

PETITORIO

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 07-135330-00000-0000

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

Fecha: 2007-12-21 18:08:35 Dep: 2026 NULORACION
Lvs: 11 PATENTIIYI Lvs: 378 FASLNACIONAL
Act: 411 PRESENTACION Folios: 246

ación

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

①

SOLICITUD DE :

☒

Patente de Invención

☐

Patente de Modelo de Utilidad

☒

Capítulo I.

☐

Capítulo II.

②

SOLICITANTE

(71)

Nombre: WYETH

Dirección: Five Giralda Farms, Madison, New Jersey 07940, Estados Unidos de América

Nacionalidad o Domicilio: Nueva Jersey, Estados Unidos de América

Lugar de Constitución: Delaware, Estados Unidos de América

Teléfono:

Fax:

E-Mail

IDENTIFICACION

C.C.

NIT

C.E.

Otro

Cual

Número

③

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: ALVARO CORREA ORDOÑEZ

Dirección: Avenida 82 No.10-62 Piso 6

Teléfono: 634 1500

Fax: 376 2211

E-Mail: offices.bogota@bakemet.com

IDENTIFICACION

C.C.

NIT

C.E.

Otro

Cual

Número

79.143.366 de
Usaquén

TP 20.281

④

INVENTOR (ES)

(72)

Nombre: KRISHNAN, Lalitha; SUM, Phaik-Eng; DAIGNEAULT, Sylvain; BERNATCHEZ, Michel; PILCHER, Anthony, Scott; HORNE, Jeffrey, Marshall; TUPER, Adam, Joseph; MCCAULEY, Joseph, James. III y MICHAUD, Adam, P.

Dirección: 2 Sonia Court, Suffern, NY 10901, Estados Unidos de América; 16 Chamberlain Court, Pomona, NY 10970, Estados Unidos de América; 201 Des Peupliers, Laval, Quebec, H7R 1G6, Canadá; 3990, Boul. Gouin-est, Montreal-nord, Quebec, H1H 1C6, Canadá; 178 Arbor Lane, Colchester, VT 5446, Estados Unidos de América; PO Box 288, 3 East Street, Mooers, NY 12958, Estados Unidos de América; 10 Oakwood Drive, Rouses Point, NY 12979, Estados Unidos de América; 73 Beekman Street, Plattsburgh, NY 12901, Estados Unidos de América y 3 Pomfret Lane, Essex Junction, VT 05452, Estados Unidos de América, respectivamente

Nacionalidad o Domicilio: Estadounidense, Estadounidense, Canadiense, Canadiense, Estadounidense y Estadounidense, Estadounidense, Estadounidense y Estadounidense, respectivamente.

⑤ PCT (85)

Solicitud Internacional No. PCT/US2006/020540

Fecha 25-MAY-06

Publicación Internacional No. WO/2006/130501

Fecha 07-DIC-06

⑥

Título (54)

TIGECICLINA Y MÉTODOS PARA PREPARAR 9-NITROMINOCICLINA

⑦

Clasificación Internacional (51)

