are, thus, capable of forming pharmaceutically acceptable salts with pharmaceutically acceptable acids. The term "pharmaceutically acceptable salts" is recognized in the art and includes relatively non-toxic,

29

inorganic and organic acid addition salts of compounds of the present invention. These salts can be prepared *in situ* during the final isolation and purification of the compounds of the invention, or by separately reacting a purified compound of the invention in its free base form with a suitable organic or inorganic acid, and isolating the salt thus formed. Representative salts include the hydrobromide, hydrochloride, sulfate, bisulfate, phosphate, nitrate, acetate, valerate, oleate, palmitate, stearate, laurate, benzoate, lactate, phosphate, tosylate, citrate, maleate, fumarate, succinate, tartrate, naphthylate, mesylate, glucoheptonate, lactobionate, and laurylsulphonate salts, and the like. (See, *e.g.*, Berge *et al.* (1977) "Pharmaceutical Salts", *J. Farm. SCI.* 66:1-19).

[000123] In other cases, the compounds of the present invention may contain one or more acidic functional groups and, thus, are capable of forming pharmaceutically acceptable salts with pharmaceutically acceptable bases. The term "pharmaceutically acceptable salts" in these instances includes relatively non-toxic, inorganic and organic base addition salts of compounds of the present invention. These salts can likewise be prepared *in situ* during the final isolation and purification of the compounds, or by separately reacting the purified compound in its free acid form with a suitable base, such as the hydroxide, carbonate or bicarbonate of a pharmaceutically acceptable metal cation, with ammonia, or with a pharmaceutically acceptable organic primary, secondary or tertiary amine. Representative alkali or alkaline earth salts include the lithium, sodium, potassium, calcium, magnesium, and aluminum salts and the like. Representative organic amines useful for the formation of base addition salts include ethylamine, diethylamine, ethylenediamine, ethanolamine, diethanolamine, piperazine, and the like.

[000124] The term "pharmaceutically acceptable esters" refers to the relatively non-toxic, esterified products of the compounds of the present invention. These esters can be prepared *in situ* during the final isolation and purification of the compounds, or by separately reacting the purified compound in its free acid form or hydroxyl with a suitable esterifying agent. Carboxylic acids can be converted into esters *via* treatment with an alcohol in the presence of a catalyst. Hydroxyls can be converted into esters *via* treatment with an esterifying agent such as alkanoyl halides. The term also includes lower hydrocarbon groups capable of being solvated under physiological conditions, *e.g.*, alkyl esters, methyl, ethyl and propyl esters. (See, for example, Berge *et al.*, *supra.*).

[000125] The invention also pertains to tetracycline compounds, which are synthesized and/or purified by the methods of the invention, and pharmaceutically acceptable salts thereof.

30

[000126] The phrase "pharmaceutically acceptable carrier" is recognized in the art and includes a pharmaceutically acceptable material, composition or vehicle, suitable for administering compounds of the present invention to mammals. The carriers include liquid or solid filler, diluent, excipient, solvent or encapsulating material, involved in carrying or transporting the subject agent from one organ, or portion of the body, to another organ, or portion of the body. Each carrier must be "acceptable" in the sense of being compatible with the other ingredients of the formulation and not injurious to the patient. Some examples of materials which can serve as pharmaceutically acceptable carriers include: sugars, such as lactose, glucose and sucrose; starches, such as corn starch and potato starch; cellulose and its derivatives, such as sodium carboxymethyl cellulose, ethyl cellulose and cellulose acetate; powdered tragacanth; malt; gelatin; talc; excipients, such as cocoa butter and suppository waxes; oils, such as peanut oil, cottonseed oil, safflower oil, sesame oil, olive oil, corn oil and soybean oil; glycols, such as propylene glycol; polyols, such as glycerin, sorbitol, mannitol and polyethylene glycol; esters, such as ethyl oleate and ethyl laurate; agar; buffering agents, such as magnesium hydroxide and aluminum hydroxide; alginic acid; pyrogen-free water; isotonic saline; Ringer's solution; ethyl alcohol; phosphate buffer solutions; and other non-toxic compatible substances employed in pharmaceutical formulations.

[000127] Wetting agents, emulsifiers and lubricants, such as sodium lauryl sulfate and magnesium stearate, as well as coloring agents, releasing agents, coating agents, sweetening agents, flavoring and perfuming agents, preservatives and antioxidants can also be present in the compositions.

[000128] Examples of pharmaceutically acceptable antioxidants include: water soluble antioxidants, such as ascorbic acid, cysteine hydrochloride, sodium bisulfate, sodium metabisulfite, sodium sulfite and the like; oil-soluble antioxidants, such as ascorbyl palmitate, butylated hydroxyanisole (BHA), butylated hydroxytoluene (BHT), lecithin, propyl gallate, α -tocopherol, and the like; and metal chelating agents, such as citric acid, ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA), sorbitol, tartaric acid, phosphoric acid, and the like.

[000129] Formulations of the present invention include those suitable for oral, nasal, topical, transdermal, buccal, sublingual, rectal, vaginal and/or parenteral administration. The formulations may conveniently be presented in unit dosage form and may be prepared by any methods well known in the art of pharmacy. The amount of active ingredient which can be combined with a carrier material to produce a single dosage form will generally be that amount of the compound which produces a therapeutic effect. Generally, out of one hundred

37

per cent, this amount will range from about 1 per cent to about ninety-nine percent of active ingredient, preferably from about 5 per cent to about 70 per cent, most preferably from about 10 per cent to about 30 per cent.

[000130] Methods of preparing these formulations or compositions include the step of bringing into association a compound of the present invention with the carrier and, optionally, one or more accessory ingredients. In general, the formulations are prepared by uniformly and intimately bringing into association a compound of the present invention with liquid carriers, or finely divided solid carriers, or both, and then, if necessary, shaping the product.

[000131] Formulations of the invention suitable for oral administration may be in the form of capsules, cachets, pills, tablets, lozenges (using a flavored basis, usually sucrose and acacia or tragacanth), powders, granules, or as a solution or a suspension in an aqueous or non-aqueous liquid, or as an oil-in-water or water-in-oil liquid emulsion, or as an elixir or syrup, or as pastilles (using an inert base, such as gelatin and glycerin, or sucrose and acacia) and/or as mouth washes and the like, each containing a predetermined amount of a compound of the present invention as an active ingredient. A compound of the present invention may also be administered as a bolus, electuary or paste.

[000132] In solid dosage forms of the invention for oral administration (capsules, tablets, pills, dragees, powders, granules and the like), the active ingredient is mixed with one or more pharmaceutically acceptable carriers, such as sodium citrate or dicalcium phosphate and/or any of the following: fillers or extenders, such as starches, lactose, sucrose, glucose, mannitol and/or silicic acid; binders, such as carboxymethylcellulose, alginates, gelatin, polyvinyl pyrrolidone, sucrose and/or acacia; humectants, such as glycerol; disintegrating agents, such as agar-agar, calcium carbonate, potato or tapioca starch, alginic acid, certain silicates, and sodium carbonate; solution retarding agents, such as paraffin; absorption accelerators, such as quaternary ammonium compounds; wetting agents, such as cetyl alcohol and glycerol monostearate; absorbents, such as kaolin and bentonite clay; lubricants, such as talc, calcium stearate, magnesium stearate, solid polyethylene glycols, sodium lauryl sulfate, and mixtures thereof; and coloring agents. In the case of capsules, tablets and pills, the pharmaceutical compositions may also comprise buffering agents. Solid compositions of a similar type may also be employed as fillers in soft and hard-filled gelatin capsules using such excipients as lactose or milk sugars, as well as high molecular weight polyethylene glycols and the like.

32

[000133] A tablet may be made by compression or molding, optionally with one or more accessory ingredients. Compressed tablets may be prepared using binder (for example, gelatin or hydroxypropylmethyl cellulose), lubricant, inert diluent, preservative, disintegrant (for example, sodium starch glycolate or cross-linked sodium carboxymethyl cellulose), surface-active or dispersing agent. Molded tablets may be made by molding in a suitable machine a mixture of the powdered compound moistened with an inert liquid diluent.

[000134] The tablets, and other solid dosage forms of the pharmaceutical compositions of the present invention, such as dragees, capsules, pills and granules, may optionally be scored or prepared with coatings and shells, such as enteric coatings and other coatings well known in the pharmaceutical-formulating art. They may also be formulated so as to provide slow or controlled release of the active ingredient therein using, for example, hydroxypropylmethyl cellulose in varying proportions to provide the desired release profile, other polymer matrices, liposomes and/or microspheres. They may be sterilized by, for example, filtration through a bacteria-retaining filter, or by incorporating sterilizing agents in the form of sterile solid compositions which can be dissolved in sterile water, or some other sterile injectable medium immediately before use. These compositions may also optionally contain opacifying agents and may be of a composition that they release the active ingredient(s) only, or preferentially, in a certain portion of the gastrointestinal tract, optionally, in a delayed manner. Examples of embedding compositions which can be used include polymeric substances and waxes. The active ingredient can also be in micro-encapsulated form, if appropriate, with one or more of the above-described excipients.

[000135] Liquid dosage forms for oral administration of the compounds of the invention include pharmaceutically acceptable emulsions, microemulsions, solutions, suspensions, syrups and elixirs. In addition to the active ingredient, the liquid dosage forms may contain inert diluent commonly used in the art, such as water or other solvents, solubilizing agents and emulsifiers, such as ethyl alcohol, isopropyl alcohol, ethyl carbonate, ethyl acetate, benzyl alcohol, benzyl benzoate, propylene glycol, 1,3-butylene glycol, oils (in particular, cottonseed, groundnut, corn, germ, olive, castor and sesame oils), glycerol, tetrahydrofuryl alcohol, polyethylene glycols and fatty acid esters of sorbitan, and mixtures thereof.

[000136] Besides inert diluents, the oral compositions can also include adjuvants such as wetting agents, emulsifying and suspending agents, sweetening agents, flavoring agents, coloring agents, perfuming and preservative agents.

[000137] Suspensions, in addition to the active compounds, may contain suspending agents as, for example, ethoxylated isostearyl alcohols, polyoxyethylene sorbitol and sorbitan

33

esters, microcrystalline cellulose, aluminum metahydroxide, bentonite, agar-agar and tragacanth, and mixtures thereof.

[000138] Formulations of the pharmaceutical compositions of the invention for rectal or vaginal administration may be presented as a suppository, which may be prepared by mixing one or more compounds of the invention with one or more suitable nonirritating excipients or carriers comprising, for example, cocoa butter, polyethylene glycol, a suppository wax or a salicylate, and which is solid at room temperature, but liquid at body temperature and, therefore, will melt in the rectum or vaginal cavity and release the active compound.

[000139] Formulations of the present invention which are suitable for vaginal administration also include pessaries, tampons, creams, gels, pastes, foams or spray formulations containing such carriers as are known in the art to be appropriate.

[000140] Dosage forms for the topical or transdermal administration of a compound of this invention include powders, sprays, ointments, pastes, creams, lotions, gels, solutions, patches and inhalants. The active compound may be mixed under sterile conditions with a pharmaceutically acceptable carrier, and with any preservatives, buffers or propellants which may be required.

[000141] The ointments, pastes, creams and gels may contain, in addition to an active compound of this invention, excipients, such as animal and vegetable fats, oils, waxes, paraffins, starch, tragacanth, cellulose derivatives, polyethylene glycols, silicones, bentonites, silicic acid, talc and zinc oxide, or mixtures thereof.

[000142] Powders and sprays can contain, in addition to a compound of this invention, excipients such as lactose, talc, silicic acid, aluminum hydroxide, calcium silicates and polyamide powder, or mixtures of these substances. Sprays can additionally contain customary propellants, such as chlorofluorohydrocarbons and volatile unsubstituted hydrocarbons, such as butane and propane.

[000143] Transdermal patches have the added advantage of providing controlled delivery of a compound of the present invention to the body. Such dosage forms can be made by dissolving or dispersing the compound in the proper medium. Absorption enhancers can also be used to increase the flux of the compound across the skin. The rate of such flux can be controlled by either providing a rate controlling membrane or dispersing the active compound in a polymer matrix or gel.

[000144] Ophthalmic formulations, eye ointments, powders, solutions and the like, are also contemplated as being within the scope of this invention.

34

[000145] Pharmaceutical compositions of this invention suitable for parenteral administration comprise one or more compounds of the invention in combination with one or more pharmaceutically acceptable sterile isotonic aqueous or nonaqueous solutions, dispersions, suspensions or emulsions, or sterile powders which may be reconstituted into sterile injectable solutions or dispersions just prior to use, which may contain antioxidants, buffers, bacteriostats, solutes which render the formulation isotonic with the blood of the intended recipient or suspending or thickening agents.

[000146] Examples of suitable aqueous and nonaqueous carriers which may be employed in the pharmaceutical compositions of the invention include water, ethanol, polyols (such as glycerol, propylene glycol, polyethylene glycol, and the like), and suitable mixtures thereof, vegetable oils, such as olive oil, and injectable organic esters, such as ethyl oleate. Proper fluidity can be maintained, for example, by the use of coating materials, such as lecithin, by the maintenance of the required particle size in the case of dispersions, and by the use of surfactants.

[000147] These compositions may also contain adjuvants such as preservatives, wetting agents, emulsifying agents and dispersing agents. Prevention of the action of microorganisms may be ensured by the inclusion of various antibacterial and antifungal agents, for example, paraben, chlorobutanol, phenol sorbic acid, and the like. It may also be desirable to include isotonic agents, such as sugars, sodium chloride, and the like into the compositions. In addition, prolonged absorption of the injectable pharmaceutical form may be brought about by the inclusion of agents which delay absorption such as aluminum monostearate and gelatin.

[000148] In some cases, in order to prolong the effect of a drug, it is desirable to slow the absorption of the drug from subcutaneous or intramuscular injection. This may be accomplished by the use of a liquid suspension of crystalline or amorphous material having poor water solubility. The rate of absorption of the drug then depends upon its rate of dissolution which, in turn, may depend upon crystal size and crystalline form. Alternatively, delayed absorption of a parenterally-administered drug form may be accomplished by dissolving or suspending the drug in an oil vehicle.

[000149] Injectable depot forms are made by forming microencapsule matrices of the subject compounds in biodegradable polymers such as polylactide-polyglycolide. Depending on the ratio of drug to polymer, and the nature of the particular polymer employed, the rate of drug release can be controlled. Examples of other biodegradable polymers include

poly(orthoesters) and poly(anhydrides). Depot injectable formulations are also prepared by entrapping the drug in liposomes or microemulsions which are compatible with body tissue.

[000150] The preparations of the present invention may be given orally, parenterally, topically or rectally. They are given by forms suitable for each administration route. For example, they are administered in tablets or capsule form. For example, they are administered by injection, infusion, inhalation, lotion, ointment, suppository, *etc.* Oral administration is preferred.

[000151] The phrases "parenteral administration" and "administered parenterally" as used herein means modes of administration other than enteral and topical administration, usually by injection, and includes, without limitation, intravenous, intramuscular, intraarterial, intrathecal, intracapsular, intraorbital, intracardiac, intradermal, intraperitoneal, transtracheal, subcutaneous, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subarachnoid, intraspinal and intrasternal injection and infusion.

[000152] The phrases "systemic administration", "administered systemically", "peripheral administration" and "administered peripherally" as used herein mean the administration of a compound, drug or other material other than directly into the central nervous system, such that it enters the patient's system and, thus, is subject to metabolism and other like processes, for example, subcutaneous administration.

[000153] These compounds may be administered to humans and other animals for therapy by any suitable route of administration, including orally, nasally (as by, for example, a spray), rectally, intravaginally, parenterally, intracisternally and topically (as by powders, ointments or drops, including buccally and sublingually).

[000154] Regardless of the route of administration selected, the compounds of the present invention, which may be used in a suitable hydrated form, and/or the pharmaceutical compositions of the present invention, are formulated into pharmaceutically acceptable dosage forms by conventional methods known to those of skill in the art.

[000155] The term "therapeutically effective amount" refers to the amount of the subject salt or polymorph that will elicit the biological or medical response of a tissue, system, animal or human that is being sought by the researcher, veterinarian, medical doctor or other clinician or that is sufficient to prevent development of or alleviate to some extent one or more of the symptoms of the disease being treated.

[000156] Actual dosage levels of the active ingredients in the pharmaceutical compositions of this invention may be varied so as to obtain an amount of the active

36

ingredient which is effective to achieve the desired therapeutic response for a particular patient, composition, and mode of administration, without being toxic to the patient.

[000157] The selected dosage level will depend upon a variety of factors including the activity of the particular compound of the present invention employed, or the ester, salt or amide thereof, the route of administration, the time of administration, the rate of excretion of the particular compound being employed, the duration of the treatment, other drugs, compounds and/or materials used in combination with the particular compound employed, the age, sex, weight, condition, general health and prior medical history of the patient being treated, and like factors well known in the medical arts.

[000158] A physician or veterinarian having ordinary skill in the art can readily determine and prescribe the effective amount of the pharmaceutical composition required. For example, the physician or veterinarian could start doses of the compounds of the invention employed in the pharmaceutical composition at levels lower than that required in order to achieve the desired therapeutic effect and gradually increase the dosage until the desired effect is achieved.

[000159] In general, a suitable daily dose of a compound of the invention will be that amount of the compound which is the lowest dose effective to produce a therapeutic effect. Such an effective dose will generally depend upon the factors described above. Generally, intravenous and subcutaneous doses of the compounds of this invention for a patient, when used for the indicated analgesic effects, will range from about 0.0001 to about 100 mg per kilogram of body weight per day, more preferably from about 0.01 to about 50 mg per kg per day, and still more preferably from about 0.1 to about 10 mg per kg per day. For example, in some embodiments the doses are between 0.5 and 4.0 mg per kg day. If desired, the effective daily dose of the active compound may be administered as one, two, three, four, five, six or more sub-doses administered separately at appropriate intervals throughout the day or week or other suitable time period, optionally, in unit dosage forms.

[000160] While it is possible for a compound of the present invention to be administered alone, it is preferable to administer the compound as a pharmaceutical composition.

5. Methods of Using the Tetracycline Compounds of the Invention

[000161] The invention also pertains to a method for treating a tetracycline responsive state in a subject, by administering to the subject an effective amount of a composition

37

comprising a Compound 1 according to the invention or a pharmaceutically acceptable salt thereof, such that the state is treated.

[000162] The terms "treat", "treating" or "treatment", as used herein, refer to a method of alleviating or abrogating a disease or disorder (*e.g.*, the tetracycline compound responsive state) and/or its attendant symptoms. The terms "prevent", "preventing" or "prevention", as used herein, refer to a method of barring a subject from acquiring a disease or disorder. The "subject", as used herein, includes a mammal. The mammal can be *e.g.*, any mammal, *e.g.*, a human, primate, mouse, rat, dog, cat, cow, horse, goat, camel, sheep or a pig. Preferably, the mammal is a human.

[000163] The language "tetracycline compound responsive state" or "tetracycline responsive state" includes states which can be treated, prevented, or otherwise ameliorated by the administration of a tetracycline compound of the invention. Tetracycline compound responsive states include bacterial, viral, and fungal infections (including those which are resistant to other tetracycline compounds), cancers (*e.g.*, prostate cancer, breast cancer, colon cancer, lung cancer, melanoma, lymph cancers and other disorders characterized by unwanted cellular proliferation, including, but not limited to, those described in U.S. 6,100,248), arthritis, osteoporosis, diabetes, and other states for which tetracycline compounds have been found to be active (see, for example, U.S. Patent Nos. 5,789,395; 5,834,450; 6,277,061 and 5,532,227, each of which is expressly incorporated herein by reference). Compounds of the invention can be used to prevent or control important mammalian and veterinary diseases such as diarrhea, urinary tract infections, infections of skin and skin structure, ear, nose and throat infections, wound infection, mastitis and the like. In addition, methods for treating neoplasms using tetracycline compounds of the invention are also included (van der Bozert *et al.*, *Cancer Res.*, 1998, 48:6686-6690). In one embodiment, the tetracycline responsive state is not a bacterial infection. In another embodiment, the tetracycline compounds of the invention are essentially non-antibacterial. For example, non-antibacterial tetracycline compounds of the invention may have MIC values greater than about 4 µg/ml as measured by assays known in the art.

[000164] Tetracycline compound responsive states also include inflammatory process associated states (IPAS). The term "inflammatory process associated state" includes states in which inflammation or inflammatory factors (*e.g.*, matrix metalloproteinases (MMPs), nitric oxide (NO), TNF, interleukins, plasma proteins, cellular defense systems, cytokines, lipid metabolites, proteases, toxic radicals, adhesion molecules, *etc.*) are involved or present in an

38

area in aberrant amounts. The inflammatory process is the response of living tissue to damage. The cause of inflammation may be due to physical damage, chemical substances, micro-organisms, tissue necrosis, cancer or other agents. Acute inflammation is short-lasting for only a few days. If it is longer lasting, however, then it may be referred to as chronic inflammation.

[000165] IPAS's include inflammatory disorders. Inflammatory disorders are generally characterized by heat, redness, swelling, pain or loss of function. Examples of causes of inflammatory disorders include, but are not limited to, microbial infections (*e.g.*, bacterial and fungal infections), physical agents (*e.g.*, burns, radiation and trauma), chemical agents (*e.g.*, toxins and caustic substances), tissue necrosis and various types of immunologic reactions. In a further embodiment, the IPAS includes disorders described in U.S. Patent Nos. 5,929,055 and 5,532,227, incorporated herein by reference in their entirety.

[000166] Examples of inflammatory disorders include, but are not limited to, osteoarthritis, rheumatoid arthritis, acute and chronic infections (bacterial and fungal, including diphtheria and pertussis), acute and chronic bronchitis, sinusitis, upper respiratory infections (the common cold, *etc.*), acute and chronic gastroenteritis and colitis, acute and chronic cystitis and urethritis, acute and chronic dermatitis, acute and chronic conjunctivitis, acute and chronic serositis (pericarditis, peritonitis, synovitis, pleuritis and tendinitis), uremic pericarditis, acute and chronic cholecystitis, acute and chronic vaginitis, acute and chronic uveitis, drug reactions, insect bites, burns (thermal, chemical and electrical) and sunburn.

[000167] The term "inflammatory process associated state" includes, in one embodiment, NO associated states. The term "NO associated state" includes states which involve or are associated with nitric oxide (NO) or inducible nitric oxide synthase (iNOS). NO associated state includes states which are characterized by aberrant amounts of NO and/or iNOS. Preferably, the NO associated state can be treated by administering tetracycline compounds of the invention. The disorders, diseases and states described in U.S. Patents Nos. 6,231,894; 6,015,804; 5,919,774; and 5,789,395 are also included as NO associated states. The entire contents of each of these patents are hereby incorporated herein by reference.

[000168] Other examples of NO associated states include, but are not limited to, malaria, senescence, diabetes, vascular stroke, neurodegenerative disorders (Alzheimer's disease, Huntington's disease and Parkinson's disease), cardiac disease (reperfusion-associated injury following infarction), juvenile diabetes, inflammatory disorders, osteoarthritis, rheumatoid arthritis, acute, recurrent and chronic infections (bacterial, viral and

39

fungus), acute and chronic bronchitis, sinusitis, and respiratory infections (the common cold, etc.), acute and chronic gastroenteritis and colitis, acute and chronic cystitis and urethritis, acute and chronic dermatitis, acute and chronic conjunctivitis, acute and chronic serositis (pericarditis, peritonitis, synovitis, pleuritis and tendonitis), uremic pericarditis, acute and chronic cholecystitis, cystic fibrosis, acute and chronic vaginitis, acute and chronic uveitis, drug reactions, insect bites, burns (thermal, chemical and electrical), and sunburn.

[000169] The term "inflammatory process associated state" also includes, in one embodiment, matrix metalloproteinase associated states (MMPAS). MMPAS include states characterized by aberrant amounts of MMPs or MMP activity. These are also included as tetracycline compound responsive states which may be treated using compounds of the invention.

[000170] Examples of matrix metalloproteinase associated states (MMPAS's) include, but are not limited to, arteriosclerosis, corneal ulceration, emphysema, osteoarthritis, multiple sclerosis (Liedtke *et al.*, *Ann. Neurol.* 1998, 44:35-46; Chandler *et al.*, *J. Neuroimmunol.* 1997, 72:155-71), osteosarcoma, osteomyelitis, bronchiectasis, chronic pulmonary obstructive disease, skin and eye diseases, periodontitis, osteoporosis, rheumatoid arthritis, ulcerative colitis, inflammatory disorders, tumor growth and invasion (Stetler-Stevenson *et al.*, *Annu. Rev. Cell Biol.* 1993, 9:541-73; Tryggvason *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta* 1987, 907:191-217; Li *et al.*, *Mol. Carcinog.* 1998, 22:84-89), metastasis, acute lung injury, stroke, ischemia, diabetes, aortic or vascular aneurysms, skin tissue wounds, dry eye, bone and cartilage degradation (Greenwald *et al.*, *Bone* 1998, 22:33-38; Ryan *et al.*, *Curr. Op. Rheumatol.* 1996, 8:238-247). Other MMPAS include those described in U.S. Patent Nos. 5,459,135; 5,321,017; 5,308,839; 5,258,371; 4,935,412; 4,704,383; 4,666,897 and RE 34,656, incorporated herein by reference in their entirety.

[000171] In another embodiment, the tetracycline compound responsive state is cancer. Examples of cancers which the tetracycline compounds of the invention may be useful to treat include all solid tumors, *i.e.*, carcinomas *e.g.*, adenocarcinomas and sarcomas. Adenocarcinomas are carcinomas derived from glandular tissue or in which the tumor cells form recognizable glandular structures. Sarcomas broadly include tumors whose cells are embedded in a fibrillar or homogeneous substance like embryonic connective tissue. Examples of carcinomas which may be treated using the compounds of the invention include, but are not limited to, carcinomas of the prostate, breast, ovary, testis, lung, colon and breast. The methods of the invention are not limited to the treatment of these tumor types, but extend to any solid tumor derived from any organ system. Examples of treatable cancers include,

40

but are not limited to, colon cancer, bladder cancer, breast cancer, melanoma, ovarian carcinoma, prostatic carcinoma, lung cancer, and a variety of other cancers as well. The methods of the invention also cause the inhibition of cancer growth in adenocarcinomas, such as, for example, those of the prostate, breast, kidney, ovary, testes and colon.

[000172] In an embodiment, the invention pertains to a method for treating a subject suffering or at risk of suffering from cancer, by administering an effective amount of a substituted tetracycline compound such that inhibition of cancer cell growth occurs., *i.e.*, cellular proliferation, invasiveness, metastasis, or tumor incidence is decreased, slowed, or stopped. The inhibition may result from inhibition of an inflammatory process, down-regulation of an inflammatory process, some other mechanism or a combination of mechanisms. Alternatively, the tetracycline compounds may be useful for preventing cancer recurrence, for example, to treat residual cancer following surgical resection or radiation therapy. The tetracycline compounds useful according to the invention are especially advantageous as they are substantially non-toxic compared to other cancer treatments. In a further embodiment, the compounds of the invention are administered in combination with standard cancer therapy, such as, but not limited to, chemotherapy.

[000173] Examples of tetracycline responsive states also include neurological disorders which include both neuropsychiatric and neurodegenerative disorders, but are not limited to, Alzheimer's disease, dementias related to Alzheimer's disease such as Pick's disease, Parkinson's diseases and other Lewy diffuse body diseases, senile dementia, Huntington's disease, Gilles de la Tourette's syndrome, multiple sclerosis, amyotrophic lateral sclerosis (ALS), progressive supranuclear palsy, epilepsy, and Creutzfeldt-Jakob disease, autonomic function disorders such as hypertension and sleep disorders, neuropsychiatric disorders (depression, schizophrenia, schizoaffective disorder, Korsakoff's psychosis, mania, anxiety disorders, phobic disorders, *etc.*), learning or memory disorders (amnesia or age-related memory loss, attention deficit disorder, *etc.*), dysthymic disorder, major depressive disorder, obsessive-compulsive disorder, psychoactive substance use disorders, anxiety, phobias, panic disorder, as well as bipolar affective disorder (severe bipolar affective (mood) disorder (BP-1), bipolar affective neurological disorders, *e.g.*, migraine and obesity, *etc.*). Further neurological disorders include, for example, those listed in the American Psychiatric Association's Diagnostic and Statistical manual of Mental Disorders (DSM), the most current version of which is incorporated herein by reference in its entirety.

[000174] In another embodiment, the tetracycline compound responsive state is diabetes, *e.g.*, juvenile diabetes, diabetes mellitus, diabetes type I, or diabetes type II. In a

41

further embodiment, protein glycosylation is not affected by the administration of the tetracycline compounds of the invention. In another embodiment, the tetracycline compound of the invention is administered in combination with standard diabetic therapies, such as, but not limited to insulin therapy.

[000175] In another embodiment, the tetracycline compound responsive state is a bone mass disorder. Bone mass disorders include disorders where a subjects bones are disorders and/or states where the formation, repair or remodeling of bone is advantageous. For example, bone mass disorders include osteoporosis (*e.g.*, a decrease in bone strength and density), bone fractures, bone formation associated with surgical procedures (*e.g.*, facial reconstruction), osteogenesis imperfecta (brittle bone disease), hypophosphatasia, Paget's disease, fibrous dysplasia, osteopetrosis, myeloma bone disease, and the depletion of calcium in bone, such as that which is related to primary hyperparathyroidism. Bone mass disorders include all states in which the formation, repair or remodeling of bone is advantageous to the subject as well as all other disorders associated with the bones or skeletal system of a subject which can be treated with the tetracycline compounds of the invention. In a further embodiment, the bone mass disorders include those described in U.S. Patent Nos. 5,459,135; 5,231,017; 5,998,390; 5,770,588; RE 34,656; 5,308,839; 4,925,833; 3,304,227 and 4,666,897, each of which is hereby incorporated herein by reference in its entirety.

[000176] In another embodiment, the tetracycline compound responsive state is acute lung injury. Acute lung injuries include adult respiratory distress syndrome (ARDS), post-pump syndrome (PPS) and trauma. Trauma includes any injury to living tissue caused by an extrinsic agent or event. Examples of trauma include, but are not limited to, crush injuries, contact with a hard surface, or cutting or other damage to the lungs.

[000177] The invention also pertains to a method for treating acute lung injury by administering a substituted tetracycline compound of the invention.

[000178] The tetracycline responsive states of the invention also include chronic lung disorders. The invention pertains to methods for treating chronic lung disorders by administering a tetracycline compound, such as those described herein. The method includes administering to a subject an effective amount of a substituted tetracycline compound such that the chronic lung disorder is treated. Examples of chronic lung disorders include, but are not limited, to asthma, cystic fibrosis and emphysema. In a further embodiment, the tetracycline compounds of the invention used to treat acute and/or chronic lung disorders such as those described in U.S. Patent Nos. 5,977,091; 6,043,231; 5,523,297; and 5,773,430, each of which is hereby incorporated herein by reference in its entirety.

72

[000179] In yet another embodiment, the tetracycline compound responsive state is ischemia, stroke or ischemic stroke. The invention also pertains to a method for treating ischemia, stroke or ischemic stroke by administering an effective amount of a substituted tetracycline compound of the invention. In a further embodiment, the tetracycline compounds of the invention are used to treat such disorders as described in U.S. Patent Nos. 6,231,894; 5,773,430; 5,919,775 and 5,789,395, incorporated herein by reference.

[000180] In another embodiment, the tetracycline compound responsive state is a skin wound. The invention also pertains, at least in part, to a method for improving the healing response of the epithelialized tissue (*e.g.*, skin, mucusae, *etc.*) to acute traumatic injury (*e.g.*, cut, burn, scrape, *etc.*). The method may include using a tetracycline compound of the invention (which may or may not have antibacterial activity) to improve the capacity of the epithelialized tissue to heal acute wounds. The method may increase the rate of collagen accumulation of the healing tissue. The method may also decrease the proteolytic activity in the epithelialized tissue by decreasing the collagenolytic and/or gellatinolytic activity of MMPs. In a further embodiment, the tetracycline compound of the invention is administered to the surface of the skin (*e.g.*, topically). In a further embodiment, the tetracycline compound of the invention used to treat a skin wound, and other such disorders as described in, for example, U.S. Patent Nos. 5,827,840; 4,704,383; 4,935,412; 5,258,371; 5,308,839; 5,459,135; 5,532,227 and 6,015,804, each of which is incorporated herein by reference in its entirety.

[000181] In yet another embodiment, the tetracycline compound responsive state is an aortic or vascular aneurysm in vascular tissue of a subject (*e.g.*, a subject having or at risk of having an aortic or vascular aneurysm, *etc.*). The tetracycline compound may be effective to reduce the size of the vascular aneurysm or it may be administered to the subject prior to the onset of the vascular aneurysm such that the aneurysm is prevented. In one embodiment, the vascular tissue is an artery, *e.g.*, the aorta, *e.g.*, the abdominal aorta. In a further embodiment, the tetracycline compounds of the invention are used to treat disorders described in U.S. Patent Nos. 6,043,225 and 5,834,449, incorporated herein by reference in their entirety.

[000182] Bacterial infections may be caused by a wide variety of gram positive and gram negative bacteria. The compounds of the invention are useful as antibiotics against organisms which are resistant to other tetracycline compounds. The antibiotic activity of the tetracycline compounds of the invention may be determined using the *in vitro* standard broth

dilution method described in Waitz, J.A., *National Commission for Clinical Laboratory Standards, Document M7-A2*, vol. 10, no. 8, pp. 13-20, 2nd edition, Villanova, PA (1990).

[000183] The tetracycline compounds may also be used to treat infections traditionally treated with tetracycline compounds such as, for example, rickettsiae infection, a number of gram-positive and gram-negative bacterial infection, lymphogranuloma venereum, inclusion conjunctivitis and psittacosis. The tetracycline compounds may be used to treat infections of, e.g., *K. pneumoniae*, *Salmonella*, *E. hirae*, *A. baumannii*, *B. catarrhalis*, *H. influenzae*, *P. aeruginosa*, *E. faecium*, *E. coli*, *S. aureus* or *E. faecalis*. In one embodiment, the tetracycline compound is used to treat a bacterial infection that is resistant to other tetracycline antibiotic compounds. The tetracycline compound of the invention may be administered with a pharmaceutically acceptable carrier.

[000184] The language "in combination with" another therapeutic agent or treatment includes co-administration of the tetracycline compound, (e.g., inhibitor) and with the other therapeutic agent or treatment, administration of the tetracycline compound first, followed by the other therapeutic agent or treatment and administration of the other therapeutic agent or treatment first, followed by the tetracycline compound. The other therapeutic agent may be any agent which is known in the art to treat, prevent, or reduce the symptoms of a disease or disorder, such as IPAS. Furthermore, the other therapeutic agent may be any agent of benefit to the patient when administered in combination with the administration of a tetracycline compound. In one embodiment, the diseases, such as cancer, treated by methods of the invention include those described in U.S. Patent Nos. 6,100,248; 5,843,925; 5,837,696 and 5,668,122, incorporated herein by reference in their entirety.

[000185] The language "effective amount" of the compound is that amount necessary or sufficient to treat or prevent a tetracycline compound responsive state. The effective amount can vary depending on such factors as the size and weight of the subject, the type of illness, or the particular tetracycline compound. For example, the choice of the tetracycline compound can affect what constitutes an "effective amount". One of ordinary skill in the art would be able to study the aforementioned factors and make the determination regarding the effective amount of the tetracycline compound without undue experimentation.