C07C 231/02, A61K 31/65, A61P 31/00, C07C 237/26

⑧

Prioridad

(33) País de Origen

(32) Fecha

(31) Número de Solicitud

SI

☒

NO

☐

US

27-MAY-05

60/685,291

⑨

Comprobante de pago No. 07-93798

Fecha 19-NOV-07

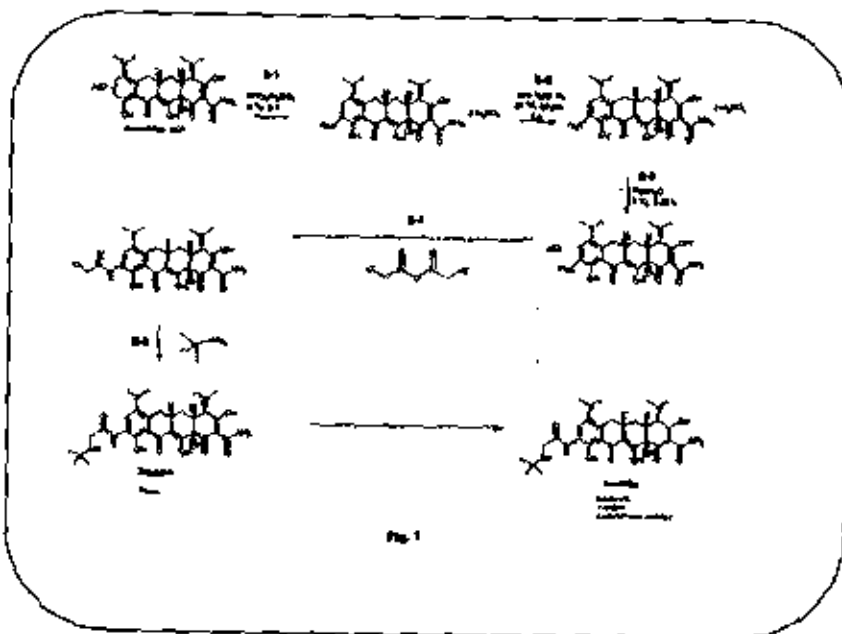
10

ANEXOS

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

11

FIGURA CARACTERISTICA



12

Solicitud de concesión de la patente

NOMBRE: ALVARO ORTIZ ORDONEZ

FIRMA:

79 143 358 de Uruguay

Instrucciones para la presentación de los anexos, ver reverso de esta página

4
00007

TRADUCCIÓN OFICIAL No. 488/07 de un documento escrito en inglés, el cual para su identificación se sella con el sello del Traductor. Esta es una Traducción Oficial efectuada el día 19 de noviembre de 2007 por la Sra. María Teresa Lara, c.c. 41.568.055 de Bogotá, Traductora Oficial según Resolución No. 01016 del 2 de octubre de 1998, expedida por el Ministerio de Justicia.

=====

Poder otorgado por WYETH respecto de la solicitud de patente titulada "TIGECICLINA Y METODOS PARA PREPARAR 9-NITROMINOCICLINA".
Certificación notarial suscrita por Michelle McGowan, Notario Público del estado de Nueva Jersey, y legalizaciones subsiguientes.

EL PODER Y LA CERTIFICACIÓN NOTARIAL NO SE TRADUCEN POR ENCONTRARSE EN INGLÉS Y ESPAÑOL EN EL DOCUMENTO ORIGINAL.

MARIA TERESA LARA R.
TRADUCTORA OFICIAL
RESOLUCION del 02 de OCTUBRE
DE 1998

[Sello] MICHELLE L. MCGOWAN
Notario Público, Estado de Nueva Jersey
No. 2108903
Habilitada en el Condado de Morris
La comisión expira el 9 de febrero de 2011

(Sello notarial
en relieve)

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. País: Estados Unidos de América
2. Este documento público ha sido firmado por: Michelle L. McGowan
3. actuando en calidad de: Notario Público de Nueva Jersey
4. lleva el sello/timbre de: Michelle L. McGowan, Notario

CERTIFICADO

5. en Trenton, Nueva Jersey
6. el día 5 de julio de 2007
7. por Bradley Abelow, TESORERO DE NUEVA JERSEY
8. No. A296283
9. Sello/Timbre:
10. Firma

(Sello del Estado
de Nueva Jersey)

(Fdo.) Bradley Abelow

=====

La anterior es traducción fiel y completa del documento en referencia, de la cual se deja copia en este archivo para su confrontación.

MARIA TERESA LARA R.
TRADUCTORA OFICIAL
RESOLUCIÓN No. 01016
DE OCTUBRE DE 1998
DEL MINISTERIO DE JUSTICIA



María Teresa Lara R.
c.c. 41.568.055 de Bogotá
Traductora Oficial según
Resolución No. 01016 del
2 de octubre de 1998, del
Ministerio de Justicia

APOSTILLE

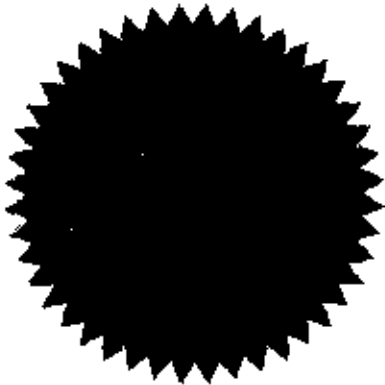
(CONVENTION DE LA HAYE DU 5 OCTOBRE 1961)