[000186] In the therapeutic methods of the invention, one or more tetracycline compounds of the invention may be administered alone to a subject, or more typically a compound of the invention will be administered as part of a pharmaceutical composition in mixture with conventional excipient, i.e., pharmaceutically acceptable organic or inorganic carrier substances suitable for parenteral, oral or other desired administration and which do

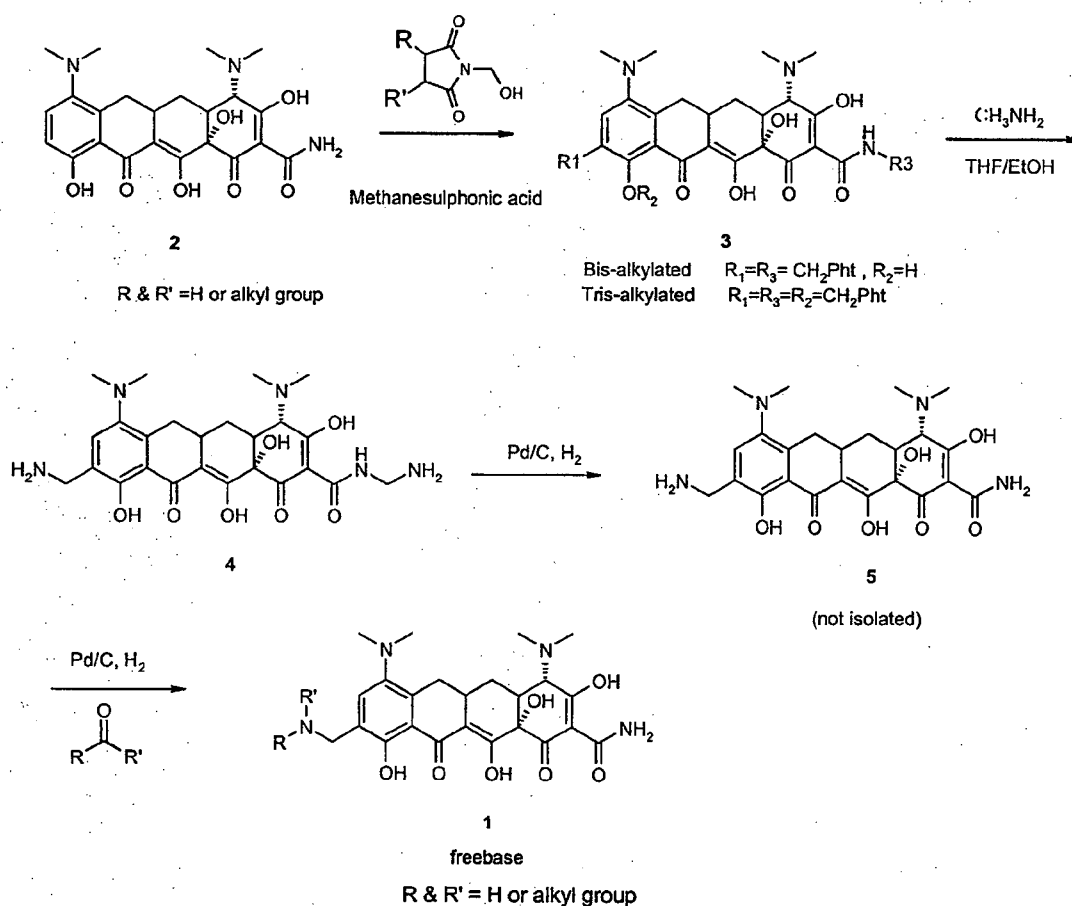
24

not deleteriously react with the active compounds and are not deleterious to the recipient thereof.

[000187] The invention is further illustrated by the following examples, which should not be construed as further limiting.

6. Exemplification of the Invention

Example 1: Synthesis of 9-Alkyl Aminomethyl Minocycline



Scheme 2

[000188] Minocycline hydrochloride (compound 2) was dissolved in methanesulfonic acid or hydrofluoric acid with methanesulfonic anhydride or similar water scavenger acid such as triflic acid. N-hydroxymethyl phthalimide was added to the reaction mixture. The mixture was stirred at 20-35 °C until the reaction was complete. The acid solution was added to an ice/water mixture, and triflic salt can be readily precipitated, filtered and collected. The solid was re-dissolved in acetone and brought to a neutral pH with base. The product was precipitated by the addition of water. If the triflic acid was present as scavenger the product can be precipitated without neutralization. The product was isolated as a mixture of the bis

45

and tris alkylated product. The isolated material of this reaction was enriched in the desired bis ratio (90%).

[000189] The solid was suspended in the EtOH or MeOH. Aminolysis was carried out by using methylamine. A phthalamide by-product precipitated as the reaction progressed and was removed by filtration. The light yellow solid product was precipitated out by the addition of about 1.5 volumes of *t*-butylmethylether to the reaction mixture, and collected through a simple filtration that left many small impurities and methylamine reagent in the solution. Further purification of the compound was performed through re-slurrying with a lower aliphatic alcohol such as methanol.

[000190] Compound 4 as freebase was transferred to a hydrogenation vessel which was charged with methanol and aldehyde. An inactivated Pd/C catalyst was charged and the vessel was pressurized with hydrogen gas. The reaction mixture was hydrogenated under hydrogen pressure around 30 Psi for about 24 hours. When conversion of compound 4 to 1 was complete, the solution was filtered and washed through a Celite pad. At this point the reaction mixture contained very low β C-4 epimer, around 3-7%.

[000191] The product (1) was worked up as follows to isolate the product selectively from its impurities. The pH of the solution was adjusted to about 4.5 with concentrated HCl and the solution was extracted with dichloromethane. The aqueous layer was extracted with dichloromethane to selectively recover the preferred epimer product (*e.g.*, α). The dichloromethane layers were combined and concentrated, and 2 L of *n*-heptane was added to precipitate the product. Further purification was obtained by repeating the work-up procedure with or without *t*-butylmethylether to dissolve the crude product.

Example 2: Purification of Compound 1

[000192] Crude 9-(2',2'-dimethylpropyl aminomethyl) minocycline freebase (40 g) was dissolved in 150 mL of buffer A (0.1% aqueous solution of methanesulfonic acid - MSA) and the pH was adjusted to 2-3 with MSA.

[000193] The solution was filtered and injected into an HPLC and the product was eluted with an isocratic gradient of 94% buffer A and 6% acetonitrile. The product fraction collection was initiated when the product peak was detected. Each fraction was analyzed and an acceptance criterion of greater than 80% AUC of the main peak was used for the early product fractions. When combining fractions, the level of impurities and relative concentration of the pooled fractions was factored into the selection criteria that meet the

296

final product specifications. To the product fractions was added a 10% aqueous solution of sodium sulfite equal to 10% of the original volume of the collected fractions.

[000194] The following example represents the output of a single injection. The output from multiple injections may also be combined and worked up. A product fraction volume of 3.5 L (including sodium sulfite) was collected and the pH was adjusted to 4.0 - 4.5 using a solution of sodium hydroxide. The aqueous solution was washed with 2 L of dichloromethane and the organic layer was separated and discarded.

[000195] The pH of the aqueous layer is adjusted to 7.5 - 8.5 using sodium hydroxide and the product was extracted four times with 2.4 L of dichloromethane. The pH was readjusted to 7.5 - 8.5 with sodium hydroxide or MSA, prior to each extraction.

[000196] The four dichloromethane layers were combined and concentrated to about 200 mL, which was then added slowly (over a period of about 10 minutes) to a vigorously stirred *n*-heptane (2.5 L). The suspension was stirred for about 10 minutes at room temperature and diluted slowly (over a period of 5 minutes) with *n*-heptane 1.5 L. The slurry is cooled to 0-5 °C and stirred for 1-2 hours. The suspended solid was filtered and washed with 3 x 150 mL portions of *n*-heptane. The product was dried under vacuum at 40 °C for at least 24 hours until a constant weight was achieved and the levels of all residual solvents were within specification. Approximately 13.6 g of 9-(2',2'-dimethylpropyl aminomethyl) minocycline freebase was isolated as a yellow solid.

Example 3: Preparation of Crystalline HCl Salt of Compound 1

[000197] Compound 1 (13 g) was dissolved in acetone (300 mL), filtered and the filter was additionally washed with acetone. The combined filtrate and washes was cooled to 5 °C. To the combined filtrate and washes, a solution of concentrated HCl (3.9 mL) in acetone (79 mL) was slowly added with vigorous stirring. The resultant slurry was stirred in an ice bath for 15 minutes and filtered off.

[000198] The first crop of solid was washed with cold acetone and pentane and dried in vacuo for 48 hours, yielding 13.7 g of yellow amorphous solid. The flask with saturated filtrate was covered with aluminum foil and left for 2 weeks during which the growth of single crystals was observed. Crystals were collected by filtration and washed with hexane.

Example 4: Preparation of Crystalline Methanesulfonic Acid Salt of Compound 1

[000199] To a 25-mL 3-neck flask under an inert nitrogen atmosphere, 3 mL of isopropanol (IPA) was charged. A slurry was prepared by adding 225 mg amorphous free base of Compound 1 to the flask. The slurry was warmed to a temperature of 45 °C. Methanesulfonic acid hydrate (98.0 mg) was then added to the slurry. The slurry was stirred

47

at 45 °C for one hour, then cooled to 22 °C to produce a thick crystalline slurry. The slurry was filtered and washed with IPA (2 x 1 mL). Excess IPA was removed from the crystalline cake by drying at 55 °C for more than two hours to achieve a constant weight. Crystalline mesylate (methanesulfonic acid) salt of Compound 1 (180 mg) was isolated. It was determined that the crystalline mesylate salt was unstable at 5 °C.

Example 5: Preparation of Crystalline Tosylate Salt of Compound 1 (using a slurry method)

[000200] To a 5-L 3-neck flask under an inert nitrogen atmosphere, 2.0 L of isopropanol (IPA) was charged. A slurry was prepared by adding 289 g of the amorphous free base of Compound 1 to the flask. A solution of *p*-toluenesulfonic acid hydrate (97.0 g) in IPA (400 mL) was then added to the slurry. The water content of the slurry supernatant was adjusted to 0.6 g/L with the addition of water (9 mL), and the slurry was stirred at 20-25 °C for 18 hours to produce a thick crystalline slurry. The slurry was filtered and washed with IPA (2 x 500mL). Excess IPA was removed from the crystalline cake by blowing dry nitrogen through the cake for 24 hours. With the solids containing 3 weight-percent (wt %) of IPA, the cake was further dried by blowing humidified nitrogen through the cake at a relative humidity of 70-75% for 24 hours. The cake retained 0.9 wt % of IPA that was not further reduced by this method. Excess water was then removed from the cake by blowing dry nitrogen through the cake for 24 hours. The tosylate salt of Compound 1 was isolated as an orange powder (337 g). The isolated tosylate salt of Compound 1 was crystalline with only one observed form: a non-stoichiometric hemihydrate, as determined by x-ray powder diffraction (XPRD) and thermogravimetric (TG) analysis.

Example 6: Preparation of Crystalline Tosylate Salt of Compound 1 (using a solution method)

[000201] To a 5-L 3-neck flask under an inert nitrogen atmosphere, 1.7 L of methanol and 1.7 L of methyl-*t*-butyl ether were charged. *P*-toluene sulfonic acid monohydrate (209g) and the amorphous free base of Compound 1 (556g) were added with stirring to the flask to obtain a clear solution. A seed quantity (3g) of the monotosylate salt of compound 1 was added to initiate crystallization and a further quantity of methanol (0.1 L) and methyl-*t*-butyl ether (0.5 L) was added. The resulting slurry was stirred at about 20 °C for 22 hours to produce a thick crystalline slurry. The slurry was filtered and washed with a mixture of 1.1 L of methanol and 1.3 L of methyl-*t*-butyl ether followed by methyl-*t*-butyl ether (2 x 2.4 L). The tosylate salt of Compound 1 was isolated as an orange powder. Excess solvent was removed from the crystalline cake by blowing dry nitrogen through the cake for 24 hours.

48

The cake was then dried under vacuum at about 30 °C until the solids contained about 6 weight-percent (wt %) of solvent. The cake was further dried under vacuum at about 45 °C until the solids contained less than 3 weight-percent (wt %) of solvent. The isolated tosylate salt of Compound 1 was crystalline with the observed form 1 as determined by x-ray powder diffraction (XPRD).

Example 7: Characterization of Tosylate Salt of Compound 1

[000202] The XRPD pattern of the isolated tosylate salt of Compound 1 comprised 2θ values in degrees of 5.6, 8.0, 8.6, 11.4, 13.0, 15.5, 18.8, 20.4 and 24.5.

[000203] The crystalline tosylate salt was subjected to thermogravimetric (TG) analysis under nitrogen flow at a heating rate of 10 °C/minute. A weight loss of 3.9% was observed up to 81.3 °C, which was due to water loss.

[000204] Upon drying, water content in the crystalline tosylate salt of Compound 1 was calculated to be 0.5%. After standing at room temperature for 24 hours, this value increased to 5%. In contrast to the amorphous Compound 1, the crystalline tosylate salt of Compound 1 was stable for weeks and months at room temperature, maintaining a water content of approximately 5%.

[000205] The hygroscopicity of the subject crystalline tosylate salt was determined using a symmetric vapor sorption analyzer, and reported as wt% gained as a function of percent relative humidity (%RH) from 5% to 95% to 1%, at 5% intervals at 25.0 °C. A maximum weight gain of 12 wt% at 95% RH, with slight hysteresis upon desorption, was observed, and a 2 wt% loss due to IPA was observed.

[000206] The crystalline tosylate salt was determined to have the solubilities summarized in Table 6 below. The solubilities were determined by mixing excess solids with solvent, at ambient temperature for two hours, followed by filtration of the supernatant. The supernatant concentration was determined by high-performance liquid chromatography (HPLC). Equilibration of 56.8 mg of the subject crystalline tosylate salt in 0.5 mL water and 122.1 mg of the subject crystalline tosylate salt in 1.0 mL water resulted in clear solutions. The pH of 122.1 mg of the subject crystalline tosylate salt in 1.0 mL of water was determined to be 5.70.

Table 6

Solvent	Solubility (mg/mL)
Water	>100
Acetonitrile	5.9
Methanol	86.1
IPA	5.8

219

Example 8: XRPD of Compound 1

[000207] X-Ray Powder Diffraction patterns were collected on a Siemens D5000 diffractometer using Cu K α radiation (40kV, 40mA), θ - θ goniometer, divergence of V20 and receiving slits, a graphite secondary monochromator and a scintillation counter. The instrument is performance checked using a certified Corundum standard (NIST 1976). The software used for data collection was Diffrac Plus XRD Commander v2.3.1 and the data were analyzed and presented using Diffrac Plus EVA v 11.0.0.2 or v 13.0.0.2.

[000208] Powder samples were prepared as flat plate specimens using. Approximately 35 mg of the sample was gently packed into a cavity cut into polished, zero-background (510) silicon wafer. The sample was rotated in its own plane during analysis. The details of the data collection are:

Angular range: 2 to 42 $^{\circ}2\theta$

Step size: 0.05 $^{\circ}2\theta$

Collection time: 4 s/step.

High resolution X-Ray Powder Diffraction patterns were collected on a Bruker AXS C2 GADDS diffractometer using Cu K α radiation (40 kV, 40 mA), automated XYZ stage, laser video microscope for auto-sample positioning and a HiStar 2-dimensional area detector. X-ray optics consists of a single Göbel multilayer mirror coupled with a pinhole collimator of 0.3 mm.

[000209] The beam divergence, *i.e.* the effective size of the X-ray beam on the sample, was approximately 4 mm. A θ - θ continuous scan mode was employed with a sample - detector distance of 20 cm which gives an effective 2θ range of 3.2 $^{\circ}$ – 29.7 $^{\circ}$. Typically, the sample would be exposed to the X-ray beam for 120 seconds. The software used for data collection was GADDS for WNT 4.1.16 and the data were analyzed and presented using Diffrac Plus EVA v 9.0.0.2 or v 13.0.0.2.

Example 9: Temperature and Moisture Stability Study

[000210] A stability study was conducted on tosylate salt and mesylate salt of Compound 1, by monitoring changes in the high performance liquid chromatography (HPLC) impurity profiles for each salt when exposed to various temperatures and/or humidity conditions. Each sample was placed in a closed container and exposed to three controlled environments: refrigerated (5 $^{\circ}$ C), 20 $^{\circ}$ C and 60% relative humidity, and 40 $^{\circ}$ C and 75% relative humidity. After two weeks, the crystalline tosylate salt was determined to be the

most stable crystalline form of Compound 1. The stability study of the crystalline tosylate salt was continued.

[000211] Samples were analyzed by the following reversed-phase HPLC impurity profile method at time points 0, 1, 2, 4 weeks (Table 7) and 3 months (Table 8) for the tosylate salt; and 0, 1 and 2 weeks for the mesylate salt (Table 9).

[000212] Reversed-phase HPLC analysis was conducted using a SYMMETRY SHIELD RP18 column (4.6 x 250 mm, 5 pm particle size), although analysis using a similar or equivalent column would be expected to yield similar results. The mobile phase components were 0.01 M ammonium acetate in water at pH 3.3 (A) and acetonitrile (B). The mobile phase composition was a gradient that increased from 6% to 15% B in five minutes, held at 15% B for 15 minutes, increased from 15% to 60% B in ten minutes, then from 60% to 90% B in two minutes, and then the system was re-equilibrated at 6% B for four minutes. The flow rate was 1.0 mL/minute, and the injection volume was 10.0 μ L. The column temperature was maintained at 30 °C. Detection was by ultraviolet light (UV) at 280 nm. The retention time for Compound 1 was approximately 15.7 minutes. The sample solution was prepared in mobile phase A to a final concentration of 2.0 mg/mL.

Table 7

Time Point	Total Impurities**	RRT 0.52 (%)	RRT 0.77 (%)	RRT 0.93 (%)	RRT 1.19 (%)	RRT*** 1.26 (%)	RRT 1.77 (%)	Compound 1 (%)
Initial	1.60	0.06	ND	ND	0.24	1.2	0.10	98.4
<u>1 week</u>								
5 °C	1.51	0.09	ND	ND	0.21	1.1	0.11	98.5
20 °C & 60% RH*	1.63	0.09	ND	ND	0.21	1.2	0.12	98.3
40 °C & 75% RH	1.80	0.09	0.05	ND	0.21	1.3	0.14	98.2
<u>2 weeks</u>								
5 °C	1.62	0.08	ND	0.08	0.24	1.1	0.12	98.4
20 °C & 60% RH	1.66	0.08	ND	0.08	0.25	1.1	0.15	98.4
40 °C & 75% RH	1.68	0.08	ND	0.09	0.25	1.1	0.16	98.3
<u>4 weeks</u>								
5 °C	1.61	0.09	0.08	0.07	0.23	1.0	0.14	98.3
20 °C & 60% RH	1.84	0.10	0.10	0.12	0.24	1.1	0.18	98.2
40 °C & 75% RH	1.96	0.10	0.17	0.13	0.26	1.1	0.20	98.1

* RH denotes relative humidity

** Total impurities included all impurities in a specific batch

*** RRT 1.26 denotes beta-epimer.

Table 8

Time Point	20°C & 60% RH*				40°C & 75% RH			
	Beta-epimer	4-keto	M-2	Total	Beta-epimer	4-keto	M-2	Total
	RRT=1.26	compound	impurity	impurity**	RRT=1.26	RRT=1.57	RRT=0.84	impurity
0 month	1.76%	0.05%	-	2.12%	1.76%	0.05%	-	2.12%
3 month	1.74%	0.10%	0.18%	2.86%	1.66%	0.14%	0.31%	3.12%

* RH denotes relative humidity

** Total impurities included all impurities in a specific batch

Table 9

Time Point	Total Impurities (%)	RRT 0.52 (%)	RRT 0.77 (%)	RRT 0.93 (%)	RRT 1.19 (%)	RRT 1.26 (%)	RRT 1.77 (%)	Compound 1 (%)
Initial	1.70	ND	ND	ND	0.20	1.5	ND	98.3
<u>1 week</u>								
5 °C	1.85	ND	ND	ND	0.17	1.6	0.08	98.2
20 °C & 60% RH*	2.06	ND	ND	ND	0.17	1.8	0.09	98.0
40 °C & 75% RH	2.97	0.07	0.05	ND	0.16	2.6	0.09	97.1
<u>2 weeks</u>								
5 °C	1.65	ND	ND	0.06	0.20	1.3	0.09	98.3
20 °C & 60% RH	1.87	ND	ND	0.06	0.20	0.11	0.11	98.1
40 °C & 75% RH	3.38	0.05	0.07	0.06	0.19	0.11	0.11	96.6

[000213] The above data demonstrates that the tosylate salt of Compound 1 is stable when stored refrigerated and/or 20 °C & 60% RH conditions for at least four weeks. The tosylate salt of Compound 1 is stable at temperature in a range from 0 °C - 70 °C, or in a range from 5 °C - 50 °C, or in a range from 20 °C - 30 °C.

Example 10: Photostability Study

[000214] A photostability study was conducted on the tosylate salt of Compound 1. Two samples were prepared in clear glass Petri dishes. One sample was wrapped in aluminum foil to serve as a control sample. Both samples were placed in the ES 2000 Environmental Light 10 Chamber and exposed to 12 kilolux of cool white fluorescent light for a total of 47 hours. Samples were then analyzed by HPLC impurity profile method, and the results are summarized in Table 10.

Table 10

Sample	RRT 0.52 (%)	RRT 0.064 (%)	RRT 0.77 (%)	RRT 0.83 (%)	RRT 0.93 (%)	RRT 1.19 (%)	RRT 1.26 (%)	RRT 1.77 (%)	Compound 1 (%)
Control	0.06	ND	0.08	ND	0.12	0.26	1.2	0.16	98.2
Exposed	0.06	ND	0.09	ND	0.13	0.26	1.1	0.16	98.2

82

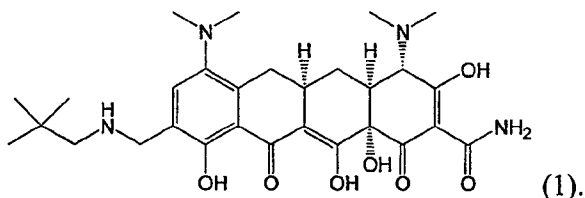
Equivalents

Those skilled in the art will recognize, or be able to ascertain using no more than routine experimentation, many equivalents to the specific embodiments and methods described herein. Such equivalents are intended to be encompassed by the scope of the following claims.

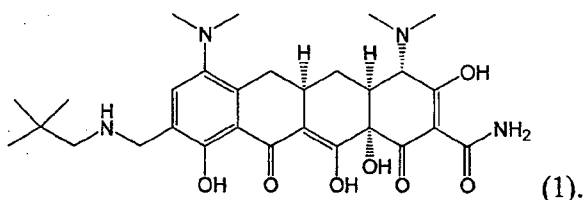
All patents, patent applications, and literature references cited herein are hereby expressly incorporated by reference.

Claims

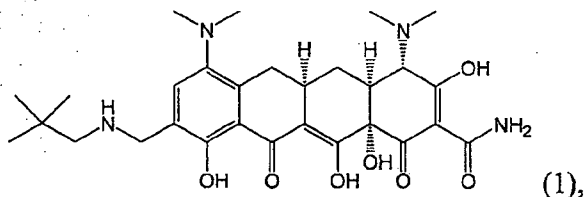
1. A crystalline form of Compound 1:



2. A tosylate salt of Compound 1:

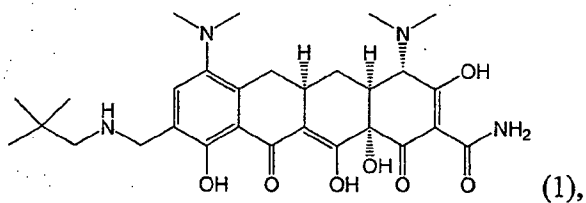


3. A crystalline form of the salt of claim 2.
4. A polymorph of the crystalline form of claim 3, characterized by an X-ray power diffraction pattern substantially similar to that set forth in Figure 8.
5. The polymorph of claim 4, characterized by an X-ray powder diffraction pattern including peaks at approximately 8.06, 13.02, and 18.83 °2θ using Cu Kα radiation.
6. The polymorph of claim 4, characterized by an X-ray powder diffraction pattern including peaks at approximately 8.06, 11.41, 13.02, 18.83, 20.54, and 24.53 °2θ using Cu Kα radiation.
7. The polymorph of claim 4, characterized by an X-ray powder diffraction pattern including peaks at approximately 5.60, 8.06, 8.57, 11.41, 13.02, 15.58, 18.83, 20.54 and 24.53 °2θ using Cu Kα radiation.
8. The polymorph of claim 4 obtained by crystallizing the tosylate salt of Compound 1:



from isopropanol.

9. A method of preparing a stable crystalline tosylate salt of Compound 1:

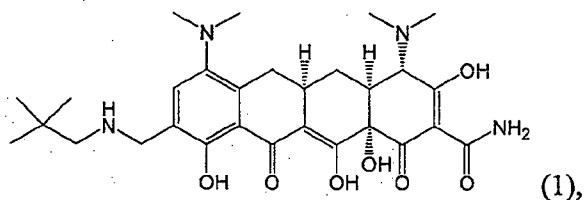


wherein the method comprises:

- dissolving a freebase of Compound 1 in a first solvent or combination of solvents to form a first solution;
- dissolving p-toluenesulfonic acid in a second solvent or combination of solvents to form a second solution; and
- combining said first and second solution to form a third solution.

10. The method of claim 9, wherein the first solvent or combination of solvents and the second solvent or combination of solvents are the same or different.
11. The method of claim 9, wherein the first combination of solvents and the second combination of solvents are each independently a combination of alcoholic solvents.
12. The method of claim 11, wherein each combination of solvents is independently a combination of two alcoholic solvents.
13. The method of claim 12, wherein the two alcoholic solvents are ethanol and isopropanol.
14. The method of claim 13, wherein the ethanol and isopropanol are at a volume-to-volume ratio of 2 to 1.

15. The method of claim 9, wherein each combination of solvents comprises an alcoholic solvent and an anti-solvent.
16. The method of claim 15, wherein the alcoholic solvent is methanol.
17. The method of claim 15, wherein the anti-solvent is selected from a ketone, an ether and an ester.
18. The method of claim 17, wherein the ether is methyl-t-butyl ether.
19. The method of claim 9, wherein each combination of solvents comprises methanol and methyl-t-butyl ether.
20. The method of claim 19, wherein the methanol and methyl-t-butyl ether are at a volume-to-volume ratio of 1 to 1.2.
21. The method of claim 9, wherein the p-toluenesulfonic acid is provided in an amount of from 25 to 75 wt % relative to the amount of said Compound 1.
22. The method of claim 9, wherein the p-toluenesulfonic acid is provided in a form of a p-toluenesulfonic acid monohydrate.
23. The method of claim 9, further comprising adding a form 1 polymorph tosylate salt of Compound 1 to said third solution to form a fourth solution.
24. The method of claim 23, wherein the fourth solution forms a slurry upon stirring.
25. The method of claim 24, further comprising drying the slurry.
26. A polymorph of tosylate salt of Compound 1:



56

obtained according to the method of claim 9.

27. A pharmaceutical composition comprising a crystalline salt of claim 3 and a pharmaceutically acceptable diluent, excipient or carrier.

28. A pharmaceutical composition comprising the polymorph of claim 4 and a pharmaceutically acceptable diluent, excipient or carrier.

29. The pharmaceutical composition of claim 28 wherein said polymorph is in a pure form.

87

1/10

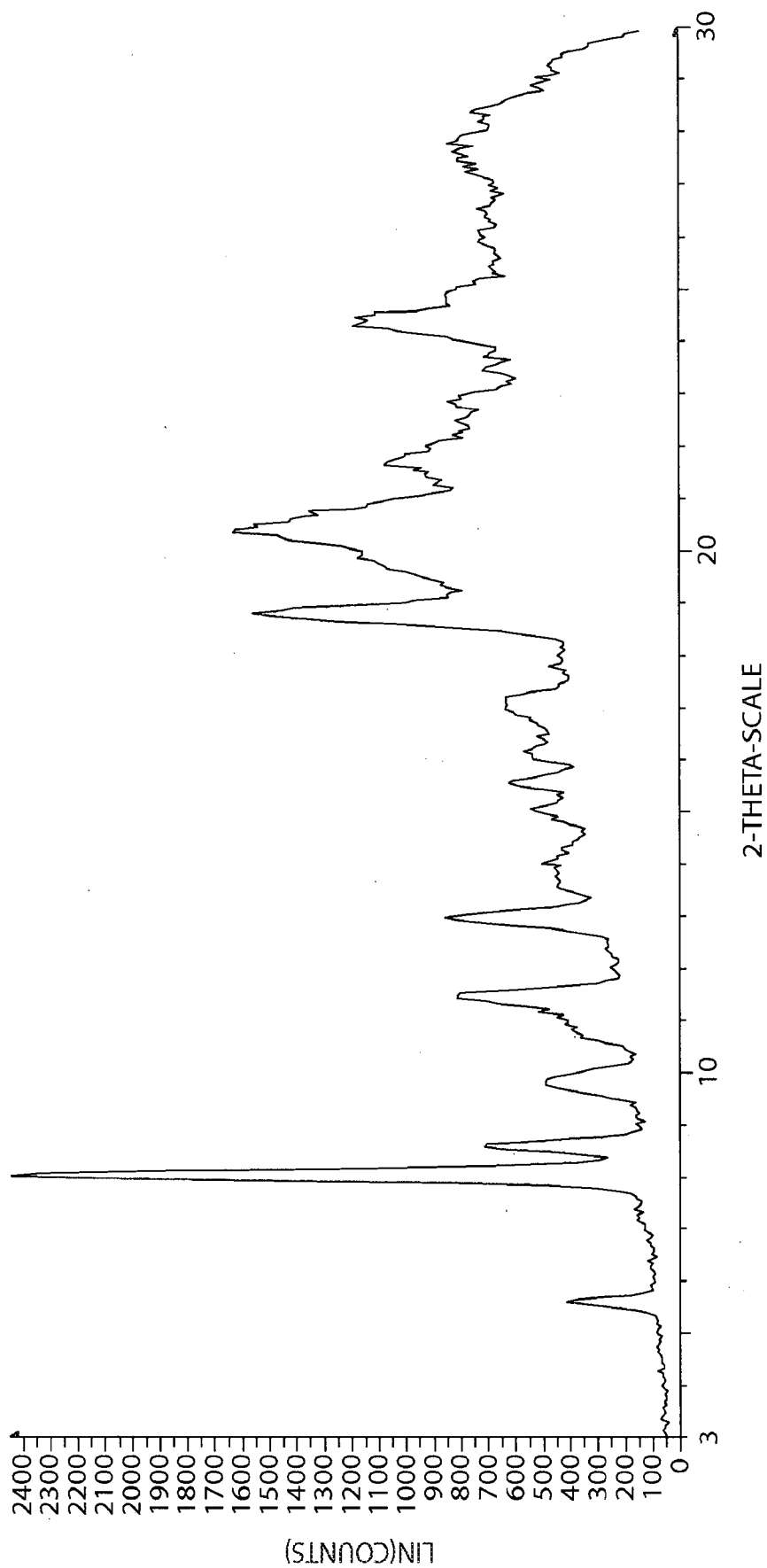


Fig. 1

58

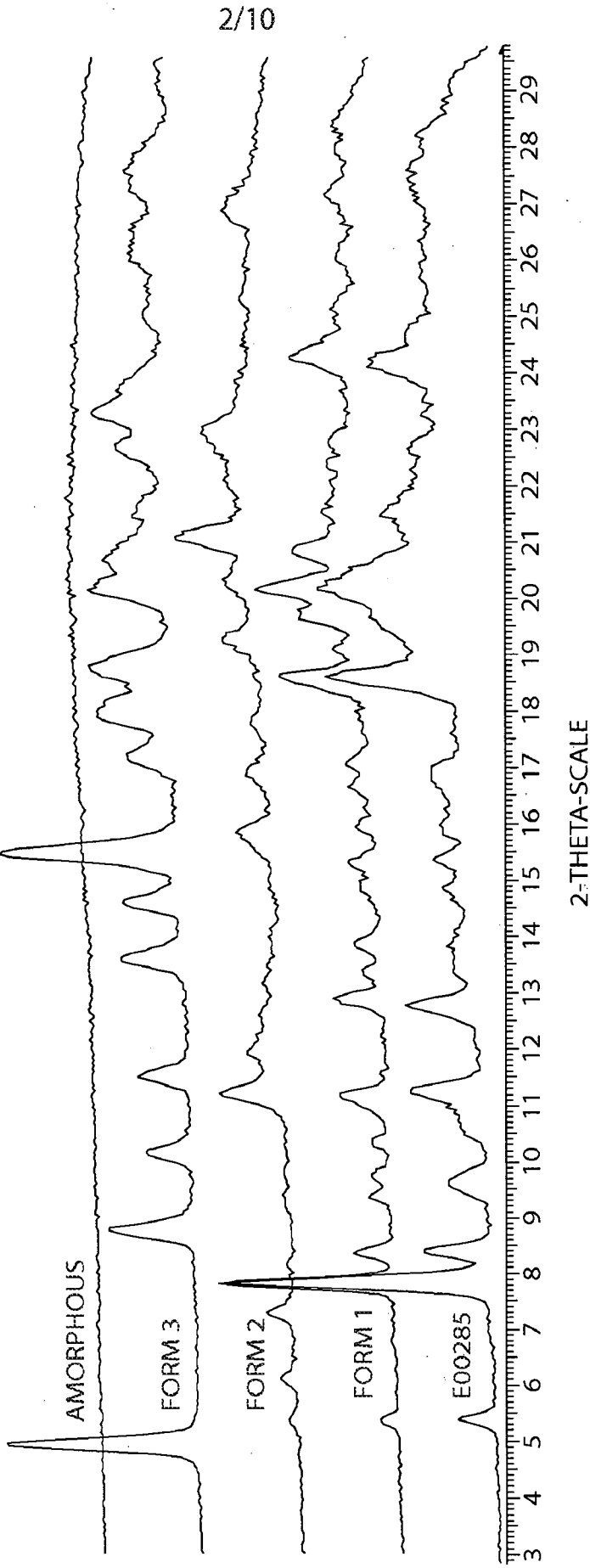


Fig. 2

59

3/10

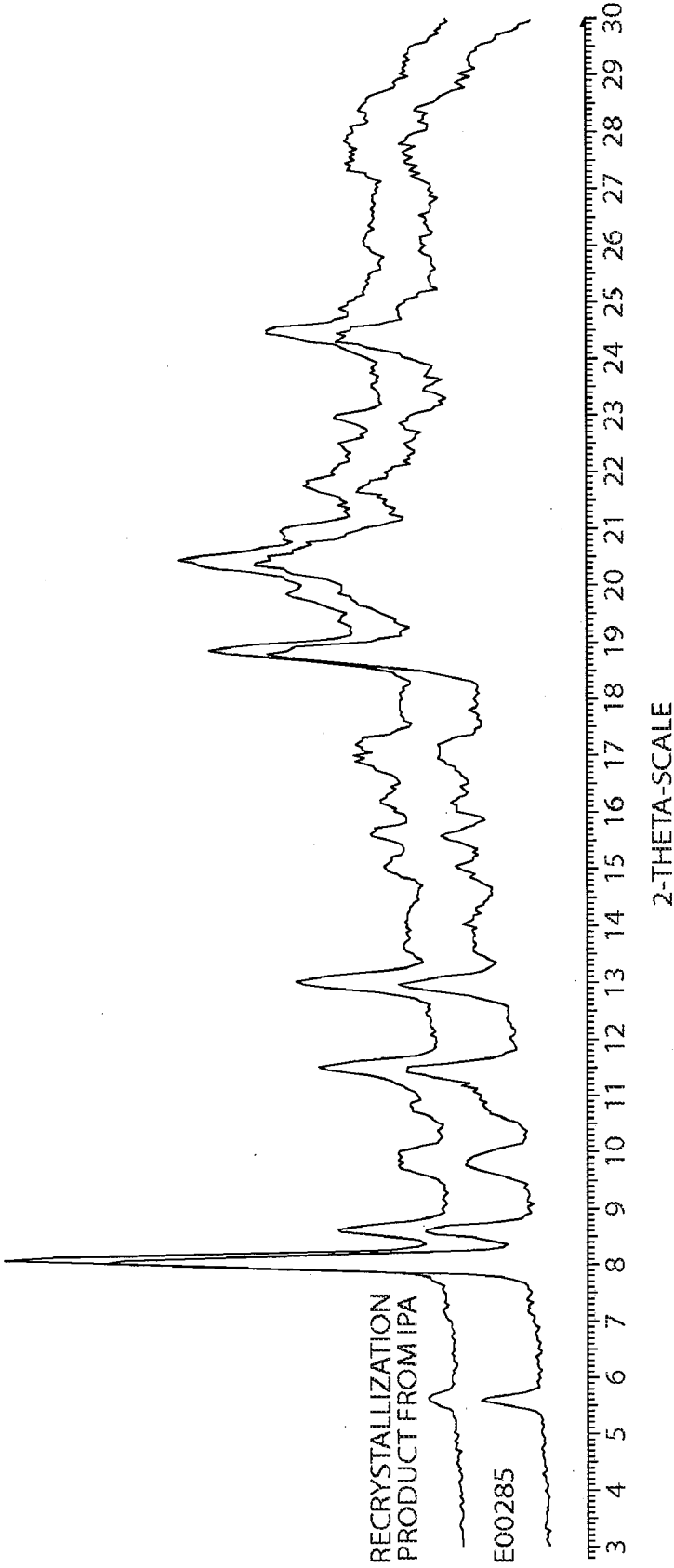


Fig. 3

50

4/10

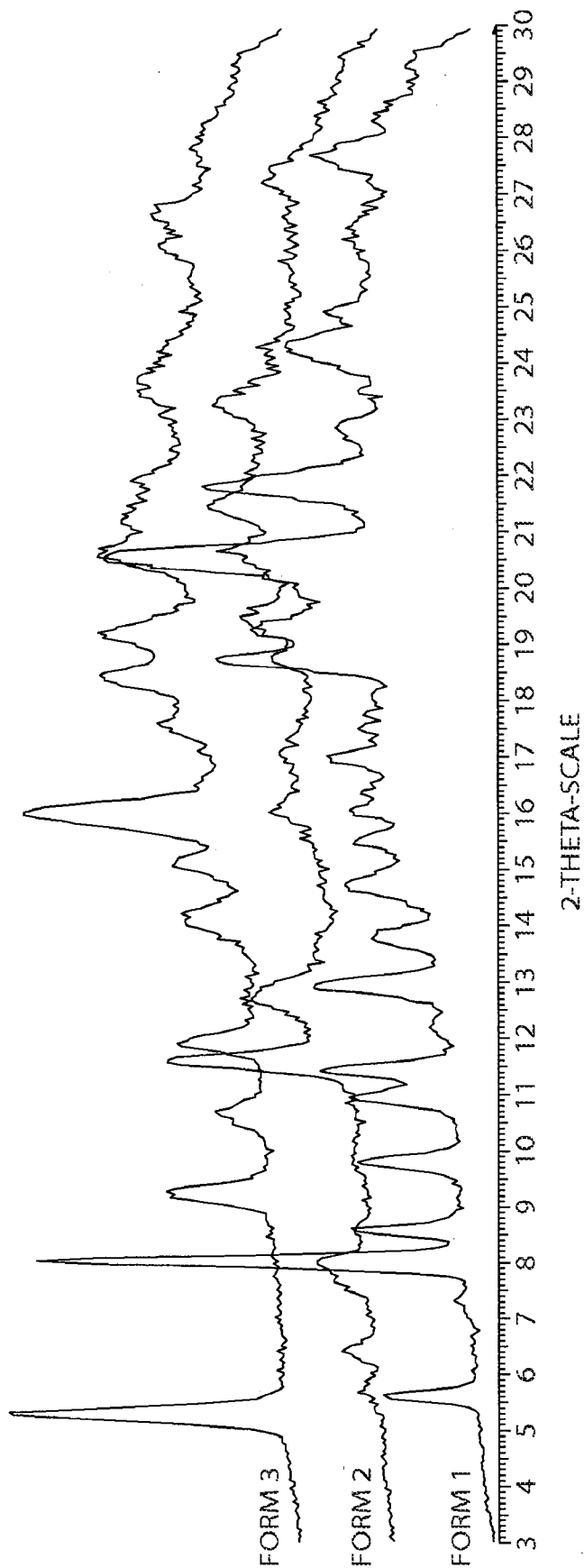


Fig. 4

61

5/10

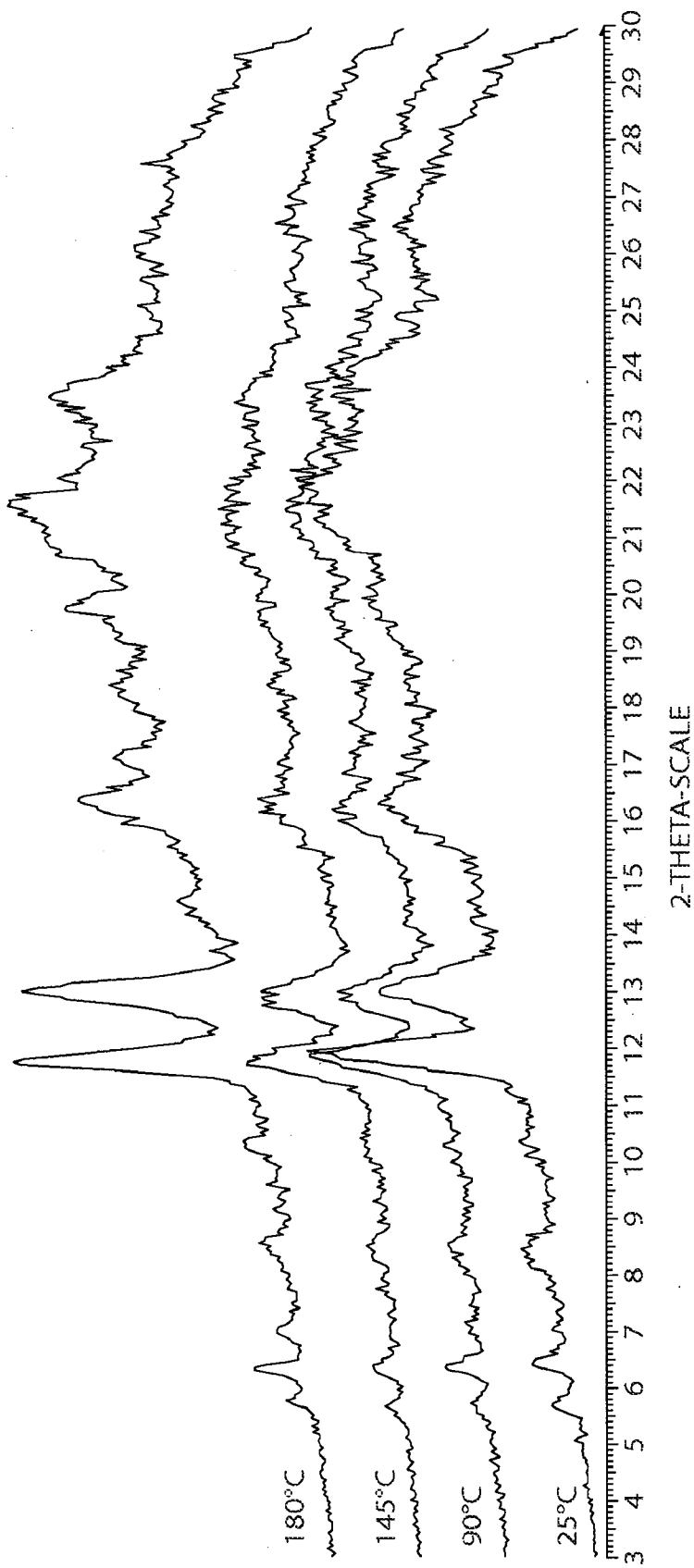


Fig. 5

62

6/10

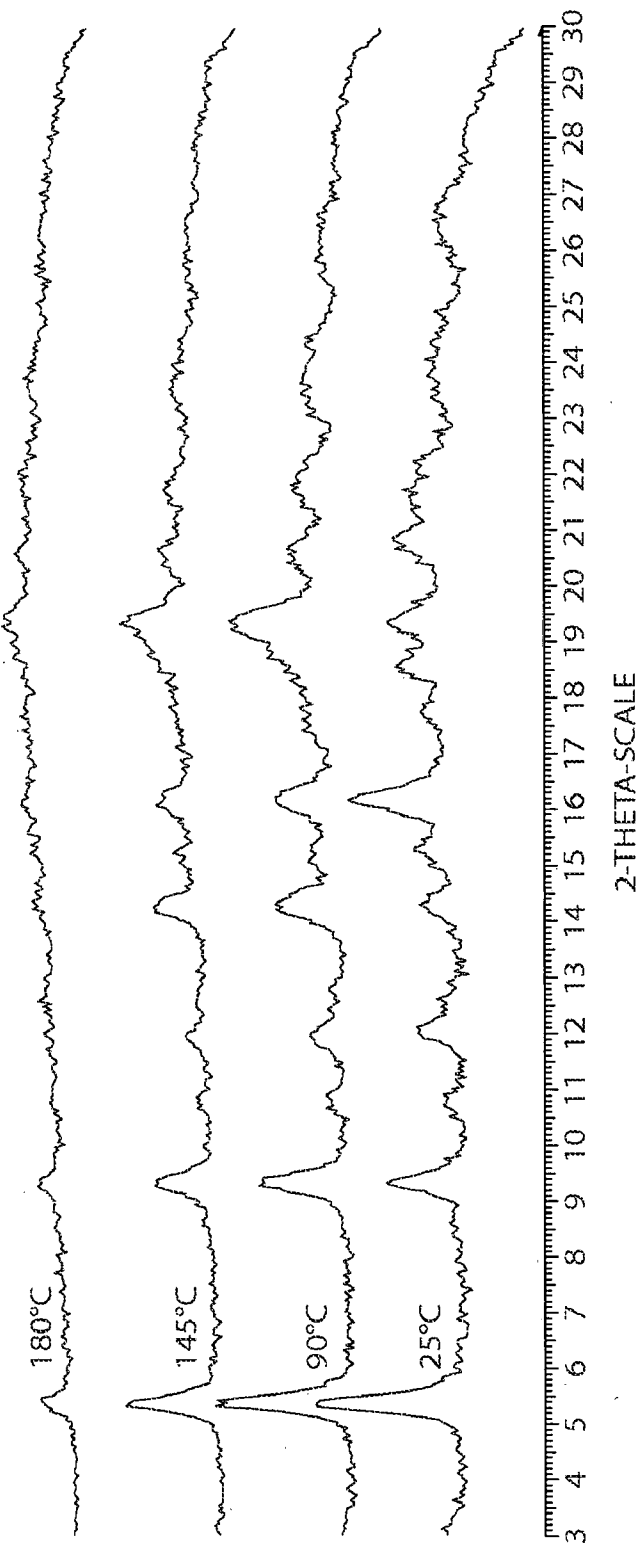


Fig. 6

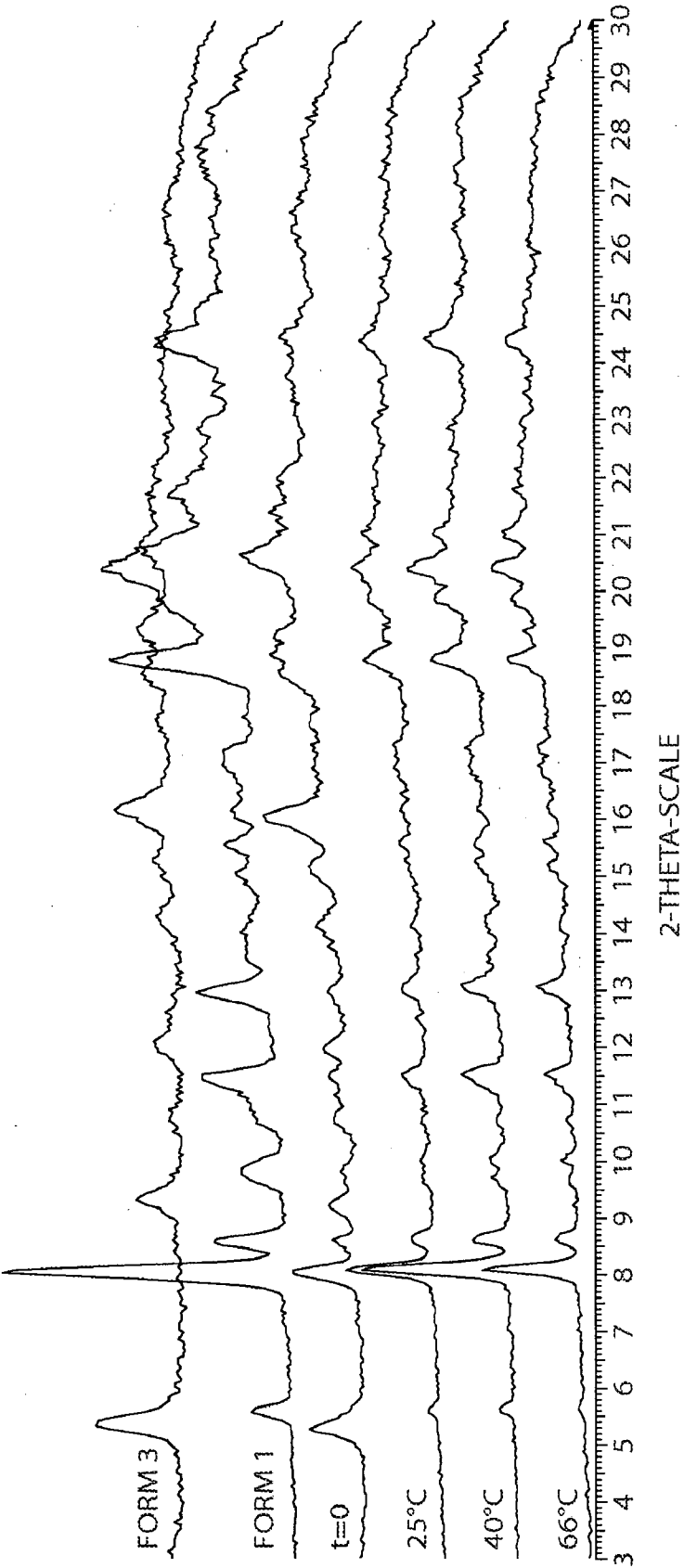


Fig. 7

69

8/10

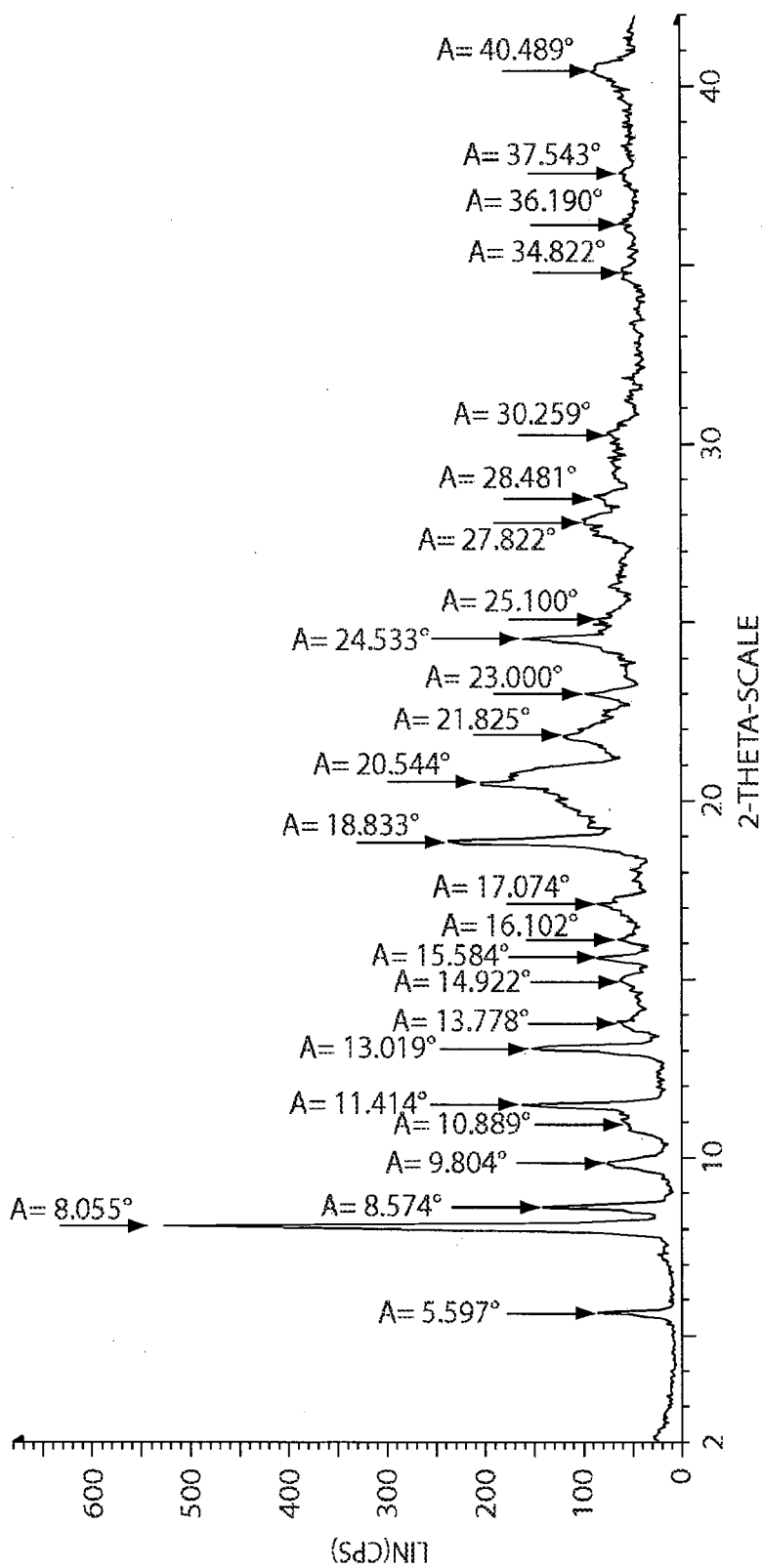


Fig. 8

65

9/10

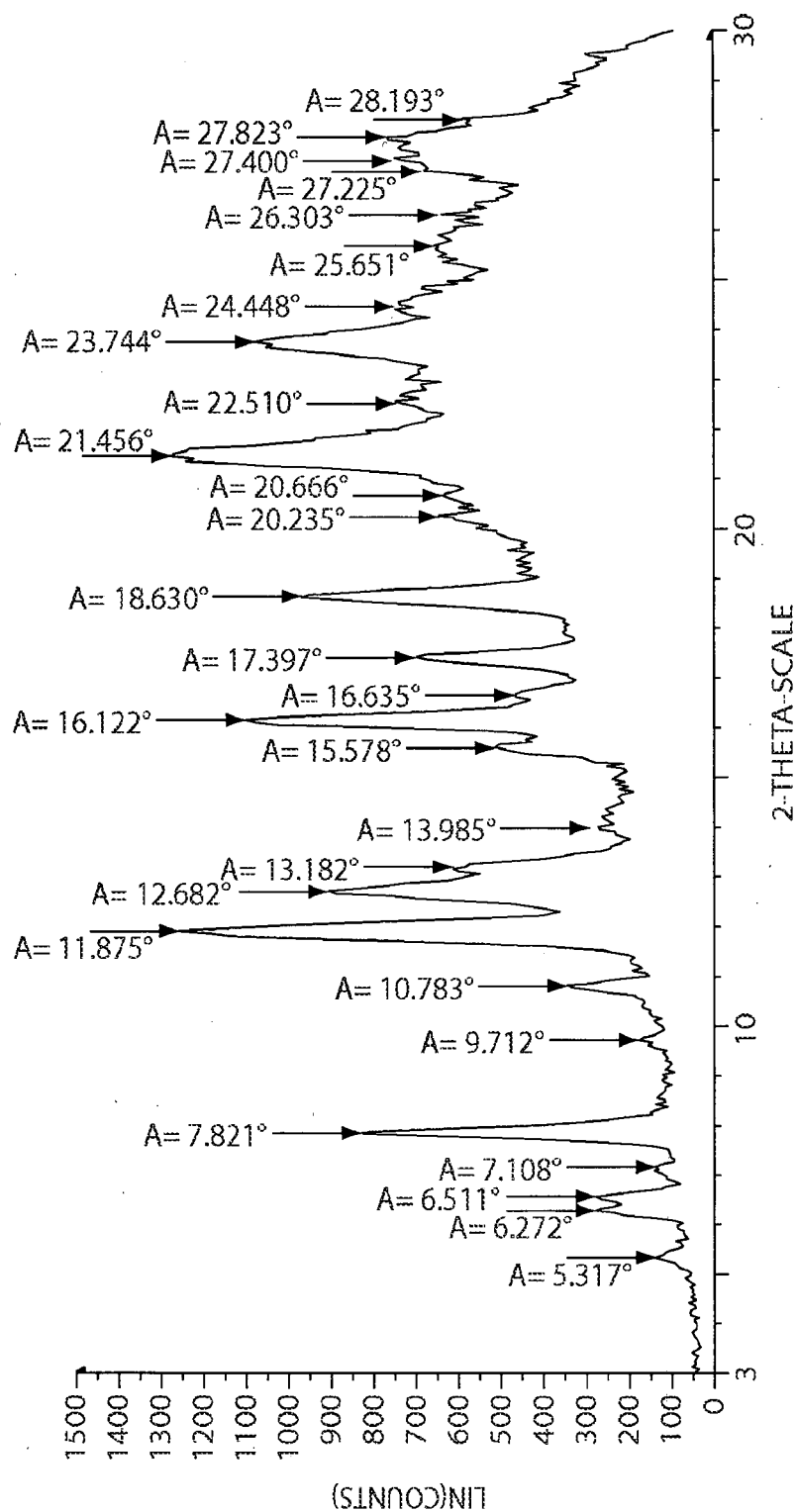


Fig. 9

66

10/10

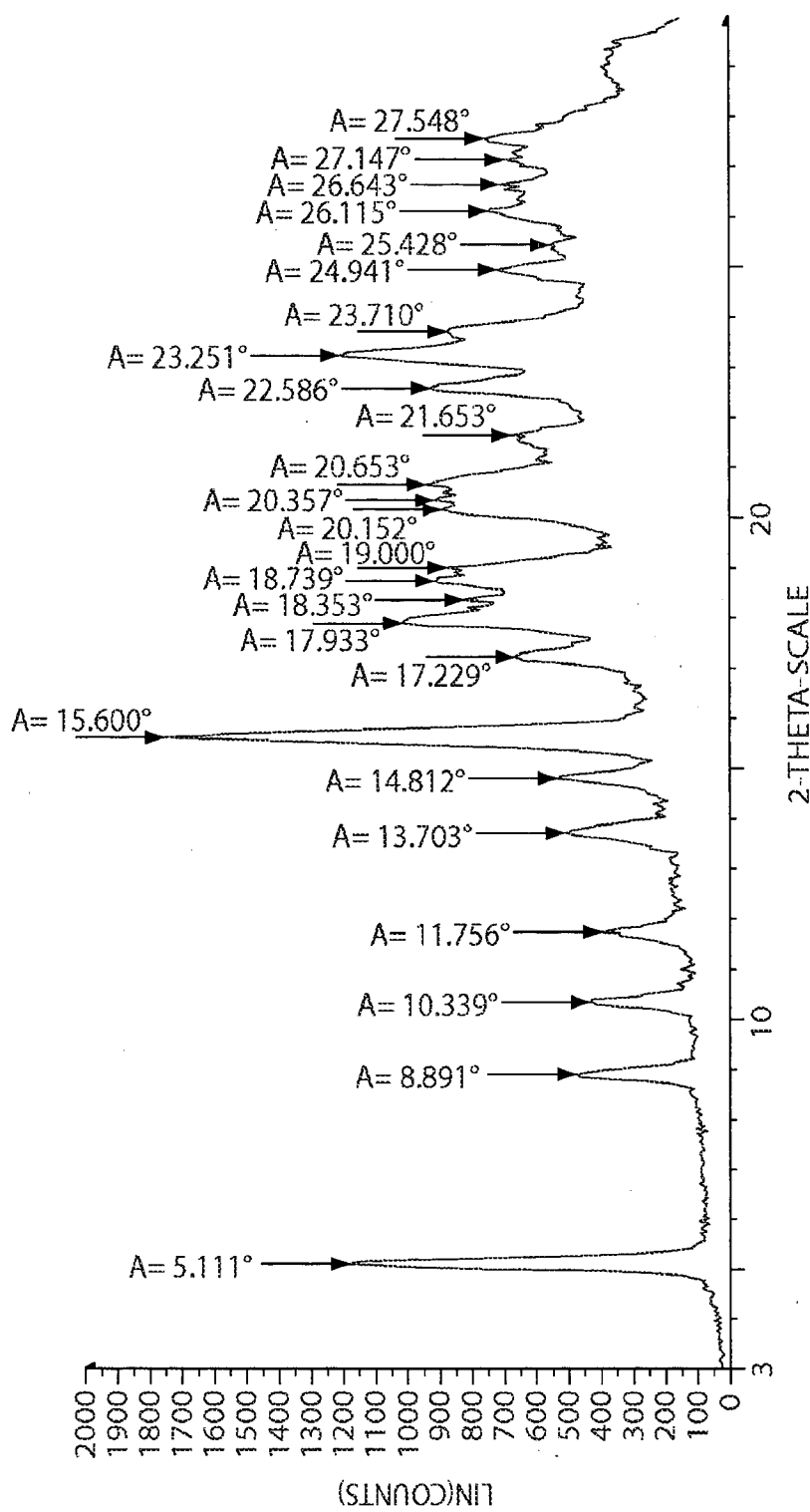
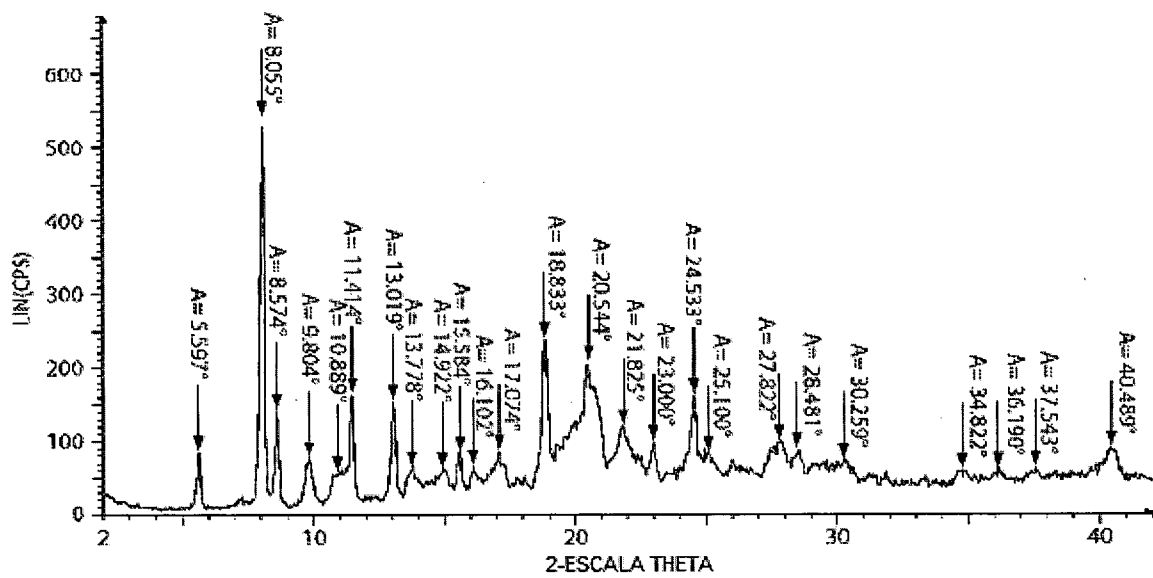


Fig. 10

Título: SALES Y POLIMORFOS DE UN COMPUESTO DE TETRACICLINA**Figura 8**

Resumen: Formas cristalinas, incluyendo sales y polimorfos, de un compuesto útil en el tratamiento de estados de respuesta al compuesto tetraciclina son presentados aquí. Los compuestos cristalinos son útiles para el tratamiento o prevención de condiciones y desordenes tales como infecciones bacteriales y neoplasmas (tumores), también como en otras aplicaciones conocidas para compuestos de tetraciclina en general.

SALES Y POLIMORFOS DE UN COMPUESTO DE TETRACICLINA

Solicitud Relacionada

[0001] Esta aplicación solicita el beneficio de prioridad bajo 35 U.S.C. 119 (e) para la Aplicación Provisional pendiente U.S. No. 61/128, 712, completada el 23 de mayo de 2008, los contenidos completos del cual están incorporados aquí por referencia.

Antecedentes de la invención

[0002] El desarrollo de antibióticos de tetraciclina fue el resultado directo de una detección sistemática de muestras del suelo recolectadas de muchas partes del mundo para evidencia de microorganismos capaces de producir composiciones bactericidas y/o bacteriostáticas. La primera de estas composiciones nuevas fue introducida en 1948 bajo el nombre de clortetraciclina. Dos años más tarde, oxitetraciclina estuvo disponible. La elucidación la estructura química de estos compuestos confirmó su similaridad y proporcionaron la base analítica para la producción de un tercer miembro de este grupo en 1952, tetraciclina. Una nueva familia de componentes de tetraciclina, sin el grupo metilo de anillo ligado presente en las primeras tetraciclinas, fue preparada en 1957 y estuvo disponible al público en 1976; y minociclina estuvo en uso para 1972.

[0003] Recientemente, esfuerzos en la investigación se han enfocado en el desarrollo de nuevas composiciones antibióticas de tetraciclina efectivas bajo la variación de condiciones terapéuticas y rutas de administración. También se han

69

investigado análogos de tetraciclina que pueden probar ser iguales o más efectivos que los originalmente introducidos compuestos de tetraciclina.

Ejemplos incluyen las Patente U.S. Nos. 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, 018, 889; 4, 024, 272; y 4, 126, 680. Estas patentes son representativas del rango de tetraciclina farmacéuticamente activa y composiciones análogas de tetraciclina.

[0004] Históricamente, pronto después de su desarrollo inicial e introducción, las tetraciclinas se encontraron altamente efectivas farmacológicamente contra rickettsias; un numero de bacterias gram-positiva y gram-negativa; y los agentes responsables por linfogranuloma venéreo, conjuntivitis de inclusión, y psitacosis. Por lo tanto, las tetraciclinas se volvieron conocidas como antibióticos "de amplio espectro". Con el subsecuente establecimiento de su actividad antimicrobial in vitro, la efectividad en las infecciones experimentales, y propiedades farmacológicas, las tetraciclinas como una categoría se volvió ampliamente usada para propósitos terapéuticos.

Sin embargo, el uso generalizado de tetraciclinas para ambos, mayores y menos enfermedades y dolencias condujo directamente a la aparición de resistencia a estos antibióticos incluso entre especies bacteriales altamente susceptibles ambas comensales y patogénicas (*por ejemplo*, neumococos y Salmonella). La aparición de organismos resistentes a la tetraciclina ha resultado en un declive general en el uso de tetraciclinas y composiciones análogas de tetraciclina como el antibiótico de elección.

[0005] Cada composición farmacéutica tiene una concentración sanguínea terapéutica optima y una concentración letal. La biodisponibilidad del compuesto determina la intensidad de la dosis en la formulación de la droga necesaria para

obtener el nivel sanguíneo ideal. Si la droga puede cristalizar tanto como dos o más polimorfos diferentes en biodisponibilidad, la dosis optima dependerá del polimorfo presente en la formulación. Algunas drogas muestran un estrecho margen entre concentraciones terapéuticas y letales. Cloranfenicol-3-palmitato (CAPP), por ejemplo, es un antibiótico de espectro amplio conocido para cristalizar en al menos tres formas polimórficas y una forma amorfa. La forma más estable, A, es comercializada.

La diferencia en bioactividad entre este polimorfo y otra forma, B, es un factor de ocho, así creando la posibilidad de sobredosis fatales del compuesto si es administrado involuntariamente como forma B debido a alteraciones durante el procesamiento y/o almacenamiento. Por consiguiente, agencias de regulación, tales como la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos, han iniciado a ejercer estrictos controles en el contenido polimórfico del componente activo en formas de dosis solidas. En general, para drogas que existen en formas polimórficas, en cualquier presentación además de su estado puro, un polimorfo preferido termodinámicamente es para ser comercializado, la agencia de regulación puede requerir monitoreo de lote por lote. Así, se vuelve importante por razones médicas y comerciales, producir y comercializar la droga pura en su más termodinámicamente estable polimorfo, sustancialmente libre de otros polimorfos favorecidos cinéticamente.

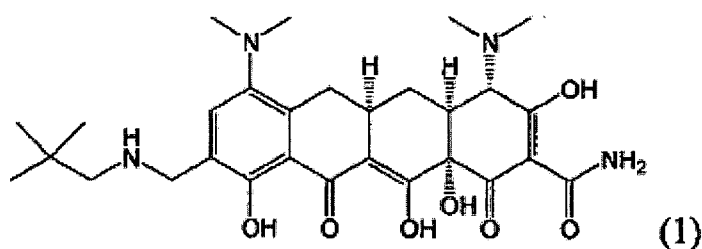
[0006] Por ejemplo, formas de sal de un compuesto, y formas polimórficas del compuesto libre o sal, son conocidas en el estado del arte farmacéutico por afectar, por ejemplo, la solubilidad, tasa de disolución, biodisponibilidad, estabilidad física y química, fluidez, fractalidad, compresión del compuesto también como la seguridad y eficiencia de productos medicinales basados en el compuesto (ver, *por ejemplo*, Knapman, Modern Drug Discovery, 2000, 3(2): 53).

[0007] En consecuencia, la identificación de una forma de sal o una base libre de un compuesto con optimas propiedades físicas o químicas promoverá el desarrollo de compuestos de tetraciclina como productos farmacéuticos. Las propiedades físicas y químicas más útiles incluyen:

Preparación fácil y reproducible, cristalinidad, no higroscopicidad, solubilidad acuosa, estabilidad para luz visible y ultravioleta, baja tasa de degradación bajo condiciones de estabilidad aceleradas de temperatura y humedad, baja tasa de isomerización entre formas isoméricas, y seguridad y administración de largo plazo para humanos.

Resumen de invención

[0008] En una representación, la invención pertenece, al menos en parte, a una forma estable en estado sólido, tales como una forma cristalina, del compuesto aminoalquilo tetraciclina, Compuesto 1:



(4S, 4AS, 5AR, 12AS)-4-7-BIS (dimetilamino)-9{[(2, 2-dimetilpropil)amino]metilo}-3, 10, 12, 12A-tetrahidroxi-1, 11-dioxo-1, 4, 4A, 5, 5A, 6, 11, 12A-octahidrotetracina-2-carboxamida (9-(2, 2-dimetil-propil-aminometil)-minociclina).

[0009] En otra representación, la invención pertenece, al menos en parte, a una sal HCl del Compuesto 1. En otra representación, la invención pertenece, al menos en parte, a una sal tosilato (p- toluenosulfonato) del Compuesto 1. En otra

721

representación, la invención pertenece, al menos en parte, a una sal mesilato del Compuesto 1.

[00010] En otra representación, la invención pertenece, al menos en parte, a una forma cristalina estable del Compuesto 1.

[00011] En otra representación, la invención pertenece, al menos en parte, a una forma cristalina de una sal del Compuesto 1. Por ejemplo, la forma cristalina estable de una sal es una forma cristalina estable de un tosilato, HCl o sal mesilato del Compuesto 1.

[00012] En otra representación, la invención pertenece, al menos en parte, a un polimorfo del Compuesto 1.

[00013] En otra representación, la invención pertenece, al menos en parte, a un polimorfo de una sal del Compuesto 1.

[00014] Por ejemplo, la invención se relaciona con un polimorfo de una sal tosilato del Compuesto 1. La invención se relaciona, en parte con un polimorfo de forma 1 del Compuesto 1. La invención se relaciona, en parte con un polimorfo de forma 2 del Compuesto 1. La invención se relaciona, en parte con un polimorfo de forma 3 del Compuesto 1.

[00015] Por ejemplo, un polimorfo de forma 1 de una sal tosilato del Compuesto 1 tiene picos de difracción de polvo de rayos X a aproximadamente 8.06, 13.02, y 18.83 °2 θ usando radiación Cu K α . En algunas representaciones, el polimorfo de forma 1 de una sal tosilato del Compuesto 1 tiene picos de difracción de polvo de

13

rayos X a aproximadamente 5.60, 8.06, 8.57, 11.41, 13.02, 15.58, 18.83, 20.54, y 24.53 °2 θ usando radiación Cu K α .