1. COUNTRY: UNITED STATES OF AMERICA
2. THIS PUBLIC DOCUMENT HAS BEEN SIGNED BY:
MICHELLE L MC GOWAN
3. ACTING IN THE CAPACITY OF:
NOTARY PUBLIC OF NEW JERSEY
4. BEARS THE SEAL/STAMP OF:
MICHELLE L MC GOWAN, NOTARY

CERTIFIED

5. AT TRENTON, NEW JERSEY
6. THE 5TH DAY OF JULY 2007
7. BY: Bradley Abelow, NEW JERSEY TREASURER
8. NO. A296283
9. SEAL/STAMP:
10. SIGNATURE

Bradley Abelow



NIT: 880.068.840-3
Tel: +57 1 634 1500
Fax: +57 1 376 2211
www.bakermi.com

POWER OF ATTORNEY

'The undersigned,

WYETH

with offices at

Five Giralda Farms, Madison, NJ 07940,
United States of America

declares that it hereby grants to

ALVARO CORREA-ORDOÑEZ and/or
OLGA GEORGETTE OTERO and/or
RICARDO METKE and/or
JUAN PABLO CONCHA

all members of the law firm Raisbeck, Lara, Rodriguez & Rueda, with domicile at Av. 82 No. 10 - 62, 6Th floor, of Bogotá D. C., Colombia, and for so long as they remain members of the law firm, a full and sufficient power of attorney with respect to Colombian patent application(s) based on PCT/US2006/020540 and entitled "TIGECYCLINE AND METHODS OF PREPARING 9-NITROMINOCYCLINE" and to obtain patent protection thereof, for which purpose I (we) authorize the said attorneys to represent me (us) before any authorities or persons, with or without jurisdiction, specially those administrative, administrative contentious and judicial, as well as before Arbitration Court, in all matters concerning the following: a) Obtainment of a patent(s) based upon said patent application(s), including filing of assignments, change of name or address, voluntary cancellation; and defending oppositions, cancellations, nullity, writ mandamus, and in general the civil, penal, an administrative processes relating to those rights.

I hereby ratify all lawful actions previously taken on behalf of this company by the aforementioned attorneys with respect to the mentioned matters.

Done and subscribed in

On the 2nd day of June July 2007

Signature of the person issuing the Power

WYETH

William H. Calnan
Assistant Secretary

PODER DE ABOGADO

La abajo firmada,

WYETH

con oficinas en

Five Giralda Farms, Madison, NJ 07940,
Estados Unidos de América

declara por el presente que otorga a

ALVARO CORREA-ORDOÑEZ y/o
OLGA GEORGETTE OTERO y/o
RICARDO METKE y/o
JUAN PABLO CONCIA

Todos miembros de la firma de abogados Raisbeck, Lara, Rodríguez & Rueda, con domicilio en la Av. 82 No. 10 - 62 Piso 6 en Bogotá D. C., Colombia, y hasta tanto ellos continúen siendo miembros de la firma, poder especial amplio y suficiente con respecto a la solicitud(es) de patente en Colombia basada(s) en PCT/US2006/020540 y titulada

y para obtener la protección de patente de la misma, a cuyo efecto autorizo (amos) a los dichos apoderados para que me (nos) representen ante cualesquiera autoridades o personas, ejerzan o no jurisdicción, especialmente ante las del orden administrativo, contencioso-administrativo y judicial, así como los tribunales de arbitramento, en todo lo concerniente a los siguientes asuntos: a) Obtención de la(s) patente(s) de invención basada(s) en la mencionada solicitud de patente, incluyendo presentación de traspasos, cambio de nombre o dirección, cancelación voluntaria; y defensa en oposiciones, cancelaciones, nulidades, la tutela, y en general procesos civiles, penales, administrativos relacionados con estos derechos.

Iguamente, ratifico todo lo actuado en derecho hasta el momento en nombre de esta compañía por cualquiera de los mencionados apoderados en los casos mencionados.