[00016] Por ejemplo, un polimorfo de forma 1 de una sal tosilato del Compuesto 1 es estable a temperaturas en un rango desde cerca a los 0 °C hasta cerca los 70 °C. En algunas representaciones, el polimorfo de forma 1 de una sal tosilato del Compuesto 1 es estable a temperaturas en un rango desde cerca los 5 °C hasta cerca los 50 °C. En algunas representaciones, el polimorfo de forma 1 de una sal tosilato del Compuesto 1 es estable a temperaturas en un rango desde cerca los 20 °C hasta cerca los 30 °C.

[00017] El polimorfo de forma 1 de una sal tosilato del Compuesto 1 puede ser obtenido por cristalización de una sal tosilato de dicho Compuesto 1 de isopropanol.

[00018] Por ejemplo, un polimorfo de forma 2 de una sal tosilato del Compuesto 1 tiene picos de patrón de difracción de polvo de rayos X a 7.82, 11.88, 16.12 y 21.46 °2 θ usando radiación Cu K α .

[00019] Por ejemplo, un polimorfo de forma 3 de una sal tosilato del Compuesto 1 tiene picos de patrón de difracción de polvo de rayos X a 5.11, 8.89, 10.34, 11.76 y 15.60 °2 θ usando radiación Cu K α .

[00020] Ya en otra representación, la invención incluye composiciones farmacéuticas que comprenden una forma cristalina del Compuesto 1 y un diluyente, excipiente o portador farmacéuticamente aceptable.

74

[00021] Por ejemplo, la composición del compuesto farmacéutico de la invención incluye una composición que comprende un polimorfo del Compuesto 1 y un diluyente, excipiente o portador farmacéuticamente aceptable.

[00022] En otra representación, el compuesto de composición farmacéutica de la invención incluye una sal del Compuesto 1 y un diluyente, excipiente o portador farmacéuticamente aceptable. Por ejemplo, la sal puede ser una sal HCl, una sal tosilato, o una sal mesilato.

[00023] En una representación, el compuesto de composición farmacéutica de la invención incluye un polimorfo de una sal del Compuesto 1 y un diluyente, excipiente o portador farmacéuticamente aceptable. Por ejemplo, el polimorfo puede ser un polimorfo de sal tosilato, sal HCl, o sal mesilato del Compuesto 1.

[00024] En algunas representaciones, la composición farmacéutica comprende un polimorfo del Compuesto 1, o una sal de este en una forma pura.

[00025] En otra representación, la composición farmacéutica de la invención incluye un polimorfo de la sal tosilato del Compuesto 1 y un diluyente, excipiente o portador farmacéuticamente aceptable. Por ejemplo, el polimorfo puede ser un polimorfo de forma 1, forma 2, o forma 3 de sal tosilato del Compuesto 1.

[00024] En algunas representaciones, la composición farmacéutica comprende y polimorfo de sal tosilato, sal HCl, o sal mesilato del Compuesto 1 en una forma pura.

[00025] En otro aspecto de la invención, la sal del Compuesto 1 es más estable que la base libre del Compuesto 1.



[00026] En otra representación, la invención incluye un método para la preparación de una forma cristalina estable del Compuesto 1.

[00027] En otra representación, la invención incluye un método para la preparación de una forma cristalina estable de una sal del compuesto 1. Por ejemplo, lo cristalino estable puede ser un cristalino de un tosilato, HCl, o sal mesilato del Compuesto 1.

[00028] En otra representación, la invención incluye un método para la preparación de un polimorfo de una sal del Compuesto 1. Por ejemplo, el polimorfo puede ser un polimorfo de un tosilato, HCl, o sal mesilato del Compuesto 1.

[00031] En otra representación, la invención incluye un método para la preparación de un polimorfo de una sal tosilato del Compuesto 1. Por ejemplo, el polimorfo puede ser un polimorfo de forma 1, una forma 2, o una forma 3 de una sal tosilato del Compuesto 1.

[00032] En una representación, la invención incluye un método para la preparación de una forma 1 de polimorfo de una sal tosilato del Compuesto 1, donde el método comprende: combinación del Compuesto 1 con un solvente para producir un líquido acuoso; y agregando ácido p-toluensulfónico. Por ejemplo, el solvente puede ser un solvente alcohólico, como isopropanol. El ácido p-toluensulfónico se provee en una cantidad desde 25 hasta 75 wt % relativo a la cantidad de dicho Compuesto 1, por ejemplo, desde 25 hasta 50 wt %, desde 30 hasta 40 wt %, o 33 wt % relativo a la cantidad de dicho compuesto 1. Por

ejemplo, el ácido p-toluensulfónico se provee en una forma de ácido p-toluensulfónico monohidrato.

[00033] Por ejemplo, el líquido acuoso es calentado antes de la adición de ácido p-toluensulfónico.

[00044] Por ejemplo, el líquido acuoso se revuelve después de la adición de ácido p-toluensulfónico. Por ejemplo, la agitación se lleva a cabo a una temperatura en un rango desde 20 °C a 25 °C. Por ejemplo, la agitación se lleva a cabo por 10 a 24 horas.

[00035] Por ejemplo, el líquido acuoso es secado. Por ejemplo, el contenido de agua del sobrenadante de dicha sustancia acuosa esta en un rango de 0.2 a 1.0 mg/mL, o en un rango de 0.4 a 0.8 mg/mL.

[00034] En otra representación, la invención incluye un método para la preparación de un polimorfo de forma 1 de una sal tosilato del Compuesto 1, donde el método comprende:

Preparación de una solución de Compuesto 1 en un solvente o combinación de solventes; y adición de una solución de ácido p-toluensulfónico en un solvente o combinación de solventes.

[00036] Por ejemplo, el solvente es un solvente alcohólico, tales como metanol, etanol, o isopropanol. Por ejemplo, la combinación de solventes incluye un solvente alcohólico. Por ejemplo, la combinación de solventes además incluye un segundo solvente alcohólico. Por ejemplo, la combinación de solventes además incluye un anti-solvente, tales como cetona, éter, y ester. Por ejemplo, el éter incluye, pero no está limitado a este, metil-t-butil éter. Por ejemplo, la combinación

77

de solventes incluye un solvente alcohólico y un anti-solvente. Por ejemplo, la combinación de solventes incluye metanol y metil-t-butil éter.

[00037] Por ejemplo, el ácido p-toluensulfónico se provee en una cantidad desde 25 a 75 wt%, desde 30 a 50 wt%, desde 35 a 45 wt%, o 40 wt% relativo a la cantidad de dicho Compuesto 1. Por ejemplo, el ácido p-toluensulfónico se provee en una forma de un ácido p-toluensulfónico monohidrato.

[00038] Por ejemplo, la solución es preparada a una temperatura en un rango desde 0 a 60 °C, a una temperatura en un rango desde 15 a 45 °C, o a una temperatura en un rango desde 20 a 25 °C.

[00039] Por ejemplo, la solución es calentada después de que es preparada. Por ejemplo, la solución es mantenida a una temperatura en un rango desde 20 hasta 50 °C, o a 45 °C aproximadamente.

[00040] Por ejemplo, el método además comprende la adición de una semilla de cristal de sal monotosilato del Compuesto 1 para producir un líquido acuoso. El líquido acuoso puede ser revuelto por 10 a 24 horas o por cerca de 22 horas. El líquido acuoso puede ser revuelto a una temperatura en un rango desde 15 a 45 °C o a cerca de 20 °C. El líquido acuoso puede ser secado. Por ejemplo, el contenido de agua del líquido acuoso esta en un rango de 1 a 10 wt %, o en un rango de 2 a 6 wt %, o cerca de 3 wt %.

[00041] En otra representación, la invención incluye un método para la preparación de un polimorfo de forma 1 de una sal tosilato de Compuesto 1, donde el método comprende: disolución de una base libre de Compuesto 1 en un primer solvente o combinación de solventes para formar una primera solución; disolución

78

de ácido p-toluensulfónico en un segundo solvente o combinación de solvente para formar una segunda solución ; y combinación de dicha primera y segunda solución para formar una tercera solución.

[00042] En una representación, el primer y segundo solvente o combinación de solventes puede ser el mismo o diferente. En otra representación, el solvente puede ser un solvente alcohólico, tales como metanol, etanol, e isopropanol. En otra representación, la combinación de solventes es una combinación de dos solventes alcohólicos, incluyendo, pero no limitándose a etanol e isopropanol. En un ejemplo preferido, la relación volumen a volumen de etanol e isopropanol es de 2 a 1. Ya en otra representación, la combinación de solventes es una combinación que incluye, pero no se limita a estos, un solvente alcohólico y un anti-solvente (*por ejemplo*, una cetona, un éter, un ester, *etc.*). Por ejemplo, la combinación de solventes es una combinación que incluye, pero no está limitada a estos, metanol y metil-t-butil éter. En ejemplo preferido, la relación volumen a volumen de metanol y metil-t-butil es de 1 a 1.2.

[00043] En otra representación, el método además comprende la adición de una sal tosilato de polimorfo de forma 1 de Compuesto 1 a la tercera solución para formar una cuarta solución. Por ejemplo, la sal tosilato de polimorfo de forma 1 es un cristal de semilla. En algunas representaciones, la cuarta solución forma un líquido acuoso cuando se revuelve. La sustancia acuosa puede ser lavada con un solvente o una combinación de solventes, que pueden ser el mismo o diferentes del primer solvente o combinación de solvente, o el segundo solvente o combinación de solventes. La sustancia acuosa puede ser secada.

[00044] En otra representación, la invención se relaciona a una composición pura que comprende el Compuesto 1, donde la composición es aproximadamente

89

90-100%, preferiblemente 95-100%, más preferiblemente 98-100% (wt./wt.) o 99-100% (wt./wt.) pura; por ejemplo, menos de cerca de 10%, menos de cerca de 5%, menos de cerca de 2% o menos de cerca de 1% de impureza está presente. Tales impurezas incluyen, por ejemplo, productos de degradación, productos oxidados, epímeros, solventes, y/o otras impurezas indeseables.

[00045] En otra representación, la invención incluye un método para el tratamiento de un estado de respuesta a la tetraciclina en un sujeto, a través de la administración de una cantidad efectiva al sujeto de una forma cristalina de Compuesto 1. Por ejemplo, es sujeto es un sujeto humano.

[00047] En otra representación, la invención incluye un método para el tratamiento de un estado de respuesta a la tetraciclina en un sujeto, a través de la administración de una cantidad efectiva al sujeto de una sal estable de Compuesto 1. Por ejemplo, la sal estable es un tosilato, un HCl, o una sal mesilato de Compuesto 1.

[00048] En otra representación, la invención incluye un método para el tratamiento de un estado de respuesta a la tetraciclina en un sujeto, a través de la administración de una cantidad efectiva al sujeto de un polimorfo de Compuesto 1.

[00049] En otra representación, la invención incluye un método para el tratamiento de un estado de respuesta a la tetraciclina en un sujeto, a través de la administración de una cantidad efectiva al sujeto de un polimorfo de sal de Compuesto 1. Por ejemplo, el polimorfo puede ser un polimorfo de un tosilato, un HCl, o una sal mesilato de Compuesto 1.



[00050] En otra representación, la invención incluye un método para el tratamiento de un estado de respuesta a la tetraciclina en un sujeto, a través de la administración de una cantidad efectiva al sujeto de un polimorfo de sal tosilato de Compuesto 1. Por ejemplo, el polimorfo de tosilato puede ser un polimorfo de forma 1, formar 2, o de forma 3 de sal tosilato de Compuesto 1.

[00051] Por ejemplo, el estado de respuesta a la tetraciclina es una infección bacteriana. La infección bacteriana puede estar asociada con bacteria gram positivo, o bacteria gram negativo.

En algunas representaciones, la infección bacteriana está asociada con *E. Coli*, *S. aureus*, o *E. faecalis*.

[00052] En algunas representaciones, la infección bacteriana es resistente a otros antibióticos de tetraciclina, los cuales incluyen, pero no se limita a estos, tetraciclina, minociclina, doxiciclina, sanciclina, metaciclina, apiciclina, clomociclina, pipaciclina, mepilciclina, megluciclina, guameciclina, penimociclina, y etamociclina.

Descripción Breve de los Diagramas

FIGURA 1 provee un patrón de difracción de polvo de rayos X de una muestra que comprende Compuesto 1 cristalino a 25 °C;

FIGURA 2 provee un patrón de difracción de polvo de rayos X a 25 °C de un material de partida (E00285), sal tosilato de forma 1, sal tosilato de forma 2, sal tosilato de forma 3, y forma de sal tosilato amorfo de Compuesto 1;

81

FIGURA 3 provee una comparación de patrones de difracción de polvo de rayos X a 25 °C para Compuesto 1 cristalino (E00285) y una muestra que comprende sal tosilato de forma 1, obtenida de la recristalización de sal tosilato amorfo de Compuesto 1 en IPA;

FIGURA 4 provee una comparación patrones de difracción de polvo de rayos X a 25 °C para muestras que comprenden sal tosilato de forma 1, sal tosilato de forma 2, y sal tosilato de forma 3 que fueron secadas de una día para otro en un vacío;

FIGURA 5 provee un análisis de difracción de polvo de rayos X de temperatura variable que muestras que comprenden sal tosilato de forma 2;

FIGURA 6 provee un análisis de difracción de polvo de rayos X de temperatura variable que muestras que comprenden sal tosilato de forma 3;

FIGURA 7 provee un análisis de difracción de polvo de rayos X de temperatura variable que muestras que comprenden una sustancia acuosa de una mezcla 50:50 de sal tosilato de forma 1 y sal tosilato de forma 3 en IPA;

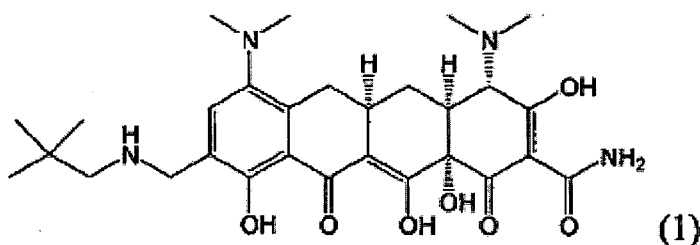
FIGURA 8 provee un patrón de difracción de polvo de rayos X de alta resolución que una muestra que comprende sal tosilato de forma 1 de Compuesto 1;

FIGURA 9 provee un patrón de difracción de polvo de rayos X de alta resolución que una muestra que comprende sal tosilato de forma 2 de Compuesto 1 (93.2% HPLC de pureza);

FIGURA 10 provee un patrón de difracción de polvo de rayos X de alta resolución que una muestra que comprende sal tosilato de forma 3 de Compuesto 1 (96.7% HPLC de pureza).

Descripción Detallada de la Invención

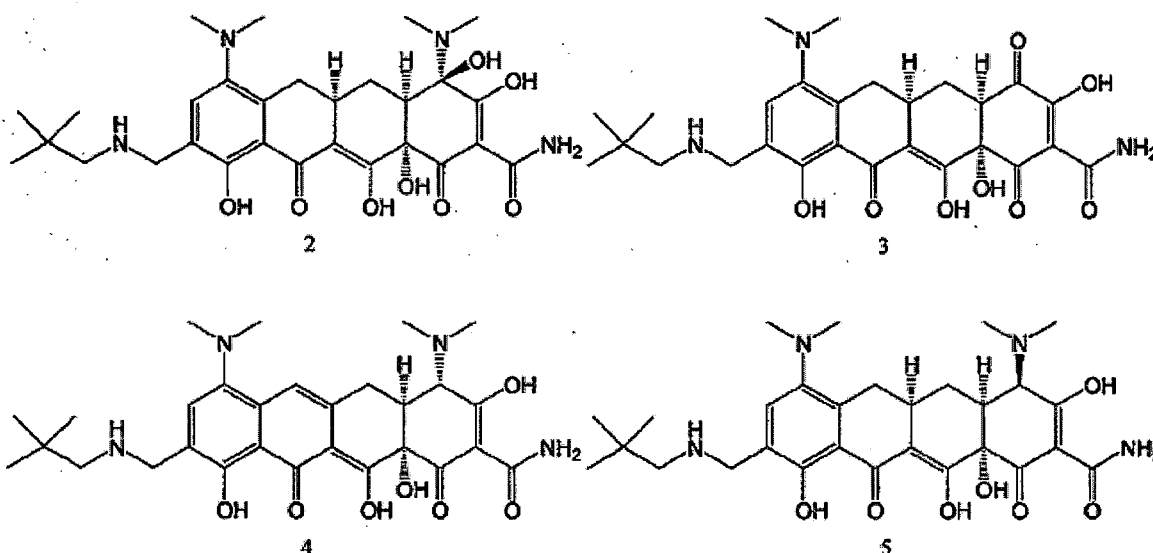
[00053] Compuestos antibióticos del tipo tetraciclina se han conocido por largo tiempo por tener estabilidad limitada en la forma de base libre de fase solida. Uno de esos compuestos análogos de tetraciclina no cristalinos, (4S, 4AS, 5AR, 12AS)-4-7-Bis(dimetilamino)-9-[[(2, 2-dimetilpropil)amino]metil]-3, 10, 12, 12A-tetrahidroxi-1, 11-dioxo-1, 4, 4A, 5, 5A, 6, 11, 12A-octahidrotetracina-2-carboxamida (Compuesto 1; MW= 556.66, MF= C₂₉H₄₀N₄O₇), tiene estabilidad limitada en la fase solida bajo exposición al aire, luz y/o humedad.



(4S, 4AS, 5AR, 12AS)-4-7-BIS (dimetilamino)-9-[[(2, 2-dimetilpropil)amino]metilo]-
3, 10, 12, 12A-tetrahidroxi-1, 11-dioxo-1, 4, 4A, 5, 5A, 6, 11, 12A-
octahidrotetracina-2-carboxamida

[00054] Específicamente, el Compuesto 1 es un sólido amorfo amarillo que es inestable a temperaturas superiores a 0 °C y cuando se expone al aire. El Compuesto 1 debe ser almacenado a temperaturas bajo cero grados centígrados con limitada exposición en la fase solida al aire, luz y humedad.

Fuera de estas condiciones de exposición limitadas, el Compuesto 1 se degrada para producir productos de degradación incluyendo productos de degradación de aire 2, 3 y 4, también como el 4-epi-isomero 5.



[00055] Anterior a esta exposición, no eran conocidas formas cristalinas no estables o sales acidas cristalinas estables del Compuesto 1.

[00056] La presente invención se relaciona con el Compuesto 1 cristalino, formas de sal del Compuesto 1, formas polimórficas del Compuesto 1 o formas polimórficas de sales del Compuesto 1; composiciones farmacéuticas que comprenden las formas cristalinas, formas de sales, formas polimórficas, formas de sales, formas polimórficas, o formas polimórficas de sales del Compuesto 1; y métodos de su uso para el tratamiento de estados de respuesta a la tetraciclina.

1. Compuestos en Forma Solida

[00057] Compuesto 1 es un compuesto de tetraciclina. El término "compuesto de tetraciclina" incluye muchos compuestos con una estructura de anillo similar a la tetraciclina. Ejemplos de compuestos de tetraciclina incluyen: tetraciclina,

84

clortetraciclina, oxitetraciclina, demeclociclina, metaciclina, sanciclina, doxiciclina, y minociclina.

[00058] La base libre y ciertas sales aceptables farmacéuticamente de Compuesto 1 son descritas en la aplicación U.S. Ser. No. 10/786, 881, correspondiente a la Publicación U.S. No. 2005/0026876 A1. No hay enseñanza o sugestión de formas cristalinas del Compuesto 1, o que algunas de las formas de sales descritas son superiores a las otras, como se juzga por la lista de propiedades descritas arriba.

[00059] Entonces, la presente invención conduce la necesidad de compuestos de tetraciclina mejorados y la necesidad de formas en estados sólido mejoradas de compuestos de tetraciclina para manufactura y biodisponibilidad.

[00060] La forma en estado sólido del compuesto de tetraciclina, Compuesto 1, puede ser una forma cristalina. La forma cristalina del compuesto puede ser una base libre. Formas cristalinas de diferentes sales del compuesto base libre pueden ser formadas. Ejemplos de ácidos que pueden ser usados para convertir la base libre en una sal incluyen, pero no sin limitados a estos, HCl, ácido p-toluensulfónico, ácido trifluoroacético, ácido metilsulfónico, ácido benzenelsulfónico, y ácido acético.

[00061] Las formas neutrales de los compuestos pueden ser regenerados contactando la sal con una base o ácido y aislando el compuesto padre en la manera convencional. La forma padre del compuesto puede diferir de varias formas de sales en ciertas propiedades físicas, tales como solubilidad en solventes opuestos (polares).

85

[00062] Como se describe aquí, un proceso a través del cual diferentes formas cristalinas del Compuesto 1 pueden ser generadas ha sido desarrollado. Más específicamente, los inventores han mostrado que la forma cristalina obtenida principalmente depende la naturaleza del solvente usado en el proceso. Para el propósito de esta descripción el término "forma cristalina" se refiere a una forma polimórfica o a una forma no amorfa, sin distinción. "Forma polimórfica" se refiere a una estructura organizada que involucra solamente moléculas del soluto y que tiene una forma cristalina característica.

[00063] Los términos, "polimorfos" y "formas polimórficas" y términos relacionados aquí se refieren a formas cristalinas de la misma molécula, y diferentes polimorfos pueden tener diferentes propiedades físicas tales como, por ejemplo, temperaturas de derretimiento, calores de fusión, solubilidades, tasas de disolución y/o espectros vibracionales como un resultado de la disposición o conformación de las moléculas en el enrejado cristalino. Las diferencias en propiedades físicas exhibidas por polimorfos afectan parámetros farmacéuticos tales como estabilidad de almacenamiento, compresibilidad y densidad (importante en formulación y manufactura de producto), y tasas de disolución (un importante factor en biodisponibilidad).

Diferencias en estabilidad pueden también resultar de cambios en reactividad química (*por ejemplo*, oxidación diferencial, de manera que una forma de dosis decolora más rápidamente cuando está comprendida de un polimorfo que cuando está comprendida de otro polimorfo) y propiedad mecánica (*por ejemplo*, los comprimidos se desmoronan en almacenamiento dado que un polimorfo favorecido cinéticamente se convierte en un polimorfo más estable termodinámicamente) o ambos (*por ejemplo*, comprimidos de un polimorfo son más susceptibles al quiebre a alta humedad).

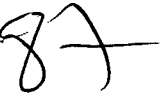


Como un resultado de diferencias de solubilidad/disolución, en el caso extremo, algunas transiciones polimórficas pueden resultar en escasez de potencia o, en el otro extremo, toxicidad. En adición, las propiedades físicas del cristal pueden ser importantes en el procesamiento, por ejemplo, un polimorfo puede ser más probable para formar solvatos o podría ser difícil para filtrar y lavar libre de impurezas (*por ejemplo*, forma de partículas y distribución de tamaño podrían ser diferentes entre polimorfos).

[00064] Polimorfos de una molécula pueden ser obtenidos por un numero de métodos, como se conoce en el estado de la técnica. Tales métodos incluyen, pero no se limitan a estos, recristalización de fusión, enfriamiento de fusión, recristalización de solvente, desolvatación, evaporación rápida, enfriamiento rápido, enfriamiento lento, difusión de vapor y sublimación.

[00065] Las técnicas para la caracterización de polimorfos incluyen, pero no se limitan a estos, calorimetría de escaneo diferencia (DSC), difractometría de polvo de rayos X, difractometría de rayos X de cristal único, espectroscopia vibracional, *por ejemplo*, espectroscopia de IR y Raman, NMR de estado sólido, microscopía óptica de etapa caliente, microscopía de electro de escaneo (SEM), cristalografía de electrón y análisis cuantitativo, análisis de tamaño de partícula (PSA), análisis de área de superficie, estudios de solubilidad y estudios de disolución.

[00066] El término, "solvato", según se usa aquí, se refiere a una forma de cristal de una sustancia que contiene solvente. El término "hidrato" se refiere a un solvato donde el solvente es agua.



[00067] Un solvato desolvatado es una forma de cristal de una sustancia que puede ser solamente hecha removiendo el solvente de un solvato.

[00068] El término, "forma amorfa", según se usa aquí, se refiere a una forma no cristalina de una sustancia.

[00069] Según se usa aquí, el término "puro" significa cerca del 90-100%, preferiblemente 95-100%, más preferiblemente 98-100% (wt./wt.) o 99-100% (wt./wt.) compuesto puro; por ejemplo, menos que cerca de 10%, menos que cerca de 5%, menos que cerca de 2% o menos que cerca de 1% de impureza está presente.

Tales impurezas incluyen, por ejemplo, productos de degradación, productos oxidados, epímeros, solventes, y/u otras impurezas no deseadas.

[00070] Según se usa aquí, un compuesto es "estable" donde cantidades significativas de productos de degradación no son observados bajo condiciones constantes de humedad, exposición a la luz y a temperaturas superiores a 0 °C sobre un periodo de cuatro semanas. Un compuesto no es considerado estable a una cierta condición cuando las impurezas de la degradación aparecen o un porcentaje de área de las impurezas existentes comienza a crecer. La cantidad de degradación crece como una función del tiempo es importante para determinar la estabilidad del compuesto.

[00071] Todos los rangos establecidos aquí adelante pretenden abarcar los puntos finales indicados del rango así como todos rangos y valores incluidos, incluyendo aquellos no establecidos específicamente adelante.

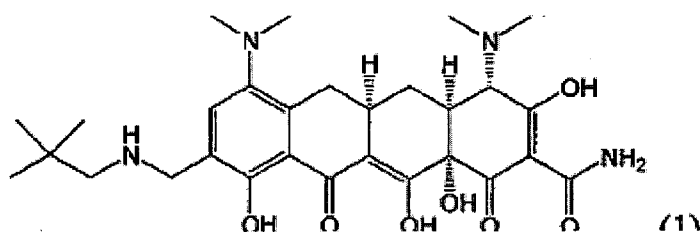
78

[00072] La presente invención está dirigida a formas cristalinas, formas de sales y polimorfos del Compuesto 1; composiciones que comprenden formas cristalinas, sales y polimorfos solamente o en combinación con otros ingredientes activos; métodos para la preparación de lo cristalino, sales y polimorfos; y métodos de su uso en la modulación de estados receptivos de compuestos de tetraciclina. Aunque no se pretende la limitación por parte de alguna teoría particular de operación, propiedades de estabilidad de almacenamiento, compresibilidad, densidad o disolución de las formas cristalinas, sales y polimorfos son beneficiosas para manufactura, formulación y biodisponibilidad del compuesto de tetraciclina.

[00073] Sales y polimorfos preferidos de la invención son aquellos que están caracterizados por propiedades físicas, *por ejemplo*, estabilidad, solubilidad, higroscopicidad y tasa de disolución, apropiados para formas de dosis clínicas y terapéuticas. Polimorfos preferidos de la invención son aquellos caracterizados por propiedades físicas, *por ejemplo*, morfología del cristal, compresibilidad y dureza, apropiado para manufactura de una forma de dosis sólida. Tales propiedades pueden ser determinadas usando técnicas como difracción de rayos X, microscopía, espectroscopia IR, análisis térmico y análisis de higroscopicidad, como se describe aquí y conocido en el estado de la técnica.

1.1. Sales del Compuesto 1

[00074] En un aspecto, la presente invención provee formas cristalinas de sales particulares farmacéuticamente aceptables del Compuesto 1. Este aspecto de la invención provee formas cristalinas de HCl, sales mesilato y tosilato del Compuesto 1:



89

(4S, 4AS, 5AR, 12AS)-4-7-BIS (dimetilamino)-9{[(2, 2-dimetilpropil)amino]metilo}-
3, 10, 12, 12A-tetrahidroxi-1, 11-dioxo-1, 4, 4A, 5, 5A, 6, 11, 12A-
octahidrotetracina-2-carboxamida

[00075] Cada sal de la invención puede ser hecha de la preparación del Compuesto 1. El compuesto 1 puede ser sintetizado u obtenido de acuerdo con cualquier método evidente para aquellos con habilidades en la técnica. En representaciones preferidas, el Compuesto 1 es preparado de acuerdo con los métodos descritos en detalle en los ejemplos abajo. Ver, *por ejemplo*, Publicación U.S. No. 2005/0026876 A1, los contenidos del cual están incorporados por referencia en su totalidad.

[00076] Alternativamente, el Compuesto 1 puede ser preparado separando una sal particular del Compuesto 1 y convirtiendo tal sal del Compuesto 1 a la forma neutral por tratamiento con una base apropiada. Por ejemplo, el Compuesto 1 puede ser preparado aislando el clorhidrato de sal del Compuesto 1 por filtración, luego convirtiendo este a la forma neutral por tratamiento con carbonato de sodio monobásico en acetato etílico, u otra base apropiada.

[00077] El Compuesto 1 preparado por cualquier método puede ser contactado con un ácido apropiado, puro (*por ejemplo*, libre de adiciones o dilución) o en un solvente inerte apropiado o solventes, para producir las formas de sales de la invención. Por ejemplo, el Compuesto 1 puede ser contactado con un ácido p-toluensulfónico para producir las formas de sales tosilato de la invención.

90

[00078] Estudios de estabilidad fue realizados el Compuesto 1 de base libre y una sal diHCl amorfa del Compuesto 1. Esta sal fue formada disolviendo el compuesto en solución acuosa, ajustando el pH de la solución a aproximadamente 4.2, seguido por liofilización. La base libre degradada en menos de un mes a 40 °C, y aproximadamente tres meses a 4 °C. En contraste, la sal diHCl del Compuesto 1 fue estable por 6 meses a 40 °C, y por dos años a temperatura de salón (25 °C).

[00079] Como se muestra en detalle en los ejemplos más adelante, la sal tosilato del Compuesto 1, y polimorfos de este, presentan propiedades deseables.

1.2. Polimorfos del Compuesto 1

[00080] La presente invención también provee polimorfos del Compuesto 1. En ciertas representaciones, los polimorfos de la invención son polimorfos de sal tosilato del Compuesto 1.

[00081] Cada polimorfo de la invención puede ser hecho de una preparación del compuesto 1. El Compuesto 1 sólido puede ser disuelto y luego cristalizado de las mezclas de solvente descritas abajo para producir las formas polimórficas de la invención. En particular representaciones de la invención, una sal de tosilato del Compuesto 1 puede ser disuelta y luego cristalizada de las mezclas de solvente descritas abajo para producir ciertas formas polimórficas de la invención. En algunas representaciones de la invención, la base libre del Compuesto 1 puede ser disuelta y luego ácido es añadido para formar una sal cristalina del Compuesto 1.

91

[00082] En una representación, la presente invención provee un polimorfo de una sal tosilato del Compuesto 1.

[00083] En otra representación, la invención provee un polimorfo de forma 1 de la sal tosilato del Compuesto 1, que tiene un patrón de difracción de polvo de rayos X similar al de la FIGURA 8, las características del patrón de difracción son mostradas en la Tabla 1. Por ejemplo, un polimorfo particular de forma 1 de la invención tiene picos de patrón de difracción de polvo de rayos X a 5.60, 8.06, 8.57, 11.41, 13.02, 15.58, 18.83, 20.54 y 24.53 °2Θ usando radiación Cu Kα. Por ejemplo, un polimorfo particular de forma 1 de la invención tiene picos de patrón de difracción de polvo de rayos X a 8.06, 13.02, 18.83 y 24.53 °2Θ. Por ejemplo, un polimorfo particular de forma 1 de la invención tiene picos de patrón de difracción de polvo de rayos X a 8.06 y 18.83 °2Θ.

Tabla 1

Angulo (2-Theta °)	Valor d (Angstrom)	Intensidad (Cuentas)	Intensidad (%)
5.60	15.78	347	15.9
8.06	10.97	2184	100.0
8.57	10.30	581	26.6
9.80	9.01	308	14.1
10.89	8.12	233	10.7
11.41	7.75	667	30.5
13.02	6.79	626	28.7
13.78	6.42	261	12.0
14.92	5.93	252	11.5
15.58	5.68	346	15.8
16.10	5.50	262	12.0
17.07	5.19	345	15.8
18.83	4.71	979	44.8
20.54	4.32	838	38.4

C92

Angulo (2-Theta °)	Valor d (Angstrom)	Intensidad (Cuentas)	Intensidad (%)
21.83	4.07	489	22.4
23.00	3.86	395	18.1
24.53	3.63	661	30.3
25.10	3.55	341	15.6
27.82	3.20	404	18.5
28.48	3.13	357	16.3
30.26	2.95	302	13.8
34.82	2.57	236	10.8
36.19	2.48	254	11.6
37.54	2.39	247	11.3
40.49	2.23	368	16.8

[00084] En otra representación, la presente invención provee una forma 2 de sal tosilato del Compuesto 1. En una representación, el polimorfo de forma 2 de la sal tosilato del Compuesto 1 tiene un patrón de difracción de polvo de rayos X similar al de la FIGURA 9, las características del patrón de difracción se muestran todas en la Tabla 2. Por ejemplo, un polimorfo particular de forma 2 de la invención tiene picos de patrón de difracción de polvo de rayos X a 7.82, 11.88, 12.68, 16.12, 18.63, 21.46 y 23.74 °2 θ usando radiación Cu K α . Por ejemplo, un polimorfo particular de forma 2 de la invención tiene picos de patrón de difracción de polvo de rayos X a 7.82, 11.88, 16.12 y 21.46 °2 θ . Por ejemplo, un polimorfo particular de forma 2 de la invención tiene picos de patrón de difracción de polvo de rayos X a 11.88 y 16.12 °2 θ .

Tabla 2

Angulo (2-Theta °)	Valor d (Angstrom)	Intensidad (Cuentas)	Intensidad (%)
5.317	16.62224	135	10.6
6.272	14.09246	275	21.5
6.511	13.57561	274	21.5
7.108	12.43554	137	10.8
7.821	11.30413	827	64.8
9.712	9.10741	173	13.5

Angulo (2-Theta °)	Valor d (Angstrom)	Intensidad (Cuentas)	Intensidad (%)
10.783	8.20461	340	26.6
11.875	7.4528	1258	98.6
12.682	6.97995	904	70.8
13.182	6.7162	611	47.9
13.985	6.33261	299	23.4
15.578	5.68838	512	40.1
16.122	5.49766	1100	86.2
16.635	5.32915	467	36.6
17.397	5.09763	697	54.7
18.63	4.76275	967	75.8
20.235	4.38856	647	50.7
20.666	4.298	636	49.8
21.456	4.14147	1276	100
22.51	3.9499	747	58.6
23.744	3.7473	1076	84.3
24.448	3.64103	749	58.7
25.651	3.47293	652	51.1
26.303	3.38824	638	50
27.225	3.27554	678	53.2
27.4	3.25505	747	58.5
27.823	3.20648	763	59.8
28.193	3.16532	588	46.1

[00085] En otra representación, la presente invención provee una forma 3 del Compuesto 1. En otras representaciones, el polimorfo de forma 3 de la sal tosilato del Compuesto 1 tiene un patrón de difracción de polvo de rayos X similar al de la

PH

FIGURA 10, las características del patrón de difracción se muestran todas en la Tabla 3. Por ejemplo, un polimorfo particular de forma 3 de la invención tiene picos de patrón de difracción de polvo de rayos X a 5.11, 8.89, 10.34, 11.76, 13.70, 14.81 y 15.60 °2 θ usando radiación Cu K α . Por ejemplo, un polimorfo particular de forma 3 de la invención tiene picos de patrón de difracción de polvo de rayos X a 5.11, 8.89, 10.34, 11.76 y 15.60 °2 θ . Por ejemplo, un polimorfo particular de forma 3 de la invención tiene picos de patrón de difracción de polvo de rayos X a 5.11 y 15.60 °2 θ .

Tabla 3

Angulo (2-Theta °)	Valor d (Angstrom)	Intensidad (Cuentas)	Intensidad (%)
5.11	17.29	1184	66.4
8.89	9.95	475	26.6
10.34	8.56	431	24.2
11.76	7.53	404	22.7
13.70	6.46	524	29.4
14.81	5.98	552	31
15.60	5.68	1783	100
17.23	5.15	661	37.1
17.93	4.95	1014	56.9
18.35	4.83	832	46.6
18.74	4.74	914	51.3
19.00	4.67	874	49
20.15	4.41	889	49.9
20.36	4.36	913	51.2
20.65	4.30	940	52.7
21.65	4.10	681	38.2
22.59	3.94	923	51.8
23.25	3.83	1206	67.7
23.71	3.75	872	48.9
24.94	3.57	718	40.3
25.43	3.50	551	30.9
26.12	3.41	745	41.8
26.64	3.35	709	39.8
27.15	3.28	689	38.7
27.55	3.24	754	42.3

[00086] La sal tosilato del Compuesto 1 cristalizado en partículas muy pequeñas e irregulares, típicamente 5-8 micrones. La FIGURA 1 representa difracción de polvo de rayos X (XRPD) de un sólido cristalino de la sal tosilato del Compuesto 1. Se ha mostrado que este compuesto se derrite a 190 °C, seguido por descomposición.

96

[00087] Una Sorción de vapor gravimétrico fue realizada en el Compuesto 1 o su sal soluto. Se determinó que había 2.5 moléculas de agua por molécula del Compuesto 1. XRPD fue ejecutado para comparar el material inicial (E00285) con el material deshidrato. La información indicada no cambia en forma.

2. Síntesis de Compuesto 1

[00088] 9-(aminometil)-minociclina dihidrocloruro (200 mg, 1 eq.), DMF y trimetil-acetaldehído (45 μ l, 1 eq.) fueron combinados en matraces de 40 mL y agitados. Trietilamina (150 μ L, 3 eq.) fue entonces agregada. Después de agitar a temperatura ambiente por varios minutos, $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$ (175 mg, 2 eq.) y InCl_3 (9 mg, 0.1 eq.) fueron agregados. Después de una hora, la reacción fue limpia y roja. La cromatografía líquida mostro un único producto para la reacción. La reacción fue enfriada con metanol, el solvente fue removido, y el producto fue purificado usando cromatografía de columna.

Purificación

[00089] El compuesto 1 fue purificado por cromatografía inyectando una solución acuosa de bajo pH del compuesto en un HPLC en un gradiente de solvente orgánico polar, y combinando las fracciones de producto, de manera que el producto fue purificado. La selección de fases móviles acidas apropiadas mejoran la estabilidad del proceso y la selectividad. Fases móviles acidas orgánicas y minerales fueron efectivas en la separación por productos incluyendo impurezas de epímeros y elución cercana por productos a través del control de pH y escogencia de ácido. Fases móviles acidas también protegidas contra degradación oxidativa del compuesto.

97

[00090] Por ejemplo, la solución de bajo pH tenía un pH de entre 2 y 3. Ejemplos de soluciones que fueron usadas incluyen 0.1 % de solución acuosa de ácido sulfónico de metano y 0.1 % de solución acuosa de ácido trifluoroacético. En ciertas representaciones, un gradiente isocrático de 94% de la solución acuosa y 6% de acetonitrilo u otro solvente orgánico polar fueron usados para purificar el compuesto de epímeros y elución cercana por productos.

[00091] Las fracciones de producto acuoso resultando pueden ser combinadas y el pH puede ser ajustado a un valor entre 4.0 y 4.5 usando un base (*por ejemplo*, NaOH). Impurezas hidrofóbicas y gradientes oxidativos del compuesto pueden ser removidos lavando la solución acuosa con un solvente orgánico no polar (*por ejemplo*, CH₂Cl₂). Las capas orgánicas fueron descartadas y las capas acuosas fueron combinadas y retenidas.

[00092] Se debe notar que los solvente orgánicos, tales como cloruro de metileno, pueden ser usados para remover selectivamente impurezas hidrofóbicos de tardía elución tales como 4-carbonil por productos y otros degradantes oxidativos de la solución acuosa acida del compuesto.

[00093] El pH de las capas acuosas combinadas puede entonces ajustarse a un pH neutro, *por ejemplo*, aprox. 7.5 a aprox. 8.5. El pH puede ser ajustado por adición de una base, como NaOH. La solución neutral fue entonces lavada con un solvente orgánico no polar, como cloruro de metileno. Se debe notar que el ajuste del pH selectivo a rangos de pH neutral también permite al compuesto ser extraído en el solvente orgánico mientras se retienen β-epímeros indeseados y por productos en la fase acuosa.

[00094] Adicionalmente, antioxidantes pueden ser también agregados a la solución acuosa de los compuestos descritos aquí. Los antioxidantes pueden proveídos para prevenir la degradación oxidativa de los compuestos. Antioxidantes tales como sulfitos de amonio o bisulfitos se pueden usar.

3. Métodos de Preparación de Formas Polimórficas del Compuesto 1

[00095] La invención también pertenece a métodos para la preparación de formas polimórficas de compuesto 1 cristalino.

[00096] En una representación, la forma 1 de la sal tosilato del Compuesto 1 puede ser hecha por cualquier método para preparación de la forma 1 evidente para aquellos con habilidades en la técnica basado en lo presentado aquí. En ciertas representaciones, la forma 1 puede ser formada de la maduración de la sal tosilato amorfa del Compuesto 1 en isopropanol, acetona, acetato de etilo, pentanona de metilo, tolueno o solución de acetonitrilo. La forma 1 puede también ser obtenida de la cristalización de la sal tosilato amorfa convertida en sustancia acuosa en isopropanol. La forma 1 también puede ser obtenida disolviendo la base libre en un solvente apropiado o combinación de solventes tales como dos alcoholes o un alcohol y un anti solvente como cetona, éter, ester, etc. Después de la adición del ácido, la sal puede ser lentamente cristalizada en la forma correcta.

[00097] El sistema de solvente en el cual las impurezas y la base libre del Compuesto 1 son solubles mientras la sal cristalina estable del Compuesto 1 es insoluble, *por ejemplo*, una sustancia acuosa cristalina puede ser formada por precipitación, puede ser seleccionado.

99

[00098] En otra representación, la forma 2 de la sal tosilato del Compuesto 1 puede ser hecha por cualquier métodos de preparación de la forma 2 evidente para aquellos con habilidades en la técnica basado en la expuesto aquí. En ciertas representaciones, la forma 2 puede ser formada de la maduración de la sal tosilato amorfa del Compuesto 1 en diclorometano.

[00099] En otra representación, la forma 3 de la sal tosilato del Compuesto 1 puede ser hecha por cualquier métodos de preparación de la forma 3 evidente para aquellos con habilidades en la técnica basado en la expuesto aquí. En ciertas representaciones, la forma 3 puede ser formada de la maduración de la sal tosilato amorfa del Compuesto 1 en metil etil cetona, acetato de etilo o pentanona de metilo. La forma 3 puede también ser obtenida de la maduración de la forma 1 en pentanona de metilo.

[000100] En otras representaciones, las formas polimórficas de sal de tosilato del Compuesto 1 descritas arriba pueden ser producidas por métodos que incluyen los pasos de combinación del Compuesto 1 con un solvente para producir una sustancia acuosa, a agregando ácido p-toluensulfónico.

[000101] Cualquier solvente apropiado puede ser usado para crear la sustancia acuosa. Solventes que pueden ser usados en representaciones incluyen solventes alcohólicos como isopropanol. Cualquier combinación apropiada de solvente puede ser usada para crear la solución desde la cual la sal se cristaliza. Combinaciones de solvente que podrían ser usadas en representaciones incluyen, pero no se limitan a estas, metanol y metil-t-butil éter o etanol e isopropanol.



[000102] Por ejemplo, una sustancia acuosa del Compuesto 1 en un solvente o una combinación de solventes puede ser producida a una temperatura desde aproximadamente 0 °C hasta cerca los 60 °C, así como desde aproximadamente 15 °C hasta cerca los 45 °C, o desde aproximadamente 20 °C hasta cerca los 25 °C. Después de que este es producido, la sustancia acuosa puede de manera opcional ser calentada y/o mantenida a una temperatura desde aproximadamente 15 °C hasta cerca los 60 °C, así como desde aproximadamente los 20 °C hasta cerca los 50 °C, o aproximadamente a 45 °C.

[000103] Una vez la sustancia acuosa es creada, el ácido p-toluensulfónico puede ser agregado en una cantidad suficiente para producir una sal de ácido p-toluensulfónico del Compuesto 1. En una representación, el ácido p-toluensulfónico se provee en una cantidad desde aproximadamente 25 hasta 75 wt%, desde aproximadamente 25 hasta 50 wt%, desde aproximadamente 30 hasta 40 wt%, o aproximadamente 33 wt% relativo a la cantidad del Compuesto 1. El ácido p-toluensulfónico puede ser agregado en la forma de un monohidrato de ácido p-toluensulfónico.

[000104] Formas polimórficas de la sal tosilato del Compuesto 1 pueden ser formadas por un método de solución. Por ejemplo, una solución del Compuesto 1 puede ser producida a una temperatura desde cerca los 0 °C hasta cerca los 60 °C, así como desde cerca los 15 °C hasta cerca los 45 °C, o desde cerca los 20 °C hasta cerca los 25 °C. Después de que este es producido, la solución puede opcionalmente ser calentada y/o mantenida a una temperatura desde cerca los 15 °C hasta cerca los 60 °C, así como desde cerca los 20 °C hasta cerca los 50 °C, o cerca a los 45 °C.

(01)

[000105] Una vez la solución es preparada, el ácido p-toluensulfónico puede ser agregado en una cantidad suficiente para producir una sal de ácido p-toluensulfónico del Compuesto 1. En una representación, el ácido p-toluensulfónico se provee en una cantidad desde aproximadamente 25 a aproximadamente 75 wt%, desde aproximadamente 35 a aproximadamente 45 wt%, o aproximadamente 40 wt% relativo a la cantidad del Compuesto 1. El ácido p-toluensulfónico puede ser agregado en la forma de un monohidrato de ácido p-toluensulfónico.

[000106] En una representación, un polimorfo de forma 1 usado para sembrar la solución puede ser agregado. Cualquier solvente apropiado puede ser usado para formar la solución de ácido p-toluensulfónico. Solventes apropiados incluyen solventes alcohólicos, tales como isopropanol o combinaciones de solventes como metanol y metil-t-butil éter. En una representación preferida, la relación vol./vol. de metanol a metil-t-butil éter es 2:1. Solventes apropiados incluyen una combinación de dos o más solventes alcohólicos, como una combinación de etanol e isopropanol. En una representación preferida, la relación vol./vol. de etanol a isopropanol es 2:1. En representaciones particulares, la solución de ácido p-toluensulfónico incluye en mismo solvente usado para crear la sustancia acuosa o la solución del Compuesto 1.

[000107] Después de la adición de ácido p-toluensulfónico en el solvente apropiado, una sustancia acuosa del polímero de forma 1 de la sal tosilato del Compuesto es formado. El contenido de agua del sobrenadante de la sustancia acuosa puede ser ajustado para un nivel apropiado seguido por la adición del ácido p-toluensulfónico. Típicamente, el contenido de agua del sobrenadante de la sustancia acuosa puede estar en un rango desde los 0.2 hasta cerca 1.0

mg/mL, así como desde los 0.4 hasta cerca 0.8 mg/mL, *por ejemplo*, aproximadamente 0.6 mg/mL, 0.54 mg/mL, etc.

[000108] Seguido de la adición del ácido p-toluensulfónico, la sustancia acuosa o la solución pueden ser agitadas para producir una sustancia acuosa cristalina. La actividad de agitación puede ser realizada por más de 48 horas. Sin embargo, la actividad de agitación es típicamente ejecutada por un periodo aproximadamente de 5 a 36 horas, así como desde 10 a 24 horas o aproximadamente 18 horas.

[000109] La actividad de agitación puede ser realizada a cualquier temperatura apropiada para la producción de la sustancia acuosa cristalina. Por ejemplo, la sustancia acuosa puede ser agitada a una temperatura desde los 0 °C a los 60 °C, así como desde los 15 °C a los 45 °C o desde los 20 °C a los 25 °C.

[000110] Después de la formación de cristal, la sustancia acuosa cristalina puede ser filtrada para remover el sobrenadante, y los cristales pueden ser lavados con cualquier solvente apropiado. En representaciones, los cristales pueden ser lavados de una a cuatro veces, y el solvente puede ser cualquier solvente apropiado para la preparación de la sustancia acuosa cristalina. En particular, el solvente usado para lavar los cristales puede ser el mismo solvente o solventes usados para formar la sustancia acusa o solución original, o la solución de ácido p-toluensulfónico.

[000111] Los cristales producidos pueden entonces ser secados para remover el exceso de solvente por cualquier método apropiado. Por ejemplo, el secado puede ser realizado por uno o más métodos que incluyen, pero está limitado por estos, elevadas temperaturas en un rango desde los 0 °C a los 60 °C, así como

103

desde los 15 °C a los 45 °C; soplado de nitrógeno seco sobre los cristales; y soplado de nitrógeno humedecido sobre los cristales.

[000112] Estudios de maduración fueron realizados en los cuales una muestra de la sal tosilato del Compuesto 1 fue suspendida en diferentes solventes, filtrada, y el sólido húmedo fue analizado por XRPD. Tres formas polimórficas de la sal tosilato del Compuesto 1 fueron observados. La FIGURA 2 representa el espectro XRPD del material inicial (E00285), sal tosilato de forma 1, sal tosilato de forma 2, sal tosilato de forma 3, y la forma amorfa del Compuesto 1.

[000113] La Tabla 4 lista los solventes usados para experimentos de maduración.

Tabla 4

Ejemplo No.	Solvente	Forma
1	Agua	Forma 1
2	Nitrometano	Amorfo
3	Anisol	Forma 2
4	2-propanol	Forma 1
5	Metil cetona	Forma 3
6	Acetona	Forma 1
7	Acetato de etilo	Forma 1
8	Dioxano	Amorfo
9	Acetonitrilo	Forma 1
10	Tolueno	Forma 1
11	Diclorometano	Forma 2
12	Cloroformo	Amorfo
13	TBME	Amorfo

104

14	Acetato de Isopropilo	Forma 2
15	NMP	Disuelto
16	4-metil-2-pentanona	Forma 3
17	THF	Goma
18	10% EtOAc / Ciclohexano	Amorfo
19	10% Agua EtOH	Amorfo
20	10% Agua / THF	Amorfo
21	10% Agua / ACN	Amorfo
22	10% Agua / 2-propanol	Amorfo
23	10% Agua / acetona	Amorfo
24	10% Agua / dioxano	Amorfo

[000114] Recristalización del material amorfo del Compuesto 1 fue ejecutado en varios solventes. Solamente recristalización en 2-propanol (Alcohol isopropílico, IPA) dio sal tosilato de forma 1, como se muestra en la Tabla 5. La FIGURA 3 compara el espectro XRPD del Compuesto 1 de referencia (E00285) y la sal tosilato de forma 1 cristalizada de IPA.

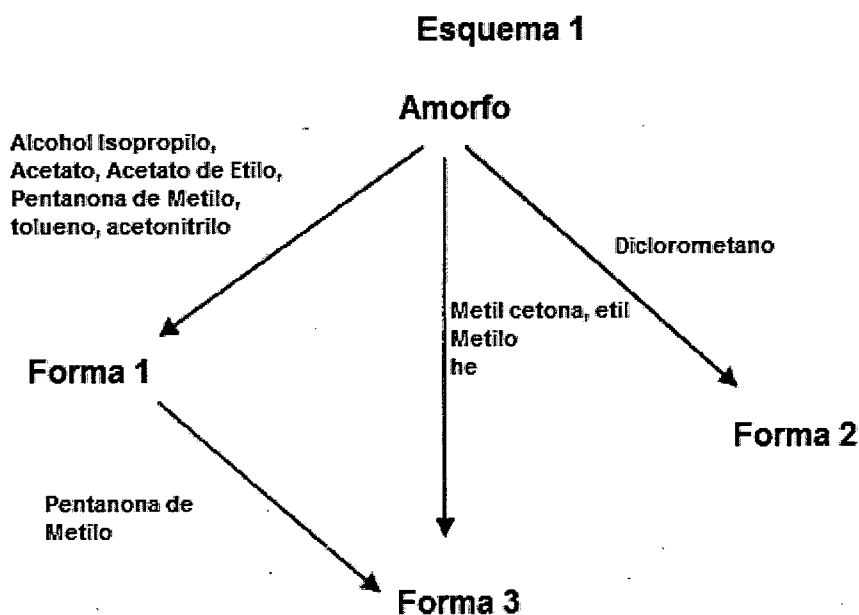
705

Tabla 5

Experimento No.	Solvente	Volumen	A 50 °C	XRPD de precipitado de sólido
1	Nitrometano	24	Soluble	
2	Anisol	200	Insoluble	Amorfo
3	2-propanol	60	Soluble	Amorfo
4	Metil cetona	100	Soluble	Amorfo
5	Acetona	80	Soluble	Amorfo
6	Acetato de etilo	200	Insoluble	Amorfo
7	Dioxano	120	Soluble	Amorfo
8	Acetonitrilo	80	Soluble	
9	Tolueno	200	Insoluble	Amorfo
10	Diclorometano	5	Soluble	Amorfo
11	Cloroformo	5	Soluble	Amorfo
12	TBME	200	Insoluble	Amorfo
13	Acetato de Isopropilo	200	Insoluble	Amorfo
14	4-metil-2-pentanona	200	Insoluble	Amorfo
15	THF	100	Soluble	Amorfo
16	10 % EtOAc / Ciclohexano	200	Insoluble	Amorfo

[000115] Un resumen del polimorfismo de la sal tosilato del Compuesto 1 es presentado en el Esquema 1:

106



[000116] Después de la cristalización, muestras de sal tosilato de forma 1, forma 2 y forma 3 fueron secados de un día para otro al vacío y analizados por XRPD, como se muestra en la FIGURA 4. No hubo cambio en forma después del secado.

[000117] XRPD de temperatura variable fue ejecutado en sal tosilato de forma 2 y forma 3 del Compuesto 1. Ver FIGURA 5 y FIGURA 6, respectivamente.

[000118] La estabilidad relativa de las formas polimórficas del Compuesto 1 fueron analizadas. Por ejemplo, la sal tosilato de forma 1 fue sometida a un experimento de maduración por 24 horas en IPA o metilo pentanona, sembrada con sal tosilato de forma 2 o forma 3. Durante este experimento, no hubo cambio de la forma 1 en la forma 2 o 3. Una sustancia acuosa de una mezcla 50:50 de la forma 1 y la forma 3 fueron analizadas en IPA por 18 horas a 0 °C, 25 °C, 40 °C, y



60 °C, como se muestra en la FIGURA 7. No hubo cambio de la forma 1 en la forma 3.

[000119] Experimentos de recristalización indicaron que sal tosilato de forma 1 puede ser obtenida reproducible a partir de la sal tosilato amorfa por suspensión en IPA. La forma 1 del Compuesto 1 puede ser obtenida reproducible por la adición de ácido tosic. Una exploración XRPD de alta resolución de la forma 1 es representada en la FIGURA 8 y las características del patrón de difracción son mostradas en la Tabla 1.

4. Composiciones Farmacéuticas que Comprenden Compuestos, Sales, Formas Cristalinas o Polimorfos de este de la Invención

[000120] En otra representación, la invención pertenece a composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto de tetraciclina de la invención (*por ejemplo*, sintetizado, o purificado por los métodos de la invención) o una sal aceptable farmacéuticamente, profármaco o ester de este. Las composiciones farmacéuticas pueden comprender un portador farmacéuticamente aceptable.

[000121] El término "composición" como es usado aquí pretende abarcar un producto que incluye los ingredientes especificados (y en las cantidades especificadas, si se indica), así como cualquier producto que resulte, directa o indirectamente, de la combinación de los ingredientes específicos en las cantidades especificadas. Por "farmacéuticamente aceptable" se quiere decir que el diluyente, excipiente o portador debe ser compatible con los otros ingredientes de la formulación y no deletéreo para el beneficiario (recibidor) de este.

108

[000122] Como se estableció anteriormente, ciertas representaciones de los presentes compuestos pueden contener un grupo funcional básico, tales como amino o alquilo amino, y son entonces, capaces de formar sales farmacéuticamente aceptables con ácidos farmacéuticamente aceptables. El término "sales farmacéuticamente aceptables" es reconocido en el estado de la técnica e incluye sales de adición de ácido relativamente no toxico, inorgánico y orgánico de compuestos de la presente invención. Estas sales pueden ser preparadas *in situ* durante la purificación y aislamiento final de los compuestos de la invención, o por la reacción separada de un compuesto purificado de la invención en su forma de base libre con un apropiado ácido orgánico o inorgánico, y aislando la sal entonces formada.

Sales representativas incluyen el bromhidrato, hidrocloreto, sulfato, bisulfato, fosfato, nitrato, acetato, valerato, oleato, palmitato, estearato, laurato, benzoato, lactato, fosfato, tosilato, citrato, maleato, fumarato, succinato, tartrato, naptilato (naphylate), mesilato, glucoheptonato, lactobionato, y sales de laurilsulfonato, y por el estilo. (Ver, por ejemplo, Berge entre otros. (1977) "Pharmaceutical Salts", J. Farm. SCI. 66: 1-19).

[000123] En otros casos, los compuestos de la presente invención pueden contener uno o más grupos funcionales ácidos, así, son capaces de formar sales farmacéuticamente aceptables con bases farmacéuticamente aceptables. El término "sales farmacéuticamente aceptables" en estas instancias incluyen sales de adición de base relativamente no toxicas, inorgánicas y orgánicas de compuestos de la presente invención. Estas sales pueden también ser preparadas *in situ* durante el aislamiento y purificación final de los compuestos, o por reacción separada del compuesto purificado en su forma de ácido libre con una base apropiada, como hidróxido, carbonato o bicarbonato de un catión

metálico farmacéuticamente aceptable, con amoniaco o con una amina orgánica primaria, secundaria o terciaria farmacéuticamente aceptable. Sales de tierra álcalis y alcalinas incluyen las sales de litio, sodio, potasio, calcio, magnesio, y aluminio y similares. Aminas orgánicas representativas útiles para la formación de sales de adición de base incluyen etilamina, dietilamina, etilendiamina, piperazina, y similares.

[000124] El término “esteres farmacéuticamente aceptables” se refiere a los productos relativamente no tóxicos, esterificados de compuestos de la presente invención. Estos esteres pueden ser preparados en *in situ* durante la purificación y aislamiento final de los compuestos, por la reacción separada del compuesto purificado en su forma de ácido libre o hidroxilo con un apropiado agente esterificante. Ácidos carboxílicos pueden ser convertidos en esteres a través de un tratamiento con alcohol en la presencia de un catalizador. Hidroxilos pueden ser convertidos en esteres a través de un tratamiento con un agente esterificante como halogenuros alcanoil. El término también incluye grupos de hidrocarburos inferiores capaces de ser solvatados bajo condiciones fisiológicas, *por ejemplo*, esteres de alquilo, metilo, etilo y esteres de propilo. (Ver, por ejemplo, Berge entre otros, *Supra.*).

[000126] La invención también pertenece a compuestos de tetraciclina, los cuales son sintetizados y/o purificados por los métodos de la invención, y sales de estos farmacéuticamente aceptables.

[000126] La frase “portador farmacéuticamente aceptable” es reconocido en el estado de la técnica e incluye un material farmacéuticamente aceptable, composición o vehículo, apropiado para la administración de compuestos de la presente invención para mamíferos. Los portadores incluyen relleno líquido o

110

sólido, diluyente, excipiente, solvente o material de encapsulación, envuelto en el transporte del agente sujeto desde un órgano, o porción del cuerpo, a otro órgano, o porción del cuerpo. Cada portador debe ser "aceptable" en el sentido de que es compatible con los otros ingredientes de la formulación y no dañino para el paciente. Algunos ejemplos de materiales que pueden servir como portadores farmacéuticamente aceptables incluyen: azúcares, tales como lactosa, glucosa y sacarosa; almidones, tales como almidón de maíz y de papa; celulosa y sus derivados, tales como carboximetilcelulosa sódica, etil celulosa y acetato de celulosa; tragacanto en polvo; malta; talco; excipientes, tales como manteca de cacao y ceras de supositorio; aceites, tales como aceite de cacahuate, aceite de algodón, aceite de cártamo, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de soya; glicoles, propilenglicol; polioles, tales como glicerina, sorbitol, manitol y polietilenglicol; ésteres, tales como etil oleato y laurato de etilo; agar; neutralizantes, tales como hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio; ácido algínico; agua libre de pirógenos; solución salina isotónica; solución de Ringer; alcohol etílico; solución neutralizadora de fosfato; y otras soluciones compatibles no tóxicas empleadas en formulaciones farmacéuticas.

[000127] Agentes humectantes, emulsificadores y lubricantes, tales como lauril sulfato de sodio y estearato de magnesio, también como agentes colorantes, agentes de liberación, agentes de recubrimiento, agentes endulzantes, agentes saborizantes y perfumantes, preservativos y antioxidantes pueden también estar presentes en las composiciones.

[000128] Ejemplos de antioxidantes farmacéuticamente aceptables incluyen: antioxidantes solubles en agua, tales como ácido ascórbico, clorhidrato de cisteína, bisulfato de sodio, metabisulfito de sodio, sulfito de sodio y similares; antioxidantes solubles en aceite, tales como palmitato de ascorbilo,

11

butilhidroxianisol (BHA), butilhidroxitolueno (BHT), lecitina, propil galato, α -tocoferol, y similares; agentes quelantes metálicos, tales como ácido cítrico, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico, y similares.

[000129] Formulaciones de la presente invención incluyen aquellas para administración oral, nasal, tópica, transdérmica, bucal, sublingual, rectal, vaginal y/o parenteral. Las formulaciones pueden ser convenientemente ser presentadas la forma de dosis como unidad y puede ser preparada por cualquier método bien conocido en el arte de la farmacia. La cantidad de ingrediente activo que puede ser combinado con un material portador para producir una forma de dosis única generalmente será aquella cantidad de compuesto que produce un efecto terapéutico. Generalmente, de cada cien por ciento, esta cantidad variará desde un uno por ciento hasta un noventa y nueve por ciento de ingrediente activo, preferiblemente desde un cinco por ciento hasta un setenta por ciento, más preferiblemente desde un diez por ciento hasta un treinta por ciento.

[000130] Métodos para la preparación de estas formulaciones o composiciones incluyen los pasos de asociar un compuesto de la presente invención con el portador y, opcionalmente, uno o más ingredientes secundarios. En general, las formulaciones son preparadas asociando uniforme e íntimamente un compuesto de la presente invención con portadores líquidos, o finamente portadores sólidos divididos, o ambos, y luego, si es necesario, dando forma al producto.

[000131] Formulaciones de la invención apropiadas para administración oral pueden estar en la forma de capsulas, sellos, píldoras, tabletas, pastillas (usando un base saborizada, usualmente sacarosa y acacia o tragacanto), polvos, gránulos, o como una solución o una suspensión en un líquido acuso o no acuoso,

12

o como una emulsión de aceite en agua o de agua en aceite, o como un elixir o jarabe, o como pastillas (usando una base inerte, como gelatina y glicerina, o sacarosa y acacia) y/o lavados bucales y similares, cada uno conteniendo una cantidad predeterminada de un compuesto de la presente invención como un ingrediente activo. Un compuesto de la presente invención puede también ser administrado como un bolo, electuario o pasta.

[000132] En formas de dosis solidas de la invención para administración oral (capsulas, tabletas, píldoras, grageas, polvos, gránulos y similares), el ingrediente activo es mezclado con uno o más portadores farmacéuticamente aceptables, tales como citrato de sodio o fosfato dicálcico y/o cualquiera de los siguientes: rellenos o extensores, tales como almidones, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol y/o ácido silícico; aglutinantes, tales como carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidona, sacarosa y/o acacia; humectantes, tales como glicerol; agentes desintegrantes, tales como agar-agar, carbonato de calcio, almidón de papa o tapioca, ácido algínico, ciertos silicatos, carbonato de sodio; agentes de retardantes de solución, tales como parafina; aceleradores de absorción, tales como compuestos de amonio cuaternario; agentes humectantes, tales como alcohol cetílico y monoestearato de glicerol; absorbentes, tales como caolín y arcilla de bentonita; lubricantes, tales como talco, estearato de calcio, estearato de magnesio, polietilenglicoles sólidos, lauril sulfato de sodio, y mezclas de este; y agentes colorantes. En el caso de las capsulas, tabletas y píldoras, las composiciones farmacéuticas pueden también comprender agentes neutralizantes. Composiciones solidas de un tipo similar pueden también emplearse como rellenos en capsulas de gelatina de relleno suave y duro usando tales excipientes como lactosa o azucares de leche, así como polietilenglicoles con alto peso molecular y similares.

113

[000133] Una tableta puede ser hecha por compresión o moldeado, opcionalmente con uno o más ingredientes secundarios. Tabletas comprimidas pueden ser preparadas usando aglutinante (por ejemplo, gelatina o hidroxipropilmetilcelulosa), lubricante, diluyente inerte, preservativo, desintegrante (por ejemplo, glicolato sódico de almidón o sódica reticulada carboximetilcelulosa), agente activo de superficie o dispersante. Tabletas moldeadas pueden ser hechas por moldeo en una maquina apropiada de una mezcla del compuesto en polvo humedecido con un diluyente líquido inerte.

[000134] Las tabletas, y otras formas de dosis solidas de las composiciones farmacéuticas de la presente invención, tales como grageas, capsulas, píldoras y gránulos, pueden opcionalmente ser marcadas y preparadas con recubrimientos y escudos, tales como recubrimientos entéricos y otros recubrimientos bien conocidos el arte de la formulación farmacéutica. Ellas también pueden ser formuladas de manera que provean una liberación lenta o controlada del ingrediente activo, por ejemplo, hidroxipropilmetilcelulosa en proporciones variadas para proveer el perfil de liberación deseado, otras matrices poliméricas, liposomas y/o microesferas.

Pueden estar esterilizadas por, por ejemplo, filtración a través de un filtro retenedor de bacteria, o por agentes de incorporación esterilizantes en la forma de composiciones solidas estériles que pueden ser disueltas en agua estéril, o algún otro medio inyectable estéril antes de uso. Estas composiciones pueden también de manera opcional contener agentes opacificantes y pueden ser de una composición en la que se libere el ingrediente (s) activo solamente, o preferiblemente, en una cierta porción del tracto gastrointestinal, opcionalmente, en una manera retardada.

14

Ejemplos de composiciones embebidas que pueden ser usadas incluyen sustancias poliméricas y ceras. El ingrediente activo puede también ser una forma micro encapsulada, y si es apropiado, con uno o más de los excipientes descritos anteriormente.

[000135] Las formas de dosis líquidas por administración oral de los compuestos de la invención incluyen emulsiones, micro emulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes y elixires farmacéuticamente aceptables. Además del ingrediente activo, las formas de dosis líquidas pueden contener un diluyente inerte comúnmente usado en el estado de la técnica, tales como agua o solventes, agentes de solubilidad y emulsificantes, tales como alcohol etílico, alcohol isopropílico, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, propilenglicol, 1, 3-butileno glicol, aceites (en particular, aceites de algodón, maní, maíz, germen, oliva, castor y sésamo), glicerol, alcohol tetrahidrofurilo, polietilenglicoles y ésteres de ácidos grasos de sorbitan, y mezclas de estos.

[000136] Además de los diluentes inertes, las composiciones inertes pueden también incluir adyuvantes tales como agentes humectantes, agentes emulsificantes y de suspensión, agentes endulzantes, agentes saborizantes, agentes colorantes, agentes perfumantes y de preservación.

[000137] Suspensiones, en adición a los compuestos activos, pueden contener agentes de suspensión como por ejemplo, alcoholes isostearil etoxilados, polioxietileno sorbitol y ésteres de sorbitan, celulosa microcristalina, metahidróxido de aluminio, bentonita, agar-agar y tragacanto, y mezclas de estos.

[000138] Formulaciones de las composiciones farmacéuticas de la invención por administración rectal o vaginal pueden presentarse como un supositorio, el cual

125

puede ser preparado por la mezcla de uno o más compuestos de la invención con uno o más excipientes no irritantes o portadores que comprenden, por ejemplo, manteca de cacao, polietilenglicol, una cera de supositorio o un silicato, y el cual es sólido a temperatura ambiente, pero líquido a temperatura corporal y, por lo tanto, se derretirá en la cavidad rectal o vaginal y liberará el compuesto activo.

[000139] Formulaciones de la presente invención que son apropiadas para administración vaginal también incluyen formulaciones de pesarios, tampones, cremas, geles, pastas, espumas o espráis que contienen portadores conocidos como apropiados en el estado de técnica.

[000140] Formas de dosis para administración tópica o transdérmica de un compuesto de esta invención incluye polvos, espráis, ungüentos, pastas, cremas, lociones, geles, soluciones, parches e inhalantes. El compuesto activo puede ser mezclado bajo condiciones estériles con un portador farmacéuticamente aceptable, y con cualquier preservativo, reguladores o propulsores que puedan ser requeridos.

[000141] Los ungüentos, pastas, cremas y geles pueden contener, además del compuesto activo de esta invención, excipientes, tales como grasas animales o vegetales, aceites, ceras, parafinas, almidón, tragacanto, derivados de celulosa, polietilenglicoles, silicones, bentonitas, ácido silícico, talco, óxido de zinc, o mezclas de estos.

[000142] Polvos y espráis pueden contener, además del compuesto de esta invención, excipientes tales como lactosa, talco, ácido silícico, hidróxido de aluminio, silicatos de calcio y polvo de poliamida, o mezclas de estas sustancias. Espráis pueden adicionalmente contener propulsores habituales, tales como

clorofluorohidrocarburos e hidrocarburos volátiles no sustituidos, tales como butano y propano.

[000143] Parches transdérmicos tiene la ventaja adicional de proveer una entrega controlada al cuerpo de un compuesto de la presente invención. Tales formas de dosis pueden ser hechas disolviendo o dispersando el compuesto en el medio apropiado. Los mejoradores de absorción también se pueden usar para incrementar el flujo del compuesto a través de la piel. La velocidad de este flujo puede ser controlado proveyendo una membrana de control de velocidad o dispersando el compuesto activo en una matriz de polímero o gel.

[000144] Formulaciones oftálmicas, ungüentos de ojo, polvos, soluciones y similares, también se contemplan dentro del alcance de esta invención.

[000145] Composiciones farmacéuticas de esta invención adecuadas para administración parenteral comprenden una o más composiciones de la invención en combinación con una o más soluciones isotónicas estériles acuosas o no acuosas farmacéuticamente aceptables, dispersiones, suspensiones o emulsiones, o polvos estériles los cuales pueden ser reconstituidos en soluciones inyectables estériles o dispersiones solo antes de su uso, que pueden contener antioxidantes, reguladores, bacteriostáticos, solutos que reproducen la formulación isotónica con la sangre del destinatario o agentes de suspensión o espesamiento.

[000146] Ejemplos de portadores adecuados acuosos y no acuosos que se pueden emplear en las composiciones farmacéuticas de la invención incluyen, agua, etanol, polioles (como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol, y similares) y convenientes mezclas de estos, aceites vegetales, tales como aceite de oliva, y esterres orgánicos inyectables, como oleato de etilo. Una fluidez adecuada puede

(17)

ser mantenida, por ejemplo, a través del uso de materiales de recubrimiento, como lecitina, a través del mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones, y con el uso de tensioactivos.

[000147] Estas composiciones pueden también contener adyuvantes como preservativos, agentes humectantes, agentes emulsificantes y agentes de dispersión. La prevención de la acción de microorganismos se puede asegurar por medio de la inclusión de varios agentes anti bacteriales y antifúngicos, por ejemplo, parabeno, clorobutanol, ácido sórbico fenol, y similares. También es deseable la introducción de agentes isotónicos, tales como azúcares, cloruro de sodio, y similares en las composiciones. Adicionalmente, una absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable puede ser provocada por la inclusión de agentes que retrasan la absorción tales como monoestearato de aluminio y gelatina.