Dado y firmado en

A los 2 días del mes de julio de 2007

Firma de la persona que firma el Poder

NOTARIAL CERTIFICATION

On this 2nd day of ~~June~~ July
2007, the undersigned Notary

CERTIFIES

1. That **William H. Calnan**

set his hand on the foregoing document.

2. That the grantor is to me personally known and that he/she has legal capacity to execute the instrument.

3. That the grantor has executed the foregoing document as

Assistant Secretary

of the judicial person **WYETH**

4. That the judicial person **WYETH**
having its home office in

Five Giralda Farms, Madison, NJ 07940,
United States of America

is duly organized, has present legal existence and that the purposes for which the power of attorney is granted are within the scope of its corporate purposes.

5. That the grantor has in fact the referred to authority and that his/her representation is legal.

6. That I have based certifications 3, 4 and 5 above on the following authentic documents for such purpose exhibited to me and which I mention specifically, giving their dates and their origin or source:

Minutes of the Board of Directors Meeting held on April 26, 2007
2006.

CERTIFICACION NOTARIAL

A los 2 días del mes de julio
de 2007, el suscrito Notario

1. Que **DA FE**
William H. Calnan

suscribió de su puño y letra el documento que antecede.

2. Que conozco al otorgante y que éste tiene capacidad legal para el otorgamiento.

3. Que el otorgante ha suscrito el referido documento en su carácter de

Subsecretario

de la persona jurídica **WYETH**

4. Que la persona jurídica **WYETH**
con sede en

Five Giralda Farms, Madison, NJ 07940,
Estados Unidos de América

está legalmente constituida, que tiene existencia legal actual y que el acto para el cual se otorga el poder está comprendido entre los que constituyen su objeto social.

5. Que el otorgante tiene efectivamente la representación que ostenta y que ésta es legítima.

6. Que he basado las certificaciones 3, 4 y 5 anteriores en los siguientes documentos auténticos que al efecto se me exhibieron y que menciono específicamente con expresión de sus fechas y de su origen o procedencia:

Actas de la reunión de Junta Directiva celebrada el 26 de abril de 2007.

Michelle L. McGowan
Notary Public

El Notario Público

MICHELLE L. MCGOWAN
Notary Public, State of New Jersey
No. 2108903
Qualified in Morris County
Commission Expires Feb. 9, 2011

TRADUCCIÓN OFICIAL No. 489/07 de un documento escrito en inglés, el cual para su identificación se sella con el sello del Traductor. Esta es una Traducción Oficial efectuada el día 19 de noviembre de 2007 por la Sra. María Teresa Lara, c.c. 41.568.055 de Bogotá, Traductora Oficial según Resolución No. 01016 del 2 de octubre de 1998, expedida por el Ministerio de Justicia.

=====

Cesión a WYETH del invento titulado "TIGECICLINA Y METODOS PARA PREPARAR 9-NITROMINOCICLINA". Certificación notarial suscrita por Barbara A. Kiely, Notario Público del estado de Nueva Jersey, y legalizaciones subsiguientes.

AM102034

DECLARACIÓN JURAMENTADA

MARIA TERESA LARA R.
TRADUCTORA OFICIAL
RESOLUCION No. 01016
DE OCTUBRE DE 1998

Yo, Michelle L. McGowan, Asociada para Legalizaciones, Wyeth, certifico por la presente que la copia adjunta ha sido comparada con la Cesión original (para la U.S.S.N. 60/685,291, y cualquier equivalente legal de la misma en un país extranjero, para el invento titulado: "TIGECICLINA Y METODOS PARA PREPARAR 9-NITROMINOCICLINA"), fechada el 11 de noviembre de 2005 de Anthony Scott Pilcher, Jeffrey Marshall Horne, Adam Joseph Tuper, Joseph James McCauley III y Adam P. Michaud; y fechada el 21 de noviembre de 2005 de Sylvain Daigneault y Michel Bernatchez; y fechada el 28 de noviembre de 2005 de Lalitha Krishnan y Phaik-Eng Sum a Wyeth y que la citada copia es fiel copia del original.

Dado a los 27 días del mes de junio de 2007, en Madison, Nueva Jersey, Estados Unidos de América.