[000148] En algunos casos, para prolongar el efecto de la droga, es deseable disminuir la absorción de la droga de la inyección subcutánea o intramuscular. Esto puede ser logrado con el uso de una suspensión líquida de un material cristalino o amorfo que tenga una solubilidad en agua pobre. La tasa de absorción de la droga depende entonces de su tasa de disolución la cual, a su vez, puede depender del tamaño del cristal y la forma cristalina. Alternativamente, la absorción retardada de una forma de droga administrada parentalmente puede ser alcanzada disolviendo o suspendiendo la droga en un vehículo de aceite.

[000149] Formas de depósito inyectables son hechas por la formación de matrices micro encapsuladas de los compuestos sujetos en polímeros biodegradables tales como polilactida-poliglicolida. Dependiendo de la proporción de la droga o polímero, y la naturaleza del polímero particular empleado, la

proporción de liberación de droga puede ser controlada. Ejemplos de otros polímeros biodegradables incluyen poli (ortoesteres) y poli (anhídridos). Formulaciones inyectables de depósitos son también preparadas por encierro de la droga en liposomas o micro emulsiones que son compatibles con el tejido humano.

[000150] Las preparaciones de la presente invención pueden darse oralmente, parentalmente, tópicamente o rectalmente. Se dan en formas apropiadas para cada ruta de administración. Por ejemplo, son administradas en forma de tabletas o capsulas. Por ejemplo, son administradas por inyección, infusión, inhalación, loción, ungüento, supositorio, etc. La administración oral es preferida.

[000151] Las frases "administración parental" y "parentalmente administrado" según como se usa aquí representan modelos de administración más que administración enteral o tópica, usualmente por inyección, e incluye, sin limitación, inyección e infusión intravenosa, intramuscular, intra arterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradermal, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal e intraesternal.

[000152] Las frases "administración sistémica", "sistemáticamente administrado", "administración periferal" y "periferalmente administrado" según se usan aquí representan la administración de un compuesto, droga u otro material que no sea directamente en el sistema nervioso central, de manera que este ingrese al sistema de paciente y, de esta manera, es sujeto para metabolismo y otros procesos similares, por ejemplo, administración subcutánea.

119

[000153] Estos compuestos pueden ser administrados a humanos y otros animales para terapia por cualquier ruta de administración conveniente, incluyendo oralmente, nasalmente (como por, por ejemplo, un espray), rectalmente, intravaginalmente, parentalmente, intracisternal y tópicamente (como por polvos, ungüentos o drogas, incluyendo bucalmente y sublingualmente).

[000154] Con relación a la ruta de administración seleccionada, el compuesto de la presente invención, el cual puede ser usado en una forma hidratada adecuada, y/o la composición farmacéutica de la presente invención, son formuladas en formas de dosis farmacéuticamente aceptables por métodos convencionales conocidos por aquellos con habilidades en la materia.

[000155] El término "cantidad efectiva terapéuticamente" se refiere a la cantidad de la sal sujeto o polimorfo que provocará la respuesta biológica o medica de un tejido, sistema, animal o humano que está siendo buscado por el investigador, veterinario, doctor medico u otro clínico o que es suficiente para prevenir el desarrollo de o aliviar en cierta medida uno o más de los síntomas de la enfermedad que se está tratando.

[000156] Niveles de dosis actuales del ingrediente activo en las composiciones farmacéuticas de esta invención pueden ser variados para obtener una cantidad del ingrediente activo que sea efectivo para lograr la respuesta terapéutica deseada para un paciente, composición, y modo de administración particular, sin ser toxico para el paciente.

[000157] El nivel de dosis seleccionado dependerá de una variedad de factores que incluyen la actividad del compuesto particular de la presente invención empleado, o el ester, sal o amida de este, la ruta de administración, el tiempo de

120

administración, la tasa de excreción del compuesto particular empleado, la duración del tratamiento, otras drogas, compuestos y/o materiales usados en combinación con el compuesto particular empleado, la edad, sexo, peso, condición, salud general e historial médico anterior del paciente en tratamiento, y como factores bien conocidos en las artes de la medicina.

[000158] Un médico o veterinario que posea formación ordinaria en la técnica puede fácilmente determinar y prescribir la cantidad efectiva de la composición farmacéutica requerida. Por ejemplo, el médico o veterinario podría empezar dosis de los compuestos de la invención empleados en la composición farmacéutica a niveles más bajos que lo requerido con la idea de lograr el efecto terapéutico adecuado y gradualmente incrementar la dosis hasta que se consiga el efecto que se desea.

[000159] En general, una dosis diaria conveniente de un compuesto de la invención será aquella cantidad del compuesto que sea la dosis más baja para producir un efecto terapéutico. Tal dosis efectiva generalmente dependerá de los factores descritos anteriormente. Generalmente, dosis intravenosas y subcutáneas de los compuestos de esta invención para un paciente, cuando se usa para los efectos analgésicos indicados, variaran desde 0.0001 a 100 mg por kilogramo de peso corporal por día, más probablemente desde 0.01 a 50 mg por kilogramo por día, y todavía más preferible desde 0.1 a 10 mg por kilogramo por día. Por ejemplo, en algunas representaciones las dosis están entre 0.5 y 4.0 mg por kg por día. Si se desea, la dosis diaria efectiva del compuesto activo puede administrada como una, dos, tres, cuatro, cinco, seis o más sub-dosis administradas de manera separada a intervalos apropiados a los largo del día o semana u otro periodo de tiempo apropiado, opcionalmente, en formas de dosis de unidad.

121

[000160] En tanto que es posible que un compuesto de la presente invención sea administrado de manera individual, es preferible que sea administrado como una composición farmacéutica.

5. Métodos para el Uso de los Compuestos de Tetraciclina de la Invención

[000161] La invención también pertenece a un método para el tratamiento de un estado de respuesta a la tetraciclina en un sujeto, a través de la administración al sujeto de una cantidad efectiva de una composición que comprende un Compuesto 1 de acuerdo con la invención o una sal farmacéuticamente aceptable de este, de manera que el estado es tratado.

[000162] Los términos "tratar", "tratando" o "tratamiento", según son usado aquí, se refieren a un método para aliviar o eliminar una enfermedad o desorden (*por ejemplo*, el estado de respuesta al compuesto de tetraciclina) y/o sus síntomas presentes. Los términos "prevenir", "previniendo" o "prevención", según como se usan aquí, se refieren a un método para evitar que un sujeto adquiera una enfermedad o desorden. El "sujeto", según como se usa aquí, incluye un mamífero. El mamífero puede ser *por ejemplo*, cualquier mamífero, *por ejemplo*, un humano, primate, ratón, rata, perro, gato, vaca, caballo, cabra, camello, oveja o un cerdo. Preferiblemente, el mamífero es humano.

[000163] El lenguaje "estado de respuesta al compuesto de tetraciclina" o "estado de respuesta de tetraciclina" incluye estados que pueden ser tratados, prevenidos, o también mejorados a través de la administración de un compuesto de tetraciclina de la invención. Los estados de respuesta al compuesto de tetraciclina incluyen infecciones bacteriales, virales y por hongos (incluyendo aquellas que son resistentes a otros compuestos de tetraciclina), cánceres (*por*

ejemplo, cáncer de próstata, cáncer de pecho, cáncer de colon, cáncer de pulmón, melanoma, cánceres linfáticos y otros desórdenes caracterizados por proliferación celular no deseada, incluyendo, pero no limitado a estos, aquellos descritos en U.S. 6, 100, 248), artritis, osteoporosis, diabetes, y otros estados para los cuales los compuestos de tetraciclina se han encontrado activos (ver, por ejemplo, Patente U.S. Nos. 5, 789, 395; 5, 834, 450; 6, 277, 061 y 5, 532, 227, cada uno de los cuales está expresamente incorporado aquí por referencia).

Los compuestos de la invención pueden ser usados para prevenir o controlar importantes enfermedades en mamíferos y animales tales como diarrea, infecciones del tracto urinario, infecciones de la piel y estructura de la piel, oído, nariz e infecciones de la garganta, infecciones en heridas, mastitis y similares. Adicionalmente, también están incluidos métodos para el tratamiento de neoplasmas usando compuestos de tetraciclina de la invención (van der Bozert *entre otros*, *Cancer Res.*, 1998, 48: 6686-6690). En una representación, el estado de respuesta a la tetraciclina no es una infección bacteriana. En otra representación, los compuestos de tetraciclina de la invención son esencialmente no antibacteriales. Por ejemplo, compuestos de tetraciclina no antibacteriales de la invención pueden tener valores MIC mayores que 4 µg/ml medidos en ensayos conocidos en el estado de la técnica.

[000164] Los estados de respuesta al compuesto de tetraciclina también incluyen estados asociados con procesos inflamatorios (IPAS). El término "estado asociado con procesos inflamatorios" incluye estados en los cuales los factores de inflamación o inflamatorios (*por ejemplo*, metaloproteinasas de la matriz (MMPs), óxido nítrico (NO), TNF, interleucinas, proteínas plasmáticas, sistemas de defensa celular, citocinas, metabolitos de los lípidos, proteasas, radicales tóxicos,

moléculas de adhesión, etc.) están involucrados o presentes en un área en cantidades anormales.

El proceso de inflamación es la respuesta de tejidos vivos al daño. La causa de la inflamación puede debido a un daño físico, sustancias químicas, micro-organismos, necrosis de tejido, cáncer u otros agentes. Una inflamación aguda es de corta duración por solo pocos días. Si esta llega a durar más tiempo, entonces se podría relacionar con una inflamación crónica.

[000165] IPAS incluyen desordenes inflamatorios. Los desordenes inflamatorios son generalmente caracterizados por calor, enrojecimiento, hinchazón, dolor o perdida de función. Ejemplos de causas de desordenes inflamatorios incluyen, pero no se limitan a estos, infecciones microbiales (*por ejemplo*, infecciones bacteriales y por hongos), agentes físicos (*por ejemplo*, quemaduras, radiación y trauma), agentes químicos (*por ejemplo*, sustancias toxinas y causticas), necrosis de tejido y varios tipos de reacciones inmunológicas. En otra representación, las IPAS incluyen desordenes descritos en la Patente U.S. No. 5, 929 y 5, 532, 227, incorporadas aquí por referencia en su totalidad.

[000166] Ejemplos de desordenes inflamatorios incluyen, pero no se limitan a estos, osteoartritis, artritis reumatoide, infecciones agudas y crónicas (bacterial y por hongos, incluyendo difteria y pertussis (tos femenina)), bronquitis aguda y crónica, sinusitis, infecciones respiratorias superiores (la gripa común, etc.), gastroenteritis aguda y crónica y colitis, cistitis y uretritis aguda y crónica, dermatitis aguda y crónica, conjuntivitis aguda y crónica, serositis aguda y crónica (pericarditis, peritonitis, sinovitis, pleuritis y tendinitis), pericarditis urémica, colecistitis aguda y crónica, vaginitis aguda y crónica, uveítis aguda y crónica,

124

reacciones a drogas, mordidas de insectos, quemaduras (termal, química y eléctrica) y quemadura solar.

[000167] El término "estado asociado al proceso inflamatorio" incluye, en una representación, estados NO asociados. El término "estado NO asociado" incluye estados que involucran o están asociados con oxido nítrico (NO) sintasa de oxido nítrico inducible (iNOS). Estado NO asociado incluye estados que no son característicos con cantidades anormales de NO y/o iNOS. Preferiblemente, el estado NO asociado puede ser tratado con administración de compuestos de tetraciclina de la invención. Los desordenes, enfermedades y estados descritos en las Patentes U.S. Nos. 6, 231, 894; 6, 105, 804; 5, 919, 774; y 5, 789, 395 están también incluidos como estados NO asociados. Todos los contenidos de cada una de las patentes están aquí incorporadas por referencia.

[000168] Otros ejemplos de estados NO asociados incluyen, pero no se limitan a estos, malaria, senectud, diabetes, derrame cerebral vascular, desordenes neurodegenerativos (enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Huntington y enfermedad de Parkinson), enfermedad cardiaca (lesión por reperfusión asociada seguida de infarto), diabetes juvenil, desordenes inflamatorios, osteoartritis, artritis reumatoide, infecciones agudas y crónicas (bacterial, viral y por hongos), bronquitis aguda y crónica, sinusitis, e infecciones respiratorias (la gripa común, *etc.*), gastroenteritis aguda y crónica y colitis, cistitis y uretritis aguda y crónica, dermatitis aguda y crónica, conjuntivitis aguda y crónica, serositis aguda y crónica (pericarditis, peritonitis, sinovitis, pleuritis y tendinitis), pericarditis urémica, colecistitis aguda y crónica, fibrosis cística, vaginitis aguda y crónica, uveítis aguda y crónica, reacciones a drogas, mordidas de insectos, quemaduras (termal, química y eléctrica) y quemadura solar.

[000169] El término "estado asociado al proceso inflamatorio" también incluye, en una representación, estados asociados a metaloproteinasas de la matriz (MMPAs). MMPAs incluyen estados caracterizados por cantidades anormales de actividad MMPs o MMP. Estas también están incluidas como estados de respuesta al compuesto de tetraciclina que se pueden tratar usando compuestos de la invención.

[000170] Ejemplos de estados asociados a metaloproteinasas de la matriz (MMPAs) incluyen, pero no se limitan a estos, arterioesclerosis, ulceración de cornea, enfisema, osteoartritis, esclerosis múltiple (Liedtke entre otros, *Ann Neurol.* 1998, 44: 35-46; Chandler entre otros, *J. Neuroimmunol.* 1997, 72: 155-71), osteosarcoma, osteomielitis, bronquiectasias, enfermedad de obstrucción pulmonar crónica, enfermedades de la piel y los ojos, periodontitis, osteoporosis, artritis reumatoide, colitis ulcerativa, desordenes inflamatorios, crecimiento e invasión de tumor (Stetler-Stevenson entre otros, *Annu. Rev. Cell Biol.* 1993, 9: 541-73; Tryggvason entre otros, *Biochim. Biophys. Acta* 1987, 907: 191-217; Li entre otros, *Mol. Carcinog.* 1998, 22: 84-89), metástasis, herida de pulmón aguda, accidente cerebrovascular, isquemia, diabetes, aneurisma aórtico o vascular, heridas del tejido de la piel, resequedad en los ojos, degradación del hueso y el cartílago (Greenwald entre otros, *Bone* 1998, 22:33-38; Ryan entre otros, *Curr. Op. Rheumatol.* 1996, 8: 238-247). Otras MMPAs incluyen aquellas descritas en la Patente U.S. Nos. 5, 459, 135; 5, 321, 017; 5, 308, 839; 5, 258, 371; 4, 935, 412; 4, 704, 383; 4, 666, 897 y RE 34, 656, incorporadas aquí por referencia en su totalidad.

[000171] En otra representación, el estado de respuesta al compuesto de tetraciclina es cáncer. Ejemplos de cánceres los cuales los compuestos de tetraciclina de la invención pueden ser útiles para tratar incluyen todos los tumores

sólidos, *por ejemplo*, carcinomas, *por ejemplo*, adenocarcinomas y sarcomas. Adenocarcinomas y carcinomas derivados de tejido glandular o en el cual las células del tumor forman estructuras glandulares reconocibles. Sarcomas incluyen de manera amplia tumores cuyas células están embebidas en una sustancia fibrilar u homogénea como tejido conectivo embrionario.

Ejemplos de carcinomas que pueden ser tratados usando los compuestos de la invención incluyen, pero no se limitan a estos, carcinomas de la próstata, pecho, ovario, testículo, pulmon, colon y pecho. Los métodos de la invención no están limitados al tratamiento de estos tipos de tumores, pero se extienden a cualquier tumor sólido derivado de cualquier sistema orgánico. Ejemplos de cánceres tratables incluyen, pero no se limitan a estos, cáncer de colon, cáncer de pecho, melanoma, carcinoma de ovario, carcinoma de próstata, cáncer de pulmon, y variedad de otros cánceres también. Los métodos de la invención también causan la inhibición del crecimiento del cáncer en adenocarcinomas, como por ejemplo, aquellos de la próstata, pecho, riñón, ovario, testículos y colon.

[000172] En una representación, la invención pertenece a un método para el tratamiento de un paciente que padece o se encuentra en riesgo de sufrir de cáncer, a través de la administración de una cantidad efectiva de un compuesto de tetraciclina sustituido de manera que la inhibición del crecimiento celular del cáncer ocurra, *por ejemplo*, proliferación celular, invasividad, metástasis, o incidencia de un tumor es disminuida, aminorada, o detenida. La inhibición puede resultar de la inhibición de un proceso inflamatorio, descenso de regulación en un proceso inflamatorio, algunos otros mecanismos o una combinación de mecanismos. Alternativamente, los compuestos de tetraciclina pueden ser útiles para prevenir la recurrencia del cáncer, por ejemplo, para tratar cáncer residual que sigue de la resección quirúrgica o terapia de radiación. Los compuestos de

223

tetraciclina útiles de acuerdo con la invención son específicamente ventajosos ya que son sustancialmente no tóxico comparados con otros tratamientos para el cáncer. En otra representación, los compuestos de la invención son administrados en combinación con una terapia de cáncer estándar, tales como, pero sin limitarse a este, quimioterapia.

[000173] Ejemplos de estados de respuesta a la tetraciclina también incluyen desordenes neurológicos que incluyen a ambos, los desordenes neuropsiquiátricos y neurodegenerativos, pero no se limitan a la enfermedad de Alzheimer, demencias relacionadas con la enfermedad de Alzheimer tales como enfermedad de Pick, enfermedad de Parkinson y otras enfermedades corporales difusas de Lewy, demencia senil, enfermedad de Huntington, síndrome de Gilles de la Tourette, esclerosis múltiple, esclerosis lateral amiotrófica (ALS), parálisis supra nuclear progresiva, epilepsia, y enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, desordenes funcionales autónomos como hipertensión y desordenes del sueño, desordenes neuropsiquiátricos (depresión, esquizofrenia, desorden esquizoafectivo, psicosis de Korsakoff, manía, desordenes de ansiedad, desordenes fóbicos, *etc.*), desordenes de aprendizaje y memoria (amnesia o pérdida de memoria relacionada con la edad, desordenes de déficits de atención, *etc.*), desorden distímico, desorden depresivo mayor, desorden obsesivo compulsivo, desordenes por el uso de sustancia psicoactivas, ansiedad, fobias, desorden de pánico, así como desorden afectivo bipolar (desorden (estado de ánimo) afectivo bipolar severo (BP-1), desordenes neurológicos afectivos bipolares, *por ejemplo*, migraña y obesidad, *etc.*). Otros desordenes neurológicos incluyen, por ejemplo, aquellos listados en el manual de Diagnostico y Estadística de la Asociación Psiquiátrica Americana de Desordenes Mentales (DSM), la versión más reciente la cual es incorporada aquí por referencia en su totalidad.

128

[000174] En otra representación, el estado de respuesta al compuesto de tetraciclina es diabetes, *por ejemplo*, diabetes juvenil, diabetes mellitus, diabetes tipo I, o diabetes tipo II. En otra representación, la glicosilación de proteínas no es afectada por la administración de compuestos de tetraciclina de la invención. En otra representación, el compuesto de tetraciclina de la invención es administrado en combinación con terapias diabetes estándar, tales como, pero sin limitarse a esta, terapia de insulina.

[000175] En otra representación, el estado de respuesta al compuesto de tetraciclina es un trastorno de la masa ósea. Trastornos de la masa ósea incluyen desordenes donde los huesos de un sujeto son desordenes y/o estados donde la formación, reparación o remodelación del hueso es ventajosa. Por ejemplo, trastornos de la masa ósea incluyen osteoporosis (*por ejemplo*, una disminución en la fortaleza y densidad del hueso), fracturas de hueso, formación del hueso asociado con procedimientos quirúrgicos (*por ejemplo*, reconstrucción facial), osteoporosis imperfecta (enfermedad de los huesos frágiles), hipofosfatasa, enfermedad de Paget, displasia fibrosa, osteoporosis, enfermedad del hueso mieloma, y la depleción de calcio en el hueso, como aquella relacionada con hiperparatiroidismo primario.

Trastornos de la masa ósea incluyen todos los estados en lo que la formación, reparación y remodelado del hueso es ventajosa para el sujeto así como otros desordenes asociados con los huesos o sistema esquelético de un sujeto que puede ser tratado con compuestos de tetraciclina de la invención. En otra representación, los desordenes de masa ósea incluyen aquellos descritos en la Patente U.S. Nos. 5, 459, 135; 5, 231, 017; 5, 998, 390; 5, 770, 588; RE 34, 656;

5, 308, 839; 4, 925, 833; 3, 304, 227 y 4, 666, 897, cada uno de los cuales está incorporado aquí por referencia en su totalidad.

[000176] En otra representación, el estado de respuesta al compuesto de tetraciclina es una herida de pulmon aguda. Heridas de pulmon agudas incluyen síndrome de distrés respiratorio del adulto (ARDS), síndrome post bomba (PPS) y trauma. El trauma incluye cualquier lesión al tejido viviente causado por un agente extrínseco o evento. Ejemplos de trauma incluyen, pero no se limitan a estos, heridas por choques, contacto con una superficie dura, o cortes u otros daños en los pulmones.

[000177] La invención también pertenece a un método para el tratamiento de una lesión de pulmon aguda a través de la administración de un compuesto de tetraciclina sustituido de la invención.

[000178] Los estados de respuesta al compuesto de tetraciclina también incluyen desordenes pulmonares. La invención pertenece a métodos para el tratamiento de desordenes pulmonares crónicos a través de la administración de un compuesto de tetraciclina, tales como los descritos aquí. Los métodos incluyen la administración de una cantidad afectiva al sujeto de un compuesto de tetraciclina sustituido de manera que el desorden pulmonar crónico es tratado. Ejemplos de desordenes pulmonares crónicos incluyen, pero no se limitan a estos, asma, fibrosis quística y enfisema. En otra representación, los compuestos de tetraciclina de la invención usados para tratar desordenes pulmonares agudos y/o crónicos tales como aquellos descritos en la Patente U.S. Nos. 5, 977, 091; 6, 043, 231; 5, 523, 297; y 5, 773, 430, cada uno de los cuales está incorporado aquí por referencia en su totalidad.

730

[000179] En otra representación, el estado de respuesta a la tetraciclina es isquemia, accidente cerebrovascular o accidente cerebrovascular isquémico. La invención también pertenece a un método para el tratamiento de isquemia, accidente cerebrovascular o accidente cerebrovascular isquémico a través de la administración de una cantidad efectiva de un compuesto de tetraciclina sustituido de la invención. En otra representación, los compuestos de tetraciclina de la invención son usados para tratar tales desordenes como se describe en la Patente U.S. Nos. 6, 231, 894; 5, 773, 430; 5, 919, 775 y 5, 789, 395, incorporados aquí por referencia.

[000180] En otra representación, el estado de respuesta al compuesto de tetraciclina es una herida en la piel. La invención también pertenece, al menos en parte, a un método para mejorar la respuesta de recuperación del tejido epitelizado (*por ejemplo*, piel, mucosae, *etc.*) para lesión traumática aguda (*por ejemplo*, corte, quemadura, raspadura, *etc.*). El método puede incluir usando un compuesto de tetraciclina de la invención (que puede o no tener actividad antibacterial) para mejorar la capacidad del tejido epitelizado para curar heridas agudas. El método puede incrementar la relación de acumulación de colágeno del tejido en recuperación. El método también puede disminuir la actividad proteolítica en el tejido epitelizado a través de la disminución de la actividad colagenolítica y/o gelatonolítica de MMPs.

En otra representación, el compuesto de tetraciclina de la invención es administrado a la superficie de la piel (*por ejemplo*, tópicamente). En otra representación, el compuesto de tetraciclina de la invención usado para tratar un lesión en la piel, y otros desordenes como los descritos en, por ejemplo, la Patentes U.S. Nos. 5, 827, 840; 4, 704, 383; 4, 935, 412; 5, 258, 371; 5, 308,

131

8391, 5, 459, 135; 5, 532, 227 y 6, 015, 804, cada uno de los cuales está incorporado aquí por referencia en su totalidad.

[000181] En otra representación, el estado de respuesta al compuesto de tetraciclina es un aneurisma aórtico o vascular en un tejido vascular de un sujeto (*por ejemplo*, un sujeto que presenta o se encuentra en riesgo de tener un aneurisma aórtico o vascular, *etc.*). El compuesto de tetraciclina puede ser efectivo para reducir el tamaño del aneurisma vascular de manera que el aneurisma sea prevenido. En una representación, el tejido vascular en una arteria, *por ejemplo*, la aorta, *por ejemplo*, la aorta abdominal. En otra representación, los compuestos de tetraciclina de la invención son usando para tratar desordenes descritos en la Patente U.S. Nos. 6, 043, 225 y 5, 834, 449, incorporados aquí por referencia en su totalidad.

[000182] Infecciones bacteriales pueden ser causadas por una amplia variedad de bacterias gram positivo y gram negativo. Los compuestos de la invención son usados como antibióticos contra organismos que son resistentes a otros compuestos de tetraciclina. La actividad antibiótica de los compuestos de tetraciclina de la invención puede ser determinada usando el métodos de dilución en caldo in vitro estándar descrito en Waitz, J. A., *National Commission for Clinical Laboratory Standards, Document M7-A2*, vol. 10, no. 8, pp. 13-20, segunda edición, Villanova, PA (1990).

[000183] Los compuestos de tetraciclina pueden ser también usados para tratar infecciones que son tradicionalmente tratadas con compuesto de tetraciclina como *por ejemplo*, infección por rickettsias, un número de infecciones bacteriales gram-positivo y gram-negativo, linfogranuloma venéreo, conjuntivitis inclusión y psitacosis. Los compuestos de tetraciclina pueden ser usados para tratar

(32)

infecciones de, por ejemplo, *K. pneumoniae*, *Salmonella*, *E. hirae*, *A. baumannii*, *B. catarrhalis*, *H. influenzae*, *P. aeruginosa*, *E. faecium*, *E. coli*, *S. aureus* o *E. faecalis*. En una representación, el compuesto de tetraciclina es usado para tratar una infección bacteriana que es resistente a otros compuestos antibióticos de tetraciclina. El compuesto de tetraciclina de la invención puede ser administrado con un portador farmacéuticamente aceptable.

[000184] El lenguaje "en combinación con" otro agente terapéutico o tratamiento incluye coadministración del compuesto de tetraciclina, (*por ejemplo*, inhibidor) y con el otro agente terapéutico o tratamiento, administración del primer compuesto de tetraciclina primero, seguido por otro agente terapéutico o tratamiento y administración del otro agente terapéutico o primer tratamiento, seguido por el compuestos de tetraciclina. El otro agente terapéutico puede ser cualquier agente que sea conocido en el estado de la técnica para tratar, prevenir, o reducir los síntomas de la enfermedad o desorden, tales como IPAS. Además, el otro agente terapéutico puede ser cualquier agente que beneficie al paciente cuando es administrado en combinación con la administración de un compuesto de tetraciclina.

En una representación, las enfermedades, como cáncer, tratadas por métodos de la invención incluyen aquellas descritas en la Patente U.S. Nos. 6, 100, 248; 5, 843, 925; 5, 837, 696 y 5, 668, 122, incorporados aquí por referencia en su totalidad.

[000185] El lenguaje "cantidad efectiva" del compuesto es aquella cantidad necesaria o suficiente para tratar o prevenir un estado de respuesta al compuesto de tetraciclina. La cantidad efectiva puede variar dependiendo de factores como tamaño y peso del sujeto, el tipo de enfermedad, o del compuesto de tetraciclina

particular. Por ejemplo, la elección de un compuesto de tetraciclina puede afectar lo que constituye una "cantidad efectiva". Alguien con habilidades ordinarias en la técnica estaría en capacidad de estudiar los factores mencionados y tomar una determinación en relación con la cantidad efectiva del compuesto de tetraciclina sin una indebida experimentación.

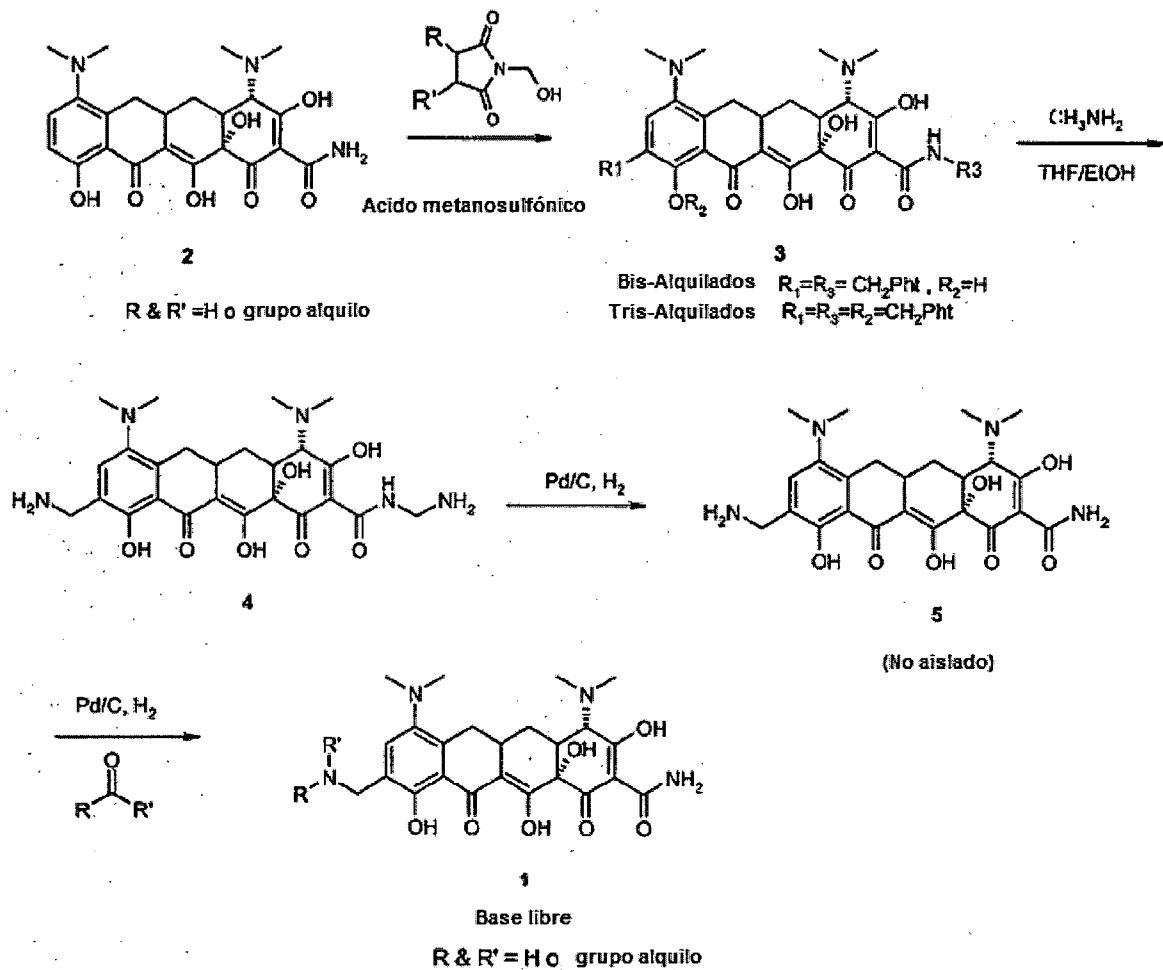
[000186] En los métodos terapéuticos de la invención, uno o más compuestos de tetraciclina de la invención pueden ser suministrados de manera individual al individuo, o más típicamente un compuesto de la invención será administrado como parte de una composición farmacéutica en mezcla con un excipiente convencional, *por ejemplo*, sustancias portadoras orgánicas o inorgánicas aceptables farmacéuticamente conveniente para administración parenteral, oral u otra deseada y las cuales no reaccionan perjudicialmente con el compuesto activo y no son perjudiciales para el receptor de estas.

[000187] La invención es además ilustrada por los siguientes ejemplos, los cuales no deben entenderse como una limitante.

134

6. Ejemplificación de la Invención

Ejemplo 1: Síntesis de 9-alkil Aminometil Minociclina



Esquema 2

[000188] Hidroclorato de minociclina (compuesto 2) fue disuelto en ácido metilsulfónico o ácido fluorhídrico con anhídrido metilsulfónico o un ácido limpiador de agua similar como ácido triflico. N- hidroximetil ftalimida fue añadido a la mezcla de reacción. La mezcla fue agitada a 20-35 °C hasta que la reacción fue completa. La solución de ácido fue añadida a una mezcla de hielo/agua, y la sal triflica pudo ser fácilmente precipitada, filtrada y recolectada. El sólido fue re disuelto en acetona y traído a un pH neutral con una base. El producto fue precipitado por la adición de agua. Si el ácido triflico estuviera presente como limpiador el producto podría ser precipitado sin neutralización. El producto fue

BS

aislado como una mezcla del producto bis y tris alquilado. El material aislado de esta reacción fue enriquecido en la tasa bis deseada (90%).

[000189] El sólido fue suspendido en el EtOH o MeOH. La aminólisis se llevo a cabo usando metilamina. Un subproducto de ftalimida precipitado como la reacción progreso y fue removido por filtración. El producto sólido de color amarillo claro fue precipitado afuera por la adición de aprox. 1.5 volúmenes de t-butilmetileter a las mezcla de reacción, y recolectado a través de una filtración simple que dejo muchas pequeñas impurezas y un reactivo de metilamina en la solución. Se ejecuto otra purificación a través de una re suspensión con un alcohol alifático más bajo como un metanol.

[000190] El compuesto 4 como una base libre fue transferido a un recipiente de hidrogenación el cual fue cargado con metanol y aldehído. Un catalizador Pd/C inactivado fue cargado y el recipiente fue presurizado con gas hidrogeno. La mezcla de reacción fue hidrogenada bajo presión de hidrogeno alrededor de 30 Psi por 24 horas. Cuando la conversión del compuesto 4 a 1 estuvo completa, la solución fue filtrada y lavada a través de una almohadilla de celite. A este punto la mezcla de reacción contenía un epímero β C-4 muy bajo, cercano a 3-7 %.

[000191] El producto (1) fue elaborado como sigue para aislar el producto selectivamente de sus impurezas. El pH de la solución fue ajustado a aprox. 4.5 con HCl concentrado y la solución fue extraída con diclorometano. La capa acuosa fue extraída con diclorometano para recuperar selectivamente el producto epímeros preferido (*por ejemplo*, α). Las capas de diclorometano fueron combinadas y concentradas, y 2 L de *n*-heptano fue agregado para precipitar el producto. Fue obtenida purificación adicional repitiendo el proceso elaboración con o sin t-butilmetileter para disolver el producto crudo.

Ejemplo 2: Purificación del Compuesto 1

[000192] La base libre 9-(2', 2'-dimetilpropil aminometil) minociclina (40 gr) cruda fue disuelta en 150 mL de regulador A (0.1 % de solución acuosa de ácido metanosulfónico - MSA) y el pH fue ajustado a 2-3 con MSA.

[000193] La solución fue filtrada e inyectada en HPLC y el producto se eluyó con un gradiente isocrático de 94% de regulador A y 6% de acetonitrilo. La recolección de fracción de producto fue iniciada cuando el pico de producto fue detectado. Cada fracción fue analizada y un criterio de aceptación mayor a 80% AUC del pico principal fue usado para las primeras fracciones de producto. Cuando se combinaron las fracciones, el nivel de impurezas y la concentración relativa de las fracciones reunidas fue incluido en el criterio de selección que reunía las especificaciones del producto final. A las fracciones de producto fue agregado un 10% de solución acuosa de sulfito de sodio igual a 10% del volumen original de las fracciones recolectadas.

[000194] El siguiente ejemplo representa la salida de una sola inyección. La salida de múltiples inyecciones puede ser también combinada y elaborada. Un volumen de fracción de producto de 3.5 L (incluyendo sulfito de sodio) fue recolectada y el pH fue ajustado a 4.0 – 4.5 usando una solución de hidróxido de sodio. La solución acuosa fue lavada con 2 L de diclorometano y la capa orgánica fue separada y descartada.

[000195] El pH de la capa acuosa es ajustado a 7.5 – 8.5 usando hidróxido de sodio y el producto fue extraído cuatro veces con 2.4 L de diclorometano. El pH

137

fue reajustado a 7.5 – 8.5 con hidróxido de sodio o MSA, anterior a cada extracción.

[000196] Las cuatro capas de diclorometano fueron combinadas y concentradas a aprox. 200 mL, el cual fue entonces agregado lentamente (sobre un periodo de 10 minutos) *n*-heptano agitado viscosamente (2.5 L). La suspensión fue agitada por cerca de 10 minutos a temperatura ambiente y diluida lentamente (sobre un periodo de 5 minutos) con *n*-heptano 1.5 L. La sustancia acuosa es enfriada a 0-5 °C y agitada por 1-2 horas. El sólido suspendido fue filtrado y lavado con 3 x 150 mL porciones de *n*-heptano. El producto fue secado al vacío a 40 °C por al menos 24 horas hasta que un peso constante fue conseguido y los niveles de todos los solventes residuales estuvieron dentro de la especificación. Aproximadamente 13.6 gr de base libre 9-(2', 2'-dimetilpropil aminometil) minociclina fue aislada como un sólido amarillo.

Ejemplo 3: Preparación de Sal HCl Cristalina del Compuesto 1

[000197] El Compuesto 1 (13 gr) fue disuelto en acetona (300 mL), filtrado y el filtro fue adicionalmente lavado con acetona. El filtrado y lavado combinado fue enfriado a 5 °C. A el filtrado y lavado combinado se añadió lentamente una solución de HCl concentrado (3.9 mL) en acetona (79 mL) con enérgica agitación. La sustancia acuosa resultante fue agitada en un baño de hielo por 15 minutos y filtrada.

[000198] El primer cultivo de sólido fue lavado con acetona fría y pentano y secado al vacío por 48 horas, produciendo 13.7 gr de sólido amorfo amarillo. El matraz con la filtración saturada fue cubierto con papel aluminio y dejado por dos

38

semanas tiempo durante el cual el crecimiento de un cristal único se observó. Los cristales fueron recolectados por filtración y lavados con hexano.

Ejemplo 4: Preparación de Sal de Ácido Metanosulfónico Cristalino del Compuesto 1

[000199] A una matraz de 25-mL 3-cuello bajo una atmosfera de nitrógeno inerte, 3 mL de isopropanol (IPA) fueron cargados. Una sustancia acuosa fue preparada adicionando 225 mg de una base libre amorfa del Compuesto 1 al matraz. La sustancia acuosa fue calentada a una temperatura de 45 °C. El hidrato de ácido metanosulfónico (98.0 mg) fue entonces añadido a la sustancia acuosa. La sustancia acuosa fue agitada a 45 °C por una hora, luego enfriada a 22 °C para producir una gruesa sustancia acuosa cristalina. La sustancia fue filtrada y lavada con IPA (2 x 1 mL). El exceso de IPA fue removido del pastel cristalino por secado a 55 °C por más de dos horas para lograr un peso constante. La sal mesilato cristalina (ácido metanosulfónico) de Compuesto 1 (180 mg) fue aislada. Se determinó que la sal mesilato cristalina era inestable a 5 °C.

Ejemplo 5: Preparación de Sal Tosilato Cristalina del Compuesto 1 (usando un método de sustancia acuosa)

[000200] A una matraz de 5-L 3-cuello bajo una atmosfera de nitrógeno inerte, 2.0 L de isopropanol (IPA) fueron cargados. Una sustancia acuosa fue preparada adicionando 289 gr de una base libre amorfa del Compuesto 1 al matraz. Una solución de hidrato de ácido p-toluensulfónico (97.0 gr) en IPA (400 mL) fue entonces agregada a la sustancia acuosa. El contenido de agua del sobrenadante de la sustancia acuosa fue ajustado a 0.6 g/L con la adición de agua (9 mL), y la sustancia fue agitada a 20-25 °C por 18 horas para producir una gruesa sustancia

acuosa cristalina. La sustancia acuosa fue filtrada y lavada con IPA (2 x 500 mL). El exceso de IPA fue removido del pastel cristalino por soplado de nitrógeno seco a través del pastel por 24 horas. Con los sólidos conteniendo 3 peso-porcentaje (wt %) de IPA, el pastel fue además secado por soplado de nitrógeno humedecido a través del pastel a una humedad relativa de 70-75 % por 24 horas. El pastel retuvo 0.9 wt% de IPA que no fue además producido por este método. El exceso de agua fue entonces removido del pastel por soplado de nitrógeno seco a través del pastel por 24 horas. La sal tosilato del Compuesto 1 fue separada como un polvo anaranjado (337 gr). La sal tosilato aislada del Compuesto 1 fue cristalina con solamente una forma observada: hemihidrato no estequiométrico, como se determinó por la difracción de polvo de rayos X (XPRD) y el análisis termo gravimétrico (TG).

Ejemplo 6: Preparación de Sal Tosilato Cristalina del Compuesto 1 (usando un método de solución)

[000201] A una matraz de 5-L 3-cuello bajo una atmosfera de nitrógeno inerte, 1.7 L de metil-t-butil éter fueron cargados. El ácido p-toluensulfónico monohidrato (209 gr) y la base libre amorfa del Compuesto 1 (556 gr) fueron agregados con agitación al matraz para obtener una solución limpia. Una cantidad de semilla (3 gr) de la sal monotosilato del Compuesto 1 fue agregada para iniciar la cristalización y una cantidad adicional de metanol (0.1 L) y metil-t-butil éter (0.5 L) fue agregado. La sustancia acuosa resultante fue agitada a 20 °C por 22 horas para producir una espesa sustancia acuosa cristalina. La sustancia fue filtrada y lavada con una mezcla de 1.1 L de metanol y 1.3 L de metil-t-butil éter seguido por metil-t-butil éter (2 x 2.4 L).

140

La sal tosilato del Compuesto 1 fue aislada como un polvo anaranjado. El exceso de solvente fue removido del pastel cristalino por soplado de nitrógeno seco a través del pastel por 24 horas. El pastel fue entonces secado al vacío a aprox. 30 °C hasta que los sólidos contenidos estuvieron sobre 6 peso-porcentaje (wt %) del solvente. El pastel fue además secado al vacío a 45 °C hasta que los sólidos contenidos fueron inferiores a 3 peso-porcentaje (wt %) del solvente. La sal tosilato aislada del Compuesto 1 fue cristalina con una forma 1 observada como se determinó por la difracción de polvo de rayos X (XPRD).

Ejemplo 7: Caracterización de la Sal Tosilato del Compuesto 1

[000202] El patrón de XRPD de la sal tosilato aislada del Compuesto 1 comprende valores 2θ en grados de 5.6, 8.0, 8.6, 11.4, 13.0, 15.5, 18.8, 20.4 y 24.5.

[000203] La sal tosilato cristalina fue sometida a análisis termo gravimétrico (TG) bajo flujo de nitrógeno a una tasa de calentamiento de 10 °C/minuto. Se observó una pérdida de peso de 3.9 % hasta 81.3 °C, lo que debió a la pérdida de agua.

[000204] Al secarse, el contenido de agua de la sal tosilato cristalina del Compuesto 1 fue calculada en 0.5 %. Después de permanecer a temperatura ambiente por 24 horas, este valor incrementó a 5 %. En contraste con el Compuesto 1 amorfo, la sal tosilato cristalina del Compuesto 1 estuvo estable por semanas y meses a temperatura ambiente, manteniendo un contenido de agua de aproximadamente 5 %.

146

[000205] La higroscopicidad de la sal tosilato cristalina sujeto fue determinada usando un analizador de sorción de vapor simétrico, y reportado como wt % ganado como una función del porcentaje de humedad relativo (% RH) desde 5 % a 95 % a 1 %, a intervalos de 5 % a 25.0 °C. Una ganancia de peso máximo de 12 wt % a 95 % RH, con una ligera histéresis en la desorción se observó, y una pérdida de 2 wt% debido a IPA fue observada.

[000206] Para la sal tosilato cristalina de determinaron las solubilidades que se encuentran resumidas en la Tabla 6 adelante. Las solubilidades fueron determinadas mezclando sólidos en exceso con solvente, a temperatura ambiente por dos horas, seguida de la filtración del sobrenadante. La concentración de sobrenadante fue determinada por cromatografía líquida de alto desempeño (HPLC). En las soluciones limpias se encontró equilibrio de 56.8 mg de la sal tosilato cristalina sujeto en 0.5 mL de agua y 122.1 mg de la sal tosilato cristalina sujeto en 1.0 mL de agua.

El pH de 122.1 mg de la sal tosilato cristalina sujeto en 1.0 mL de agua fue determinada en 5.70.

Tabla 6

Solvente	Solubilidad (mg/mL)
Agua	>100
Acetonitrilo	5.9
Metanol	86.1
IPA	5.8

Ejemplo 8: XRPD del Compuesto 1

[000207] Los patrones de difracción de polvo de rayos X fueron recolectados en un difractómetro Siemens D5000 usando radiación Cu K α (40 KV, 40 mA), goniómetro Θ - Θ , divergencia de V20 y rendijas de recepción, un monocromador

142

secundario de grafito y un contador de centelleo. El desempeño del instrumento es revisado usando un estándar de Corundum certificado (NIST 1976). El software usado para la recolección de información fue Diffrac Plus XRD Commander v2.3.1 y la información fue analizada y presentada usando Diffrac Plus EVA v11, 0.0.2 o v12.0.0.2.

[000208] Ejemplos de polvo fueron preparados usando especímenes de placa plana. Aproximadamente 35 mg de la muestra fueron cuidadosamente empacados en una cavidad de corto en una oblea de silicio (510) pulida, de fondo cero. La muestra fue rotada en su propio plano durante el análisis. Los detalles de la recolección de datos son:

Rango Angular: 2 a 42 °2 θ

Tamaño de escalón: 0.05 °2 θ

Tiempo de recolección: 4 s/escalón

Los patrones de Difracción de Polvo de Rayos X de Alta resolución fueron recolectados en un difractómetro Bruker AXS C2 GADDS usando radiación Cu K α (40 KV, 40 mA), etapa XZY automatizada, microscopio de video laser para posicionamiento de auto muestra y un detector de área de dos dimensiones HiStar. Óptica de rayos X consiste de un único espejo multicapa Gobel acoplado con un colimador de agujero de alfiler de 0.3 mm.

[000209] La divergencia del haz, *por ejemplo*, el tamaño efectivo de un haz de rayos X en una muestra, fue aproximadamente 4 mm. Un modo de escáner continuo θ - θ se empleó con una distancia de detector de muestra de 20 cm el cual brinda un rango 2 θ de 3.2 ° - 29.7 °. Típicamente, la muestra seria expuesta

a un haz de rayos X por 120 segundos. El software usado para la recolección de la información fue GADDS para WNT 4.1.16 y la información fue analizada y presentada usando Diffrac Plus EVA v 9.0.0.2 o v 13.0.0.2.

Ejemplo 9: Temperatura y Estudio de Estabilidad de Humedad

[000210] Un estudio de estabilidad fue conducido en sal tosilato y sal mesilato del Compuesto 1, a través de un monitoreo de cambios en la cromatografía líquida de alto desempeño (HPLC) de perfiles de impureza para cada sal cuando se exponía a varias condiciones de temperatura y/o humedad. Cada muestra fue colocada en un recipiente cerrado y expuesta a tres ambientes controlados: refrigerado (5 °C), 20 °C y 60 °C de humedad relativa, y 40 °C y 75 °C de humedad relativa. Después de dos semanas, la sal tosilato cristalina se considero la forma cristalina más estable del Compuesto 1. El estudio de estabilidad de la sal tosilato cristalina fue continuado.

[000211] Muestras se analizaron por medio del siguiente método de perfil de impurezas HPLC de fase reversa en puntos de tiempo 0, 1, 2, 4 semanas (Tabla 7) y 3 meses (Tabla 8) para la sal tosilato; y 0, 1 y 2 semanas para la sal mesilato (Tabla 9).

[000212] Análisis HPLC de fase reversa fueron realizados usando una columna SYMMETRY SHIELD RP18 (4.6 x 250 mm, tamaño de partícula 5 µm), aunque con un análisis de columna similar o equivalente se esperaría obtener resultados similares. Los componente de fase móvil fueron 0.01 M de acetato de amonio en agua a 3.3 pH (A) y acetonitrilo (B). La composición de fase móvil fue un gradiente que incremento desde 6% a 15 % B en cinco minutos, mantenido en 15% B por 15 minutos, incremento desde 15% a 60% B en 10 minutos, luego

144

desde 60% a 90% B en dos minutos, y después el sistema fue re equilibrado a 6% B por cuatro minutos.

La tasa de flujo fue 1.0 mL/minuto, y el volumen de inyección fue 10.0 µL. La temperatura de columna a 30 °C. La detección por luz ultravioleta (UV) a 280 nm.

El tiempo de retención para el Compuesto 1 fue aproximadamente 15.7 minutos. La solución de muestra fue preparada en fase móvil A a una concentración final de 2.0 mg/mL.

145

Tabla 7

Punto en el tiempo	Total Impurezas **	RRT 0.52 (%)	RRT 0.77 (%)	RRT 0.93 (%)	RRT 1.19 (%)	RRT*** 1.26 (%)	RRT 1.77 (%)	Compuesto 1 (%)
Inicial	1.60	0.06	ND	ND	0.24	1.2	0.10	98.4
1 Semana								
5 °C	1.51	0.09	ND	ND	0.21	1.1	0.11	98.5
20 °C & 60% RH*	1.63	0.09	ND	ND	0.21	1.2	0.12	98.3
40 °C & 75% RH	1.80	0.09	0.05	ND	0.21	1.3	0.14	98.2
2 Semanas								
5 °C	1.62	0.08	ND	0.08	0.24	1.1	0.12	98.4
20 °C & 60% RH	1.66	0.08	ND	0.08	0.25	1.1	0.15	98.4
40 °C & 75% RH	1.68	0.08	ND	0.09	0.25	1.1	0.16	98.3
4 Semanas								
5 °C	1.61	0.09	0.08	0.07	0.23	1.0	0.14	98.3
20 °C & 60% RH	1.84	0.10	0.10	0.12	0.24	1.1	0.18	98.2
40 °C & 75% RH	1.96	0.10	0.17	0.13	0.26	1.1	0.20	98.1

*RH denota humedad relativa

**Total impurezas incluidas todas las impurezas en un grupo específico

***RRT 1.26 denota beta-epímero

Tabla 8

Punto en el Tiempo	20°C & 60% RH*				40°C & 75% RH			
	Beta-epímero	4-keto	M-2	Total	Beta-epímero	4-Ceto	M-2	Total
	RRT=1.26	Compuesto RRT=1.57	Impureza RRT=0.84	Impureza **	RRT=1.26	Compuesto RRT=1.57	Impureza RRT=0.84	Impureza
mes 0	1.76%	0.05%	-	2.12%	1.76%	0.05%	-	2.12%
mes 3	1.74%	0.10%	0.18%	2.86%	1.66%	0.14%	0.31%	3.12%

*RH denota humedad relativa

**Total impurezas incluidas todas las impurezas en un grupo específico

Tabla 9

Punto en el Tiempo	Total Impurezas (%)	RRT 0.52 (%)	RRT 0.77 (%)	RRT 0.93 (%)	RRT 1.19 (%)	RRT 1.26 (%)	RRT 1.77 (%)	Compuesto 1 (%)
Initial	1.70	ND	ND	ND	0.20	1.5	ND	98.3
1 semana								
5 °C	1.85	ND	ND	ND	0.17	1.6	0.08	98.2
20 °C & 60% RH*	2.06	ND	ND	ND	0.17	1.8	0.09	98.0
40 °C & 75% RH	2.97	0.07	0.05	ND	0.16	2.6	0.09	97.1
2 semanas								
5 °C	1.65	ND	ND	0.06	0.20	1.3	0.09	98.3
20 °C & 60% RH	1.87	ND	ND	0.06	0.20	0.11	0.11	98.1
40 °C & 75% RH	3.38	0.05	0.07	0.06	0.19	0.11	0.11	96.6

[000213] Los datos anteriores muestran que la sal tosilato del Compuesto 1 es estable cuando esta almacenada refrigerada y/o condiciones de 20 °C & 60 % RH por al menos cuatro semanas. La sal tosilato del Compuesto 1 es estable a temperatura en un rango desde 0 °C – 70 °C, o en un rango de 5 °C – 50 °C, o en un rango desde 20 °C – 30 °C.

Ejemplo 10: Estudio de Fotoestabilidad

[000214] Un estudio de fotoestabilidad se llevo a cabo en la sal tosilato del Compuesto 1. Dos muestras fueron preparadas en placas de Petri de vidrio transparente. Una muestra fue envuelta en papel aluminio para servir como muestra de control. Ambas muestras fueron ubicadas en el ES 2000 Environmental Light 10 Chamber y expuestas a 12 kilolux de luz fresca fluorescente blanca por un total de 47 horas. Las muestras fueron entonces analizadas por el método de perfil de impureza HPLC, y los resultados se resumen en la Tabla 10.

(47)

Tabla 10

Muestra	RRT	RRT	RRT	RRT	RRT	RRT	RRT	RRT	Compuesto 1
	0.52	0.0.64	0.77	0.83	0.93	1.19	1.26	1.77	(%)
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	
Control	0.06	ND	0.08	ND	0.12	0.26	1.2	0.16	98.2
Expuesto	0.06	ND	0.09	ND	0.13	0.26	1.1	0.16	98.2

Equivalentes

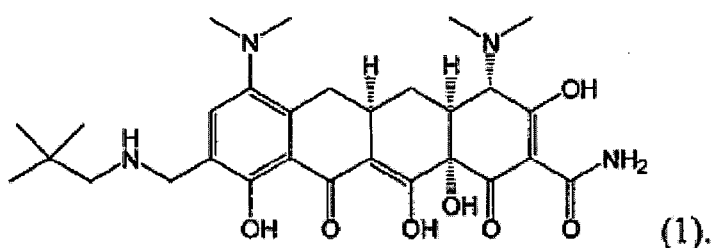
Aquellos con habilidades en el estado de la técnica reconocerán, o estarán en capacidad de determinar usando una o más experimentaciones de rutina, muchas equivalencias para las representaciones y métodos específicos descritos aquí. Tales equivalencias pretenden ser abarcadas por el alcance de las siguientes reivindicaciones.

Todas las patentes, aplicaciones de patentes, referencias literarias citadas aquí están por este medio expresamente incorporadas por referencias.

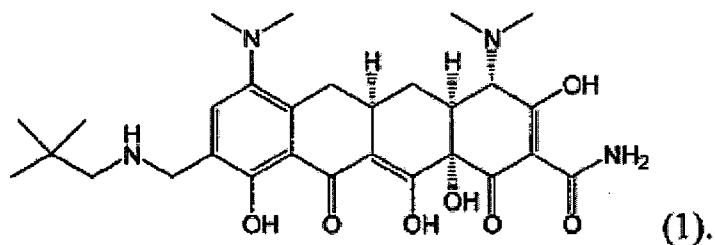
148

REIVINDICACIONES

1. Una forma cristalina del Compuesto 1:



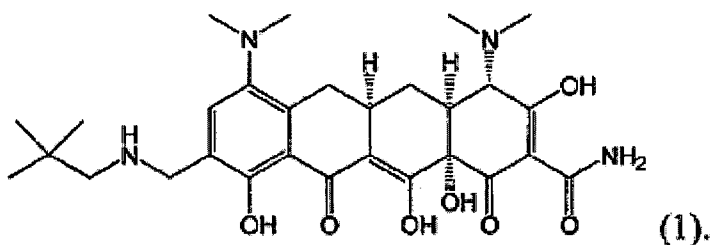
2. Una sal tosionato del Compuesto 1:



3. Una forma cristalina de la sal de la reivindicación 2.
4. Un polimorfo de la forma cristalina de la reivindicación 3, caracterizado por un patrón de difracción de polvo de rayos X sustancialmente similar a aquel establecido en la FIGURA 8.
5. El polimorfo de la reivindicación 4, caracterizado por un patrón de difracción de polvo de rayos X que incluye picos a aproximadamente 8.06, 13.02, y 18.83 $^{\circ}2\theta$ usando radiación Cu K α .

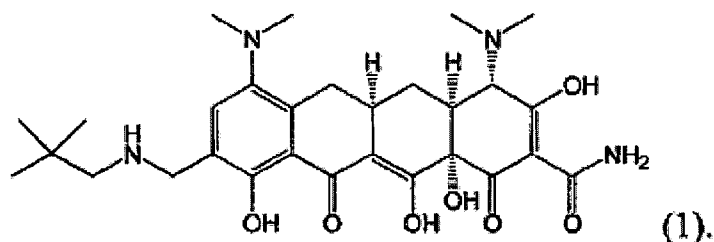
149

6. El polimorfo de la reivindicación 4, caracterizado por un patrón de difracción de polvo de rayos X que incluye picos a aproximadamente 8.06, 11.41, 13.02, 18.83, 20.54, y 24.53 °2 θ usando radiación Cu K α .
7. El polimorfo de la reivindicación 4, caracterizado por un patrón de difracción de polvo de rayos X que incluye picos a aproximadamente 5.60, 8.06, 8.57, 11.41, 13.02, 15.58, 18.83, 20.54 y 24.53 °2 θ usando radiación Cu K α .
8. El polimorfo de la reivindicación 4 por cristalización de la sal tosilato del Compuesto 1:



de isopropanol.

9. Un método de preparación de una sal tosilato cristalina estable del Compuesto 1:



Donde el método incluye:

disolver una base libre del Compuesto 1 en un primer solvente o combinación de solventes para formar una primera solución;

disolver ácido p-toluensulfónico en un segundo solvente o combinación de solventes para formar una segunda solución;

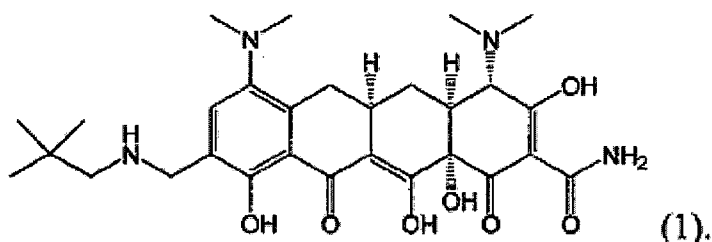
SO

combinar dichas prima y segunda soluciones para formar una tercera solución.

10. El método de la reivindicación 9, donde el primer solvente o combinación de solventes y el segundo solvente o combinación de solventes son iguales o diferentes.
11. El método de la reivindicación 9, donde la primera combinación de solventes y la segunda combinación de solventes son cada una de manera independiente una combinación de solventes alcohólicos.
12. El método de la reivindicación 11, donde cada combinación de solventes es de manera independiente una combinación de dos solventes alcohólicos.
13. El método de la reivindicación 12, donde los dos solventes alcohólicos son etanol e isopropanol.
14. El método de la reivindicación 13, donde el etanol e isopropanol están a una relación volumen a volumen de 2 a 1.
15. El método de la reivindicación 9, donde cada combinación de solventes comprende un solvente alcohólico y un anti-solvente.
16. El método de la reivindicación 15, donde el solvente alcohólico es metanol.
17. El método de la reivindicación 15, donde el anti-solvente es seleccionado de una cetona, un éter y un ester.
18. El método de la reivindicación 17, donde el éter es metil-t-butil éter.

51

- 19.El método de la reivindicación 9, donde cada combinación de solventes comprende metanol y metil-t-butil éter.
- 20.El método de la reivindicación 19, donde el metanol y metil-t-butil éter están en una relación volumen a volumen de 1 a 1.2.
- 21.El método de la reivindicación 9, donde el ácido p-toluensulfónico se provee en una cantidad de desde 25 a 75 wt % relativo a la cantidad de dicho Compuesto 1.
- 22.El método de la reivindicación 9, donde el ácido p-toluensulfónico se provee en una forma de un ácido p-toluensulfónico monohidrato.
- 23.El método de la reivindicación 9, además comprendiendo la adición de una sal tosilato polimorfa de forma 1 del Compuesto 1 a dicha tercera solución para formar una cuarta solución.
- 24.El método de la reivindicación 23, donde la cuarta solución forma una sustancia acuosa al agitarse.
- 25.El método de la reivindicación 24, además comprendiendo el secado de la sustancia acuosa.
- 26.Un polimorfo de sal tosilato del Compuesto 1:



Obtenido de acuerdo con el método de la reivindicación 9.

S\$

27. Una composición farmacéutica que comprende una sal cristalina de la reivindicación 3 y un diluyente, excipiente o portador farmacéuticamente aceptable.

28. Una composición farmacéutica que comprende el polimorfo de la reivindicación 4 y un diluyente, excipiente o portador farmacéuticamente aceptable.