Wyeth

(Fdo.) Michelle L. McGowan

Michelle L. McGowan
Asociada para Legalizaciones

10
00018

PARA USO EN COLOMBIA

RECONOCIMIENTO

Estado de Nueva Jersey)
)
Condado de Morris)

A los 27 días del mes de junio de 2007, ante mi personalmente compareció Michelle L. McGowan, Asociada para Legalizaciones de Wyeth, a quien conozco y de quien me consta que es la persona descrita en el instrumento anterior y quien lo suscribió, y reconoció ante mí haber suscrito el mismo.

(Fdo.) Barbara A. Kiely
Notario Público

(Sello notarial
en relieve)

[Sello] Barbara A. Kiely ID. 33893
Notario Público de Nueva Jersey
Mi comisión expira el 20 de junio de 2009

BARBARA TERESA LARA R.
TRADUCTORA OPORTUNAS
RESOLUCION RA-0180
DE MINSJUR/06

Cesión de Invento

En virtud del pago por la CESIONARIA al CEDENTE de contraprestación válida y valiosa, el recibo de la cual se reconoce por la presente, el CEDENTE:

(1) Nombre Completo del Inventor: Lalitha Krishnan
Residencia: 2 Sonia Court, Suffern, New York 10901
Ciudadanía: Estados Unidos

(2) Nombre Completo del Inventor: Phaik-Eng Sum
Residencia: 16 Chamberlain Court, Pomona, New York 10970
Ciudadanía: Estados Unidos

- (3) Nombre Completo del Inventor: Sylvain Daigneault
Residencia: 201 Des Peupliers, Laval, Qc, Canadá H7R 1G6
Ciudadanía: Canadá
-
- (4) Nombre Completo del Inventor: Michel Bernatchez
Residencia: 3990, boul. Gouin-est, Montreal-nord, Qc, Canadá H1H 1C6
Ciudadanía: Canadá
-
- (5) Nombre Completo del Inventor: Anthony Scott Pilcher
Residencia: 178 Arbor Lane, Colchester, Vermont 05446
Ciudadanía: Estados Unidos
-
- (6) Nombre Completo del Inventor: Jeffrey Marshall Horne
Residencia: PO Box 288, 3 East Street, Mooers, New York 12958
Ciudadanía: Estados Unidos
-
- (7) Nombre Completo del Inventor: Adam Joseph Tuper
Residencia: 10 Oakwood Drive, Rouses Point, New York 12979
Ciudadanía: Estados Unidos
-
- (8) Nombre Completo del Inventor: Joseph James McCauley III
Residencia: 73 Beekman Street, Plattsburgh, New York 12901
Ciudadanía: Estados Unidos
-
- (9) Nombre Completo del Inventor: Adam P. Michaud
Residencia: 3 Pomfret Lane, Essex Junction, Vermont 05452
Ciudadanía: Estados Unidos
-

por la presente vende, cede y traspasa a la CESIONARIA:

Wyeth
Five Girafda Farms
Madison, Nueva Jersey 07940

y a los sucesores, cesionarios y representantes legales de la CESIONARIA, todo derecho, título e interés para los Estados Unidos y sus posesiones territoriales y en todos los países extranjeros, incluidos todos los derechos a reclamar prioridad, en y sobre el invento titulado:

TIGECICLINA Y METODOS PARA PREPARAR 9-NITROMINOCICLINA

e inventado por el CEDENTE y los siguientes inventores adicionales, en caso de haberlos:

y el cual se encuentra en la Solicitud Provisional de los E.U. No. 60/685,291 presentada el: 27 de mayo de 2005

INRIA TERESA LABA R.
TRADUCTORA OFICIAL
REGULACION No. 21994
DE MINISTROS

[] Yo, el suscrito CEDENTE, por la presente autorizo y solicito la inserción anterior del número de solicitud y la fecha de presentación, una vez se conozcan,

[marcar también si se están cediendo solicitud(es) extranjera(s)]

[X] y cualquier equivalente legal de las mismas en un país extranjero,

incluyendo el derecho a reclamar prioridad, incluidas todas y cada una de las mejoras allí divulgadas, y en y sobre todas las Patentes que hayan de obtenerse para dicho invento en virtud de la solicitud anterior o cualquier solicitud provisional, no provisional, de continuación, divisional, de renovación o sustituta de la misma posteriormente presentada, y respecto de Patentes, cualquier reemisión o reexamen de las mismas.

El CEDENTE pacta por el presente que no se ha hecho ni se hará ni se realizará ninguna cesión, venta, acuerdo o gravamen que pudiese entrar en conflicto con esta cesión.

El CEDENTE autoriza a la CESIONARIA a presentar solicitudes y recibir

Patentes para dicho invento en cualquiera de dichos países en su propio nombre, o en nombre del CEDENTE, a su elección.

El CEDENTE pacta y acuerda suscribir u obtener cualquier garantía adicional necesaria del título sobre dicho invento y cualquier Patente que pueda expedirse para el mismo y, en cualquier momento, a solicitud y por cuenta de la CESIONARIA, entregar cualquier testimonio en cualquier interferencia, litigio o proceso relacionado con el mismo y otorgar todos los documentos que puedan ser necesarios o convenientes para perfeccionar el título sobre dicho invento o cualquier Patente que pueda otorgarse para el mismo a la CESIONARIA, sus sucesores, cesionarios u otros representantes legales y, en cualquier momento, a solicitud y por cuenta de la CESIONARIA suscribir cualquier continuación, continuación en parte, solicitud divisional, de renovación o sustituta de la misma, y en cuanto a Patentes y reemisión o reexamen de las mismas, o cualquier otra solicitud adicional de Patente para dicho invento o cualquier parte del mismo, todas las cuales solicitudes y cualesquiera Patentes que se expidan sobre las mismas son por la presente cedidas a la CESIONARIA, y hará todos los juramentos o declaraciones lícitos, y realizará todo los actos lícitos requeridos para adquirir las mismas, sin otra compensación, pero por cuenta de la CESIONARIA, sus sucesores, cesionarios u otros representantes legales.

El CEDENTE autoriza y solicita al Comisionado de Patentes expedir todas y cada una de las Patentes de los Estados Unidos para dicho invento, resultantes de cualquiera de las anteriores solicitudes a su CESIONARIA.

(Fdo.) Lalitha Krishnan
Lalitha Krishnan

Nov. 28, 2005
Fecha

RECONOCIMIENTO

TERESA LARA R.
TRADUCTORA OFICIAL
REGISTRADA EN EL
DE MINISTROS

Estado de Nueva York }
 ss:
Condado de Rockland }

A los 28 días del mes de noviembre de 2005, compareció personalmente ante mí Lalitha Krishnan, a quien conozco como la misma persona descrita en el *instrumento anterior* y quien lo otorgó, y reconoció haber otorgado el mismo, por su propia voluntad y para los propósitos allí señalados.

(Fdo.) Rose Ann D. Jastrow
Notario Público

[Sello] ROSEANN D. JASTROW
 NO. 01JA6085816
 HABILITADA EN EL CONDADO DE ROCKLAND
 MI COMISIÓN EXPIRA 01-06-2007

(Fdo.) Phaik-Eng Sum
Phaik-Eng Sum

Nov. 28, 2005
Fecha

RECONOCIMIENTO

Estado de Nueva York }
 ss:
Condado de Rockland }

A los 28 días del mes de noviembre de 2005, compareció personalmente ante mí Phaik-Eng Sum, a quien conozco como la misma persona descrita en el *instrumento anterior* y quien lo otorgó, y reconoció haber otorgado el mismo, por su propia voluntad y para los propósitos allí señalados.

(Fdo.) Rose Ann D. Jastrow
Notario Público

[Sello] ROSEANN D. JASTROW
 NO. 01JA6085816
 HABILITADA EN EL CONDADO DE ROCKLAND
 MI COMISIÓN EXPIRA 01-06-2007

TERESA LARA R.
TRADUCTORA OFICIAL
RESOLUCION NO. 9176
DE MICHIGANA

(Fdo.) Sylvain Daigneault
Sylvain Daigneault

21 Novembre 2005
Fecha

RECONOCIMIENTO

Estado de CANADA }
 ss:
Provincia de QUEBEC }

A los 21 días del mes de noviembre de 2005, compareció personalmente ante mí Sylvain Daigneault, a quien conozco como la misma persona descrita en el instrumento anterior y quien lo otorgó, y reconoció haber otorgado el mismo, por su propia voluntad y para los propósitos allí señalados.

(Fdo.) Line Martin
Notario Público

Line MARTIN, notario
para la Provincia de Quebec, Canadá
Mi comisión es vitalicia

TERESA LARA R.
TRADUCTORA OFICIAL
RESOLUCION No. 01674
JR MONTEVIDEO

(Fdo.) Michel Bernatchez
Michel Bernatchez

21 Nov 2005
Fecha

RECONOCIMIENTO

Estado de CANADA }
 ss:
Provincia de QUEBEC }

A los 21 días del mes de noviembre de 2005, compareció personalmente ante mí Michel Bernatchez, a quien conozco como la misma persona descrita en el instrumento anterior y quien lo otorgó, y reconoció haber otorgado el mismo, por su propia voluntad y para los propósitos allí señalados.

16
2007/11/16

(Fdo.) Line Martin

Notario Público

Line MARTIN, notario
para la Provincia de Quebec, Canadá
Mi comisión es vitalicia

(Fdo.) Anthony Scott Pilcher

11-Nov-2005

Anthony Scott Pilcher

Fecha

RECONOCIMIENTO

Estado de Vermont }

ss:

Condado de Chittenden }

A los 11 días del mes de noviembre de 2005, compareció personalmente ante mí Anthony Scott Pilcher, a quien conozco como la misma persona descrita en el instrumento anterior y quien lo otorgó, y reconoció haber otorgado el mismo, por su propia voluntad y para los propósitos allí señalados.

(Fdo.) Julie A. Winterbottom

Notario Público

[Sello]

Julie A. Winterbottom
Notario Público, Estado de Nueva York
No. 01WI6023921

Habilitada en el Condado de Clinton
La comisión expira el 3 de mayo de 2007

(Fdo.) Jeffrey Marshall Horne

11-Nov-2005

Jeffrey Marshall Horne

Fecha

RECONOCIMIENTO

Estado de Nueva York }

ss:

Condado de Clinton }

MARIA TERESA LARA R.
TRADUCTORA OFICIAL
REGOLACION No. 21016
DE MINISTROS

A los 11 días del mes de noviembre de 2005, compareció personalmente ante mí Jeffrey Marshall Horne, a quien conozco como la misma persona descrita en el instrumento anterior y quien lo otorgó, y reconoció haber otorgado el mismo, por su propia voluntad y para los propósitos allí señalados.

(Fdo.) Julie A. Winterbottom
Notario Público

[Sello] Julie A. Winterbottom
Notario Público, Estado de Nueva York
No. 01WI6023921
Habilitada en el Condado de Clinton
La comisión expira el 3 de mayo de 2007

(Fdo.) Adam Joseph Tuper
Adam Joseph Tuper

11-Nov-2005
Fecha

RECONOCIMIENTO

Estado de Nueva York }
Condado de Clinton } ss;

A los 11 días del mes de noviembre de 2005, compareció personalmente ante mí Adam Joseph Tuper, a quien conozco como la misma persona descrita en el instrumento anterior y quien lo otorgó, y reconoció haber otorgado el mismo, por su propia voluntad y para los propósitos allí señalados.

(Fdo.) Julie A. Winterbottom
Notario Público

[Sello] Julie A. Winterbottom
Notario Público, Estado de Nueva York
No. 01WI6023921
Habilitada en el Condado de Clinton
La comisión expira el 3 de mayo de 2007

18
60013

(Fdo.) Joseph James McCauley III
Joseph James McCauley III

11-Nov-2005
Fecha

RECONOCIMIENTO

Estado de Nueva York }
 ss:
Condado de Clinton }

A los 11 días del mes de noviembre de 2005, compareció personalmente ante mí Joseph James McCauley III, a quien conozco como la misma persona descrita en el instrumento anterior y quien lo otorgó, y reconoció haber otorgado el mismo, por su propia voluntad