29. La composición farmacéutica de la reivindicación 28 donde dicho polimorfo esté en una forma pura.

SB

1/10

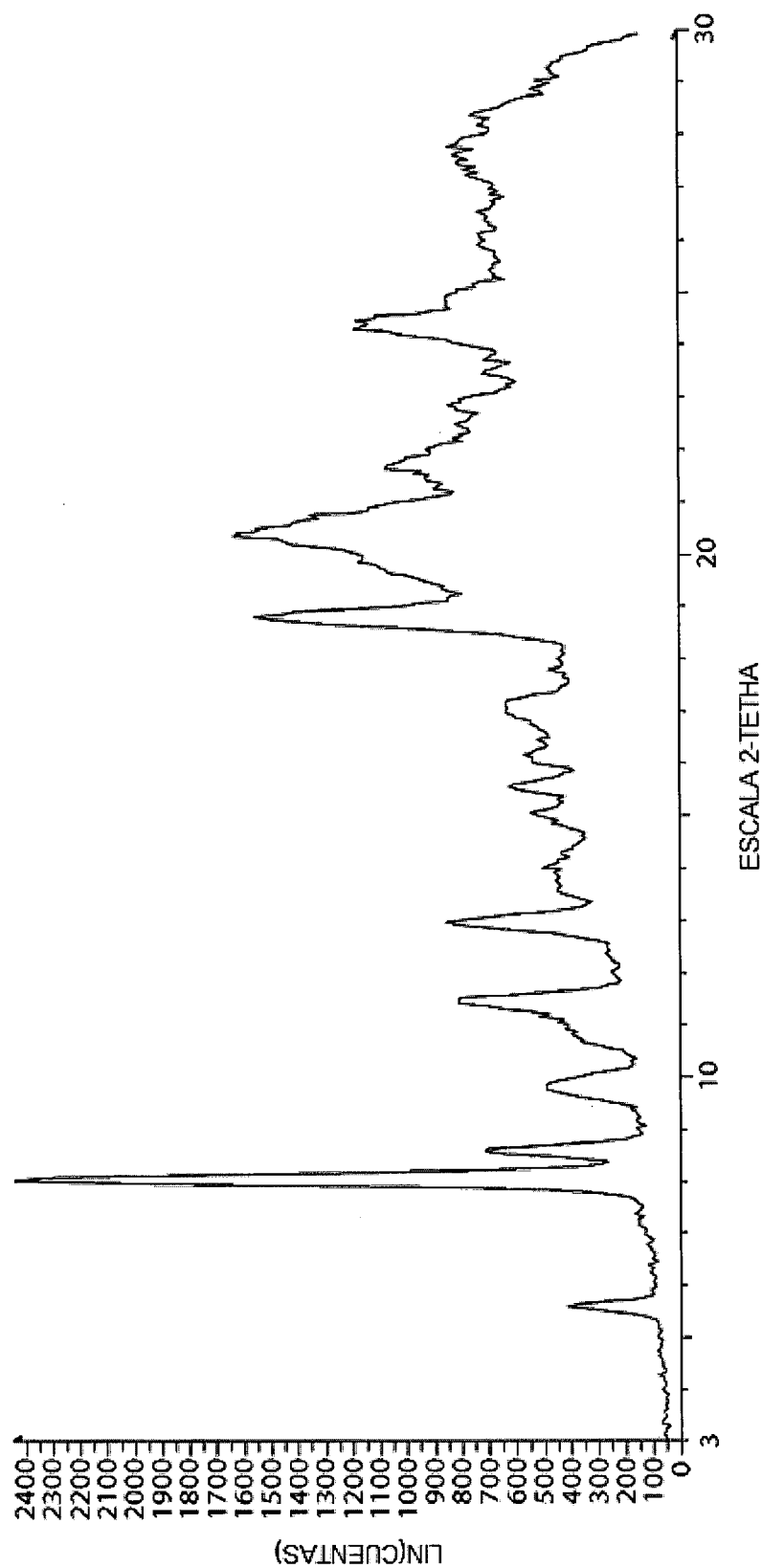


Fig. 1

154

2/10

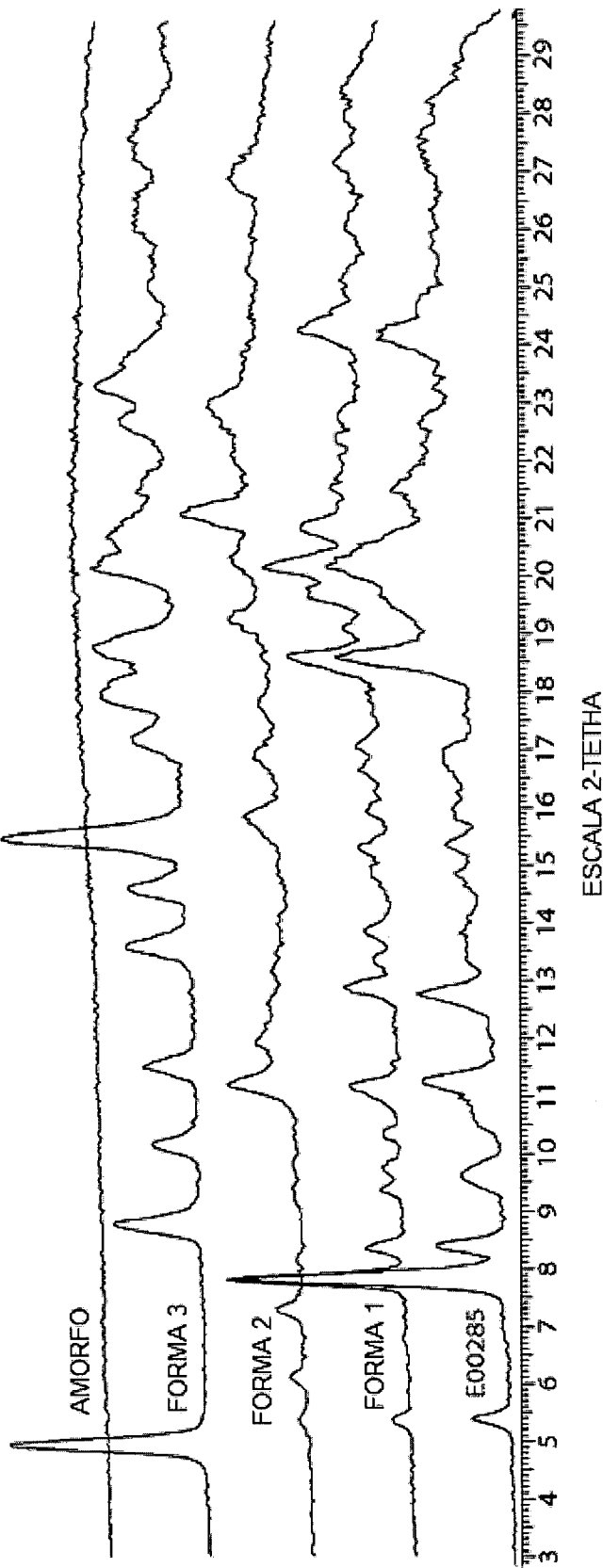


Fig. 2

185

3/10

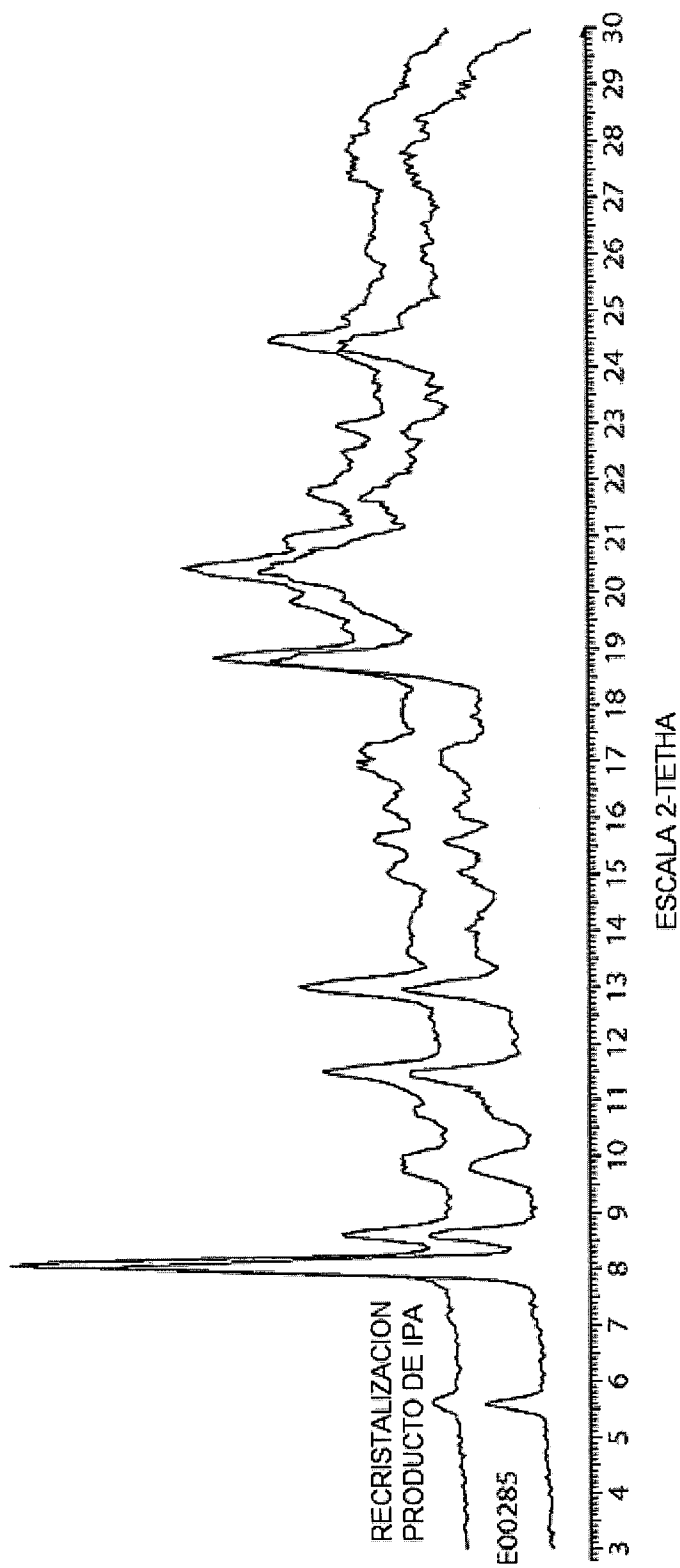


Fig. 3

4/10

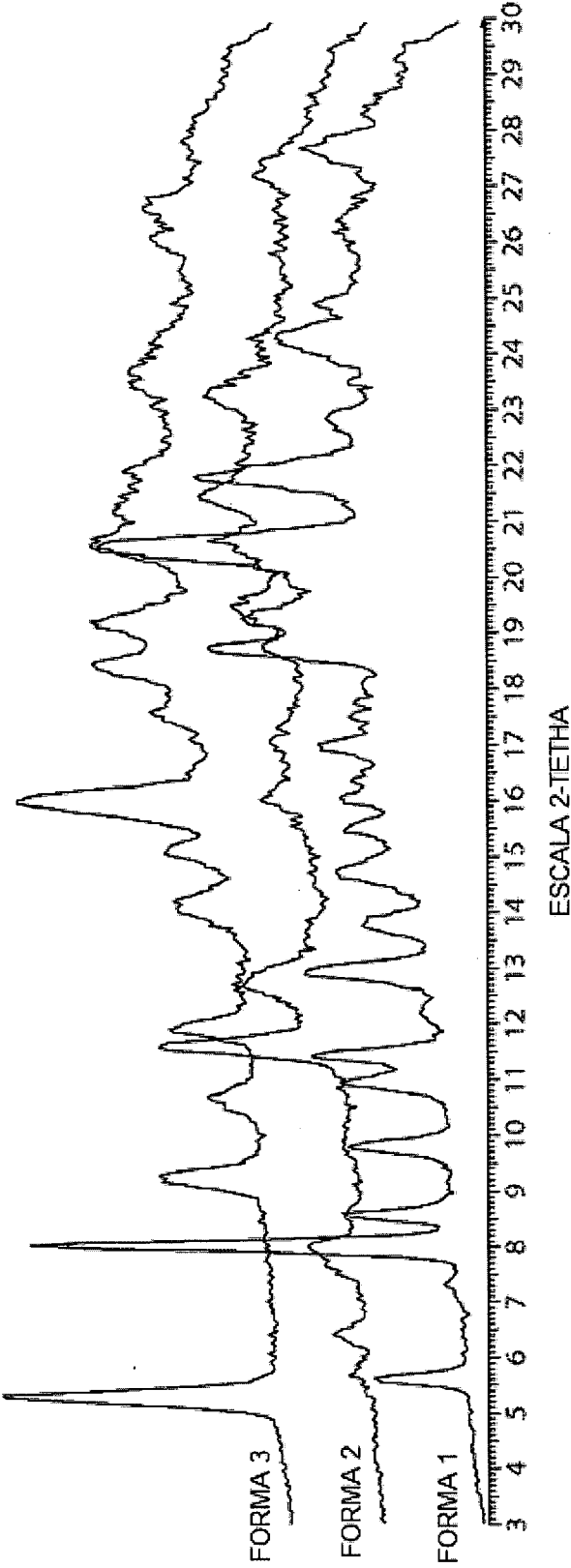


Fig. 4

157

5/10

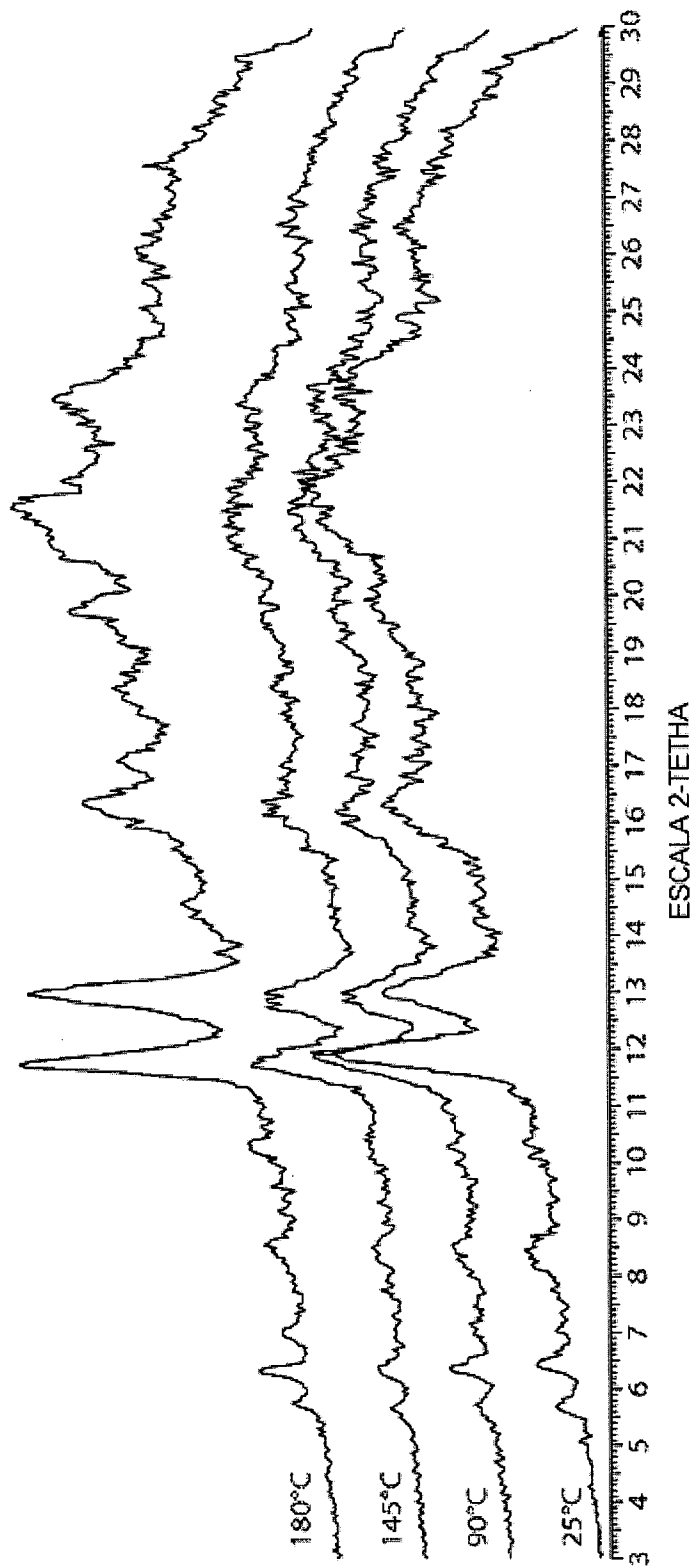


Fig. 5

6/10

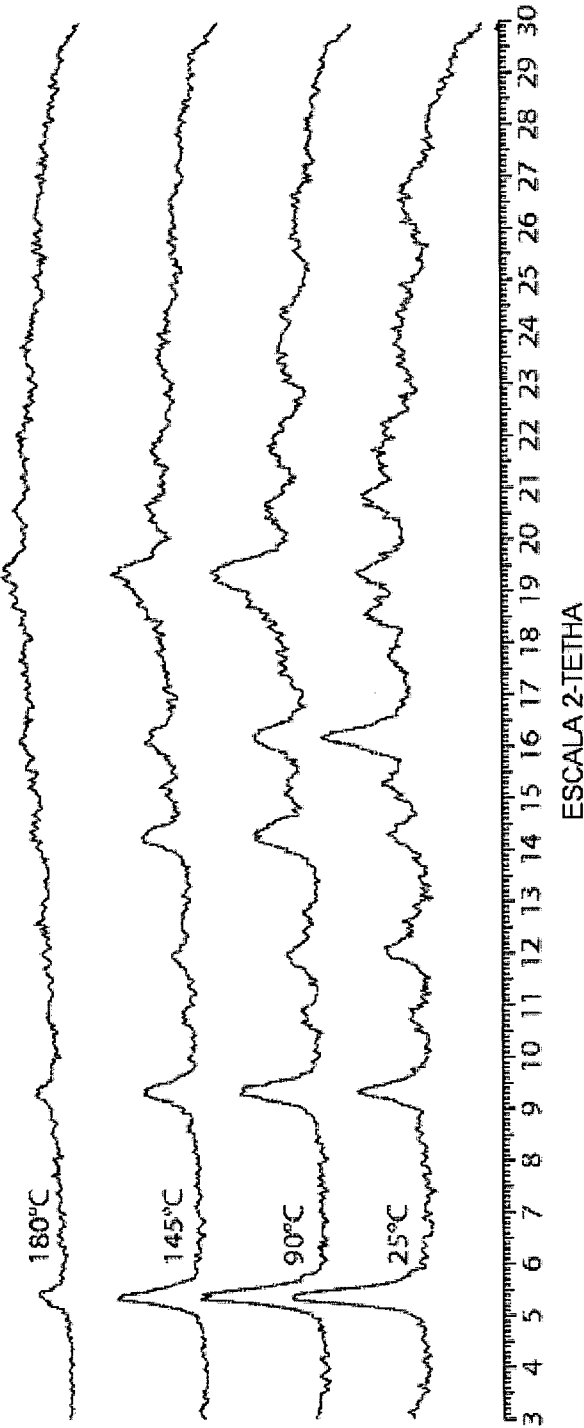


Fig. 6

7/10

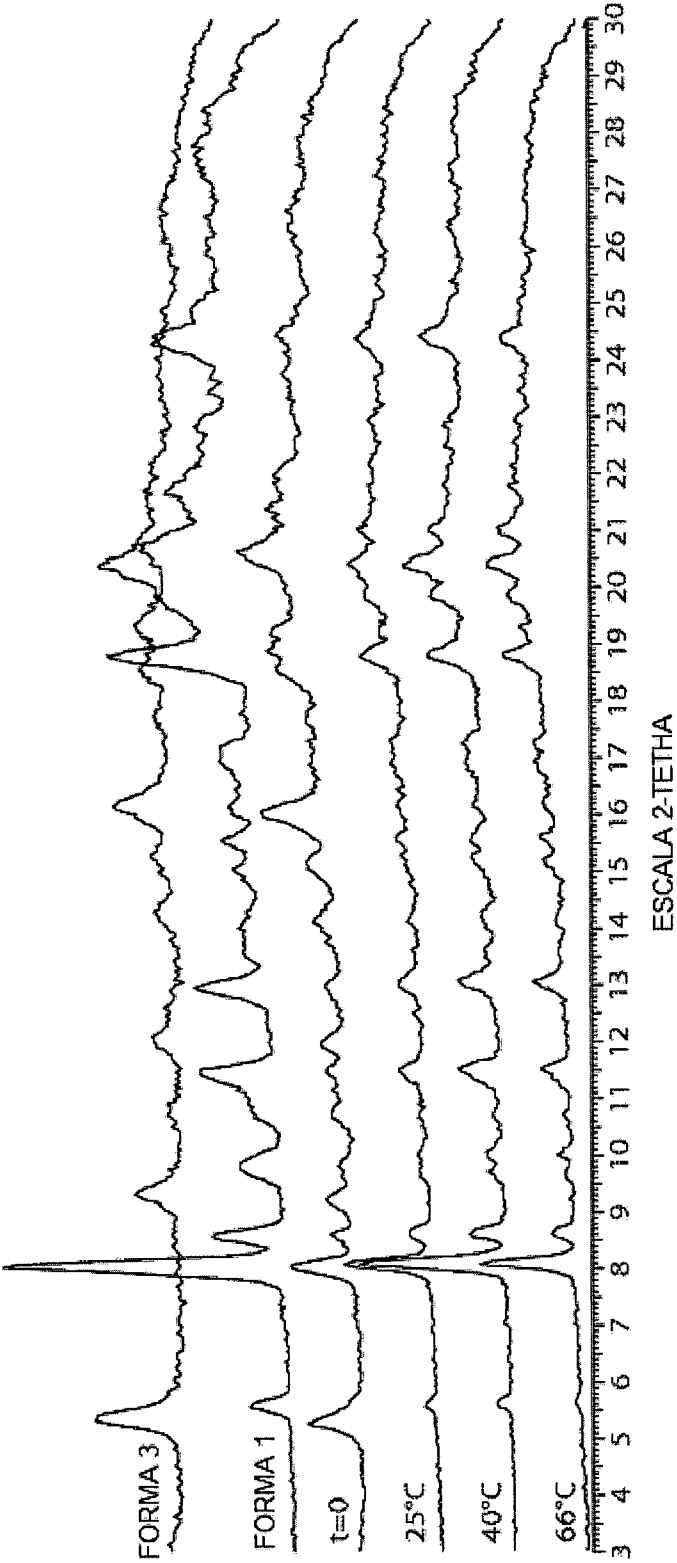
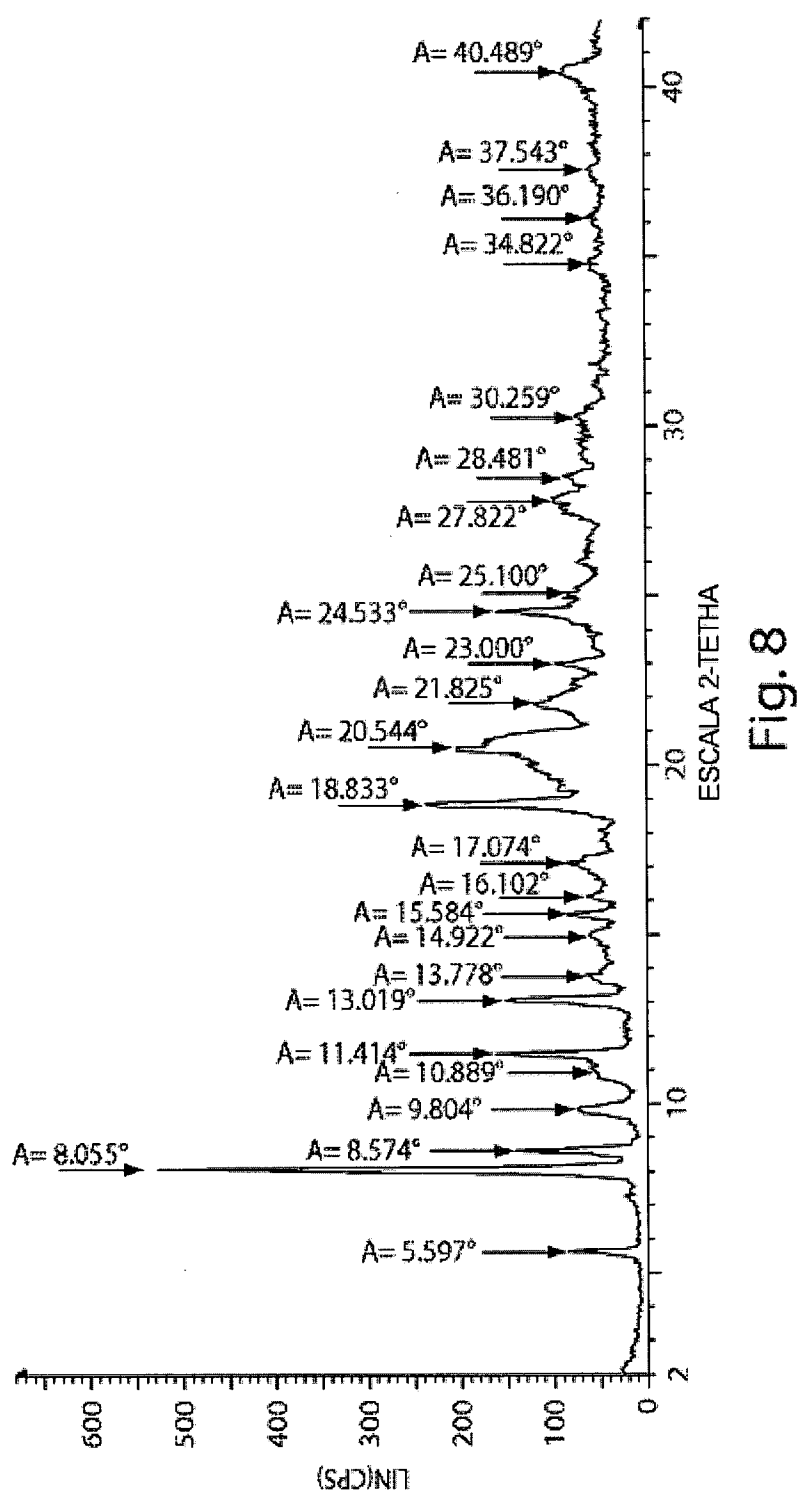


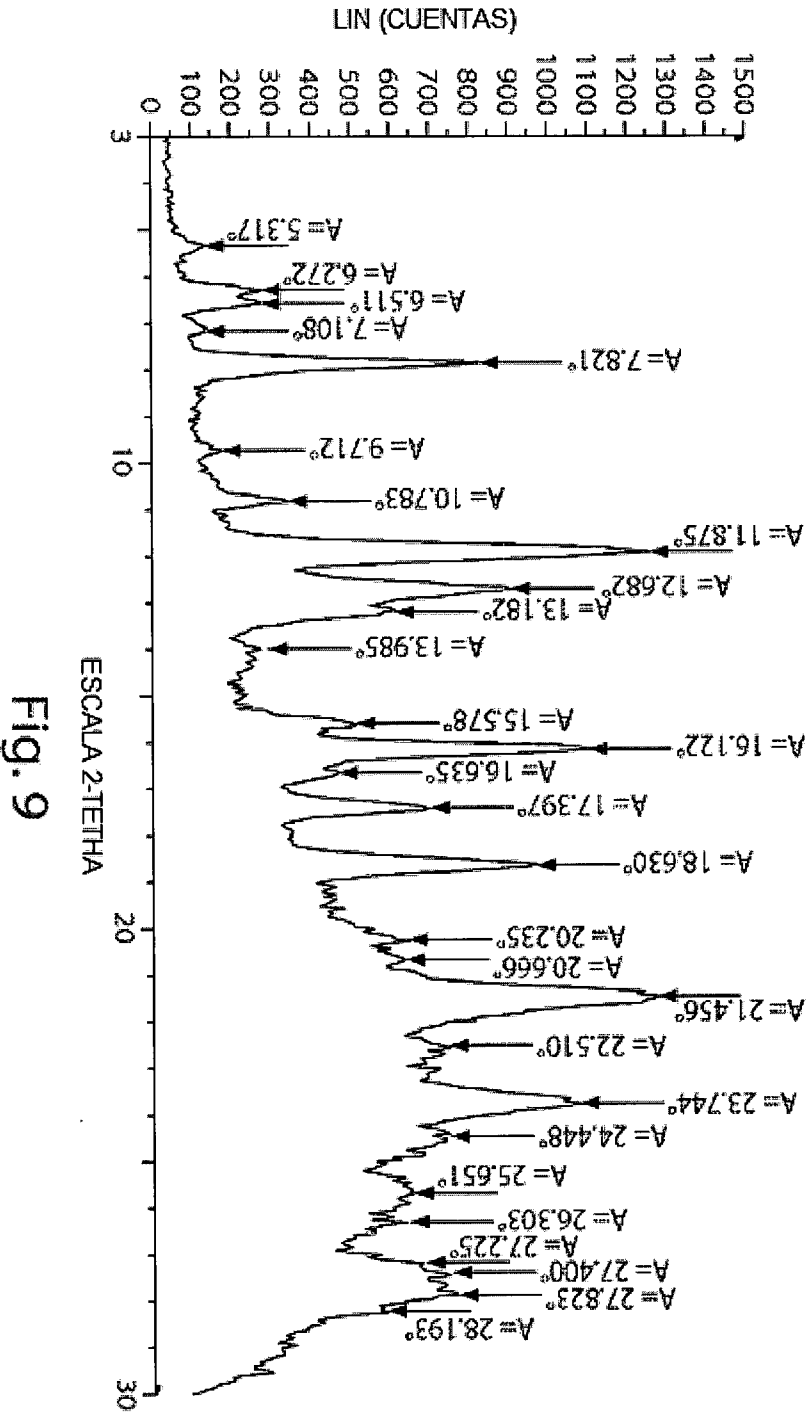
Fig. 7

8/10



HOJA DE SUSTITUCIÓN (REGLA 26)

9/10



1625

10/10

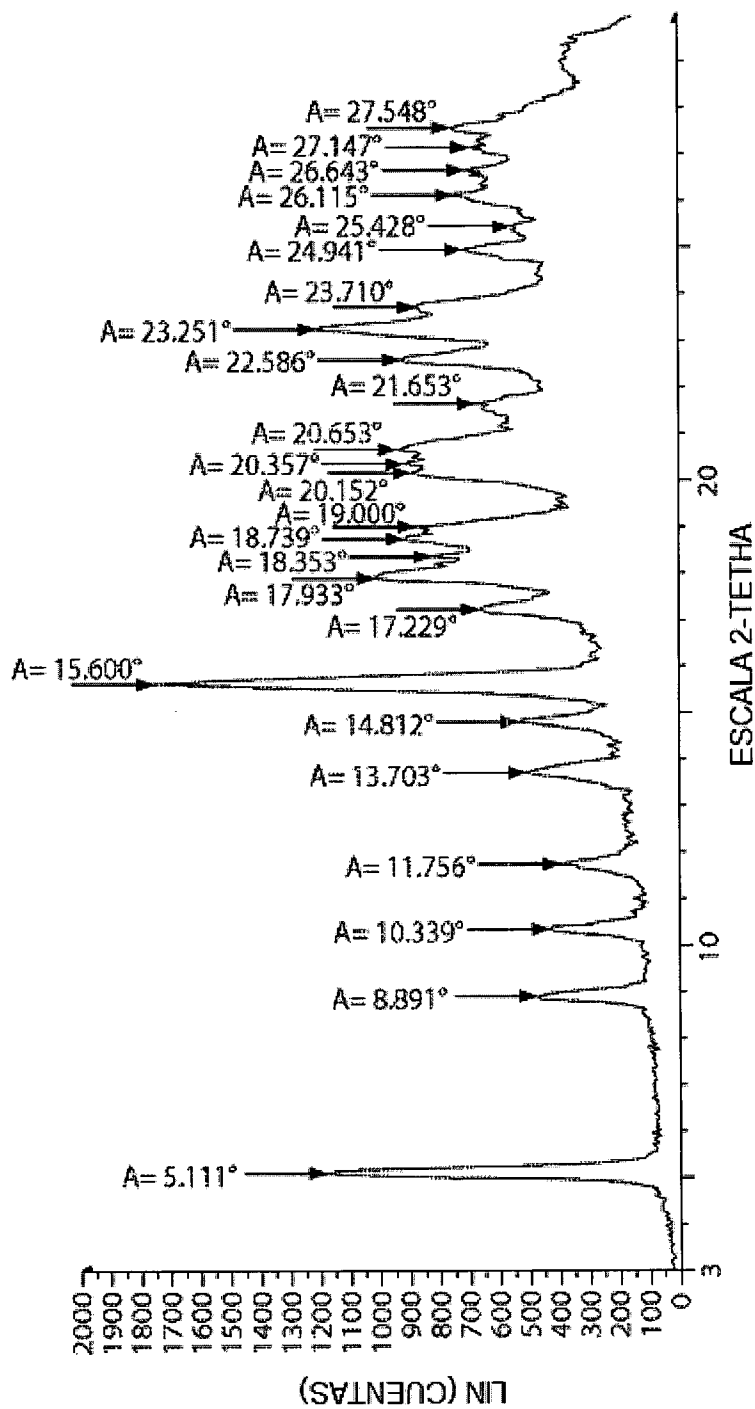


Fig. 10

163

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 09/45143

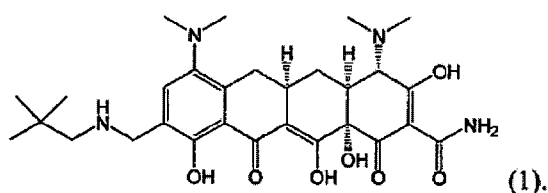
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - A01N 37/18 (2009.01) USPC - 514/152 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC				
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) USPC- 514/152 IPC (8): A01N 37/18 (2009.01)				
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC- 514/152 ;548/428 (See keywords below) IPC (8): A01N 37/18 (2009.01) (See keywords below)				
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) WEST: DB=PGPB,USPT,USOC,EPAB,JPAB ; Google: Scholar/patents: for tetracycline crystalline polymorphs salts aminomethylcycline				
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT				
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.		
X ----- Y	US 7,326,696 B2 (NELSON et al) 05 February 2008 (05.02.2008) Col 4, ln 23-25; Col 47, Table 1, Compound 2; Col 107, ln 29-33 ;Col 103, ln 55; Col 103, ln 42-67; Col 104, ln 1-4;Col 107, ln 22-34; Col 108, ln 18-20	2 ----- 1; 3-29		
Y	HALEBLIAN et al. "Pharmaceutical Applications of Polymorphism, J. Pharma. Sci, 1969, Vol 58, pp 911-929. pg 917,Col 1; pg 918, Col 1; pg 920, Col 2	1; 3-29		
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐				
<table border="0"> <tr> <td> * Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed </td> <td> "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family </td> </tr> </table>			* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family			
Date of the actual completion of the international search 27 August 2009 (27.08.2009)		Date of mailing of the international search report 04 SEP 2009		
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201		Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774		

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES
EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN
SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT

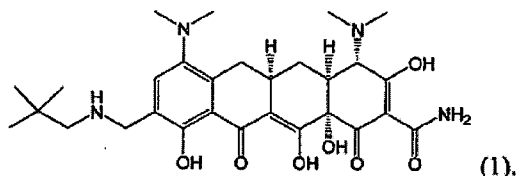
(21) N° de solicitud:	(51) Int Cl:	A01N 037/018
22) Fecha de solicitud:	(71) Solicitante(s)	PARATEK PHARMACEUTICALS, INC.
(30) Prioridad	(31) Prioridad	(32) Fecha
	61/128,712	23/05/2008
		(33) País
		US
	(72) Inventor(es)	RAYMOND CVETOVICH TADEUSZ WARCHOL
	(74) Apoderado:	LUZ CLEMENCIA DE PAEZ
(85) Fecha limite inicio fase nacional:	(87) Publicación internacional	
(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT	Fecha:	26/11/2009
Fecha de presentación de la solicitud:	N° publicación:	WO 2009/143509 A1
No. de solicitud PCT/US2009/045143		
(54) Título: SALES Y POLIMORFOS DE UN COMPUESTO DE TETRACICLINA		

Reivindicación(es):

1. Una forma cristalina del Compuesto 1:

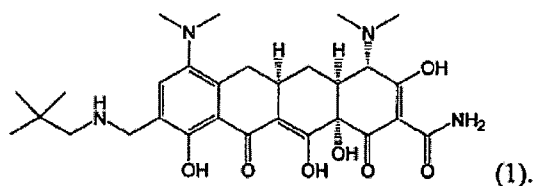


2. Una sal tosionato del Compuesto 1:



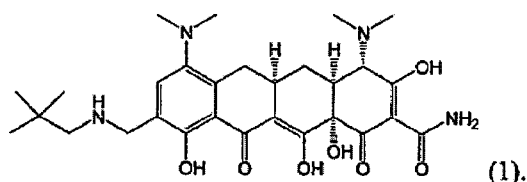
3. Una forma cristalina de la sal de la reivindicación 2.
4. Un polimorfo de la forma cristalina de la reivindicación 3, caracterizado por un patrón de difracción de polvo de rayos X sustancialmente similar a aquel establecido en la FIGURA 8.
5. El polimorfo de la reivindicación 4, caracterizado por un patrón de difracción de polvo de rayos X que incluye picos a aproximadamente 8.06, 13.02, y 18.83 °2 θ usando radiación Cu K α .
6. El polimorfo de la reivindicación 4, caracterizado por un patrón de difracción de polvo de rayos X que incluye picos a aproximadamente 8.06, 11.41, 13.02, 18.83, 20.54, y 24.53 °2 θ usando radiación Cu K α .
7. El polimorfo de la reivindicación 4, caracterizado por un patrón de difracción de polvo de rayos X que incluye picos a aproximadamente 5.60, 8.06, 8.57, 11.41, 13.02, 15.58, 18.83, 20.54 y 24.53 °2 θ usando radiación Cu K α .

8. El polimorfo de la reivindicación 4 por cristalización de la sal tosilato del Compuesto 1:



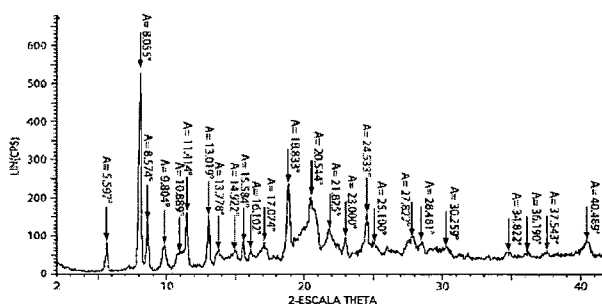
de isopropanol.

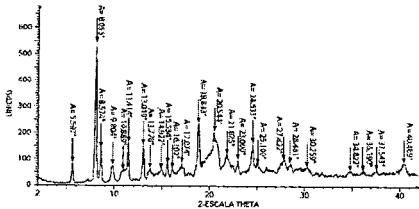
9. Un método de preparación de una sal tosiloato cristalina estable del Compuesto 1:

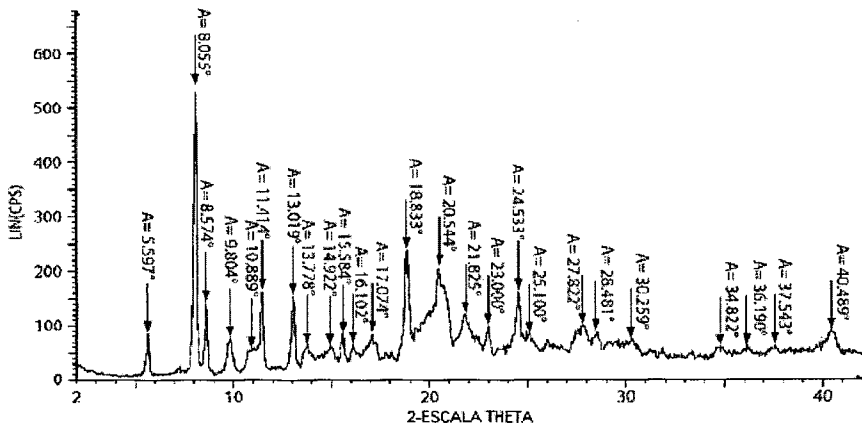


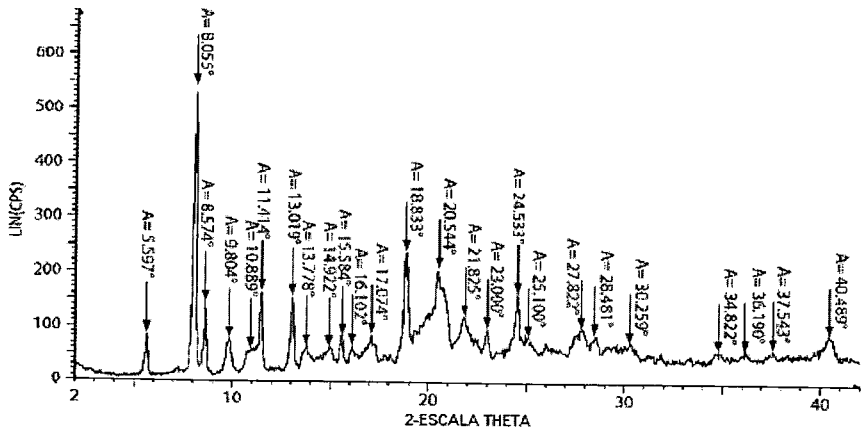
Donde el método incluye:

disolver una base libre del Compuesto 1 en un primer solvente o combinación de solventes para formar una primera solución;
disolver ácido p-toluensulfónico en un segundo solvente o combinación de solventes para formar una segunda solución;
combinar dichas prima y segunda soluciones para formar una tercera solución.









166

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-160851- -00000-0000

Fecha: 2010-12-22 12:14:16 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 170

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 10 - 104,176
FECHA : DICIEMBRE 7 DE 2010

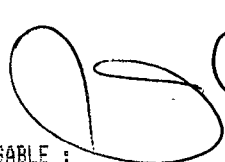
***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	146320775	06/12/2010	63,501,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-03	CAMBIO DE MODALIDAD Y MODIFICA	
		12 MARCAS Y LEMAS COMERCIALES	114,000.00
		TOTAL :	\$ 114,000.00

SON: CIENTO CATORCE MIL PESOS

 C.C. 17905- 841-002-0

RESPONSABLE :

167

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 10 - 104,274
FECHA : DICIEMBRE 7 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 10-160851-00000-0000
Fecha: 2010-12-22 12:14:16 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 170

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	146320775	06/12/2010	63,501,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09	OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I *** TASA ANUAL C.RECARGO AÑOS 13 a 16	900,000.00

TOTAL : \$ 900,000.00

SON: NOVECIENTOS MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

COLO: 17905-841-002-0

168

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

CERTIFICACION DE EXCEDENTE : 10 - 107,365
FECHA : DICIEMBRE 16 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-160851- -00000-0000

Fecha: 2010-12-22 12:14:16 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 170

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	146326876	16/12/2010	26,430,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09	OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	
		99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS	5,000.00
		TOTAL :	\$ 5,000.00

SON: CINCO MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

ESTA CERTIFICACION DE EXCEDENTE DE PAGO SOLO PODRA SER UTILIZADA
COMO PARTE DE LA CANCELACION DE UNA TARIFA VIGENTE Y NO PODRA SER
SUSTITUIDA POR NINGUN RECIBO.

COLO: 17905- 841-002-0

169

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

CERTIFICACION DE EXCEDENTE : 10 - 107,366
FECHA : DICIEMBRE 16 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-160851-00000-0000

Fecha: 2010-12-22 12:14:16 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 170

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	146326976	16/12/2010	26,430,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09	OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	
		99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS	5,000.00
		TOTAL :	\$ 5,000.00

SON: CINCO MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

ESTA CERTIFICACION DE EXCEDENTE DE PAGO SOLO PODRA SER UTILIZADA
COMO PARTE DE LA CANCELACION DE UNA TARIFA VIGENTE Y NO PODRA SER
SUSTITUIDA POR NINGUN RECIBO.

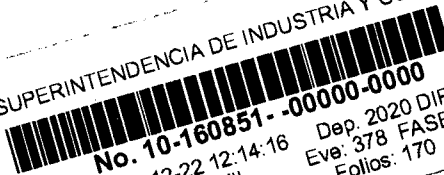
0020: 17905-841-002-0

170

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-160851-00000-0000

Fecha: 2010-12-22 12:14:16

Tra. 11 PATENTEIYII

Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Eve: 378 FASENACIONALI
Folios: 170

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 10 - 108,528
FECHA : DICIEMBRE 20 DE 2010

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754397	144326865	20/12/2010	54,481,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	*** REIVINDICACION UNITARIA ADICIONAL	26,000.00
		TOTAL :	\$ 26,000.00

SDN: VEINTISEIS MIL PESOS

RESPONSABLE

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

COLO: 17905-841-002-0



No. 10-160851- -00000-0000

Fecha: 2010-12-22 12:14:16 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 170

PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO ☐

- ☐ Indicación que se solicita una patente.
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Descripción de la invención
- ☐ Dibujos de ser estos pertinentes
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)
- Completa ☐ Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☒ MODELO DE UTILIDAD PCT ☐ Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

- ☒ Indicación que se solicita una PCT
- ☒ Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
- ☒ Dibujos de ser estos pertinentes
- ☒ Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)
- Completa ☒ Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

- ☐ Indicación que se solicita Diseño Industrial
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas
- Completa ☐ Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

- ☐ Indicación que se solicita un esquema de trazado
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Representación gráfica de un esquema de trazado
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas
- Completa ☐ Incompleta ☐



Bogotá D.C.,
2020

Doctor(a)
SUAREZ DE PAEZ LUZ CLEMENCIA
Apoderado(a) y/o Representante de
PARATEK PHARMACEUTICALS, INC

REFERENCIA	Radicación No.	10 160851
	Solicitud internacional	PCT/US2009/045143
	Fecha inicio fase nacional	23/12/2011
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	0 2 2 3 2

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene el poder debidamente otorgado, con el lleno de los requisitos exigidos por los artículos 63 y subsiguientes del Código de Procedimiento Civil. Adicionalmente, deberá presentar el documento que acredita la existencia y representación legal de la sociedad solicitante, cuando ésta fuere persona jurídica.
2. El solicitante debe presentar un nuevo título que permita identificar la materia de la cual trata la solicitud, ya que el título relacionado no se encuentra con la precisión necesaria para identificar claramente el objeto de la solicitud de patente. (Regla 4.3 PCT, Art 26-27 D-486, Circular única 5.2.9)
3. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante, conforme a lo establecido por el artículo 26 literal k) de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina. Cuando se trate de documentos otorgados en el extranjero, estos deberán legalizarse de conformidad con lo dispuesto por los artículos 259 y 260 del Código de Procedimiento Civil. Cuando se trate de las declaraciones a que hace referencia la Regla 4.17 ii) del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes PCT., el alcance de las tales declaraciones se determinará según indiquen claramente una cesión de derechos del inventor al solicitante o su causante, de conformidad con lo dispuesto en el numeral 5.2.15 del Capítulo Quinto, Título X de la Circular Única de Superintendencia de Industria y Comercio.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Continúa en la página siguiente...



Continuación radicado No: 10 160851



Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Unica No.10 de 2001.

JOSE LUIS SALAZAR LOPEZ
Director de Nuevas Creaciones (E)

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 11 FEB. 2011
adpa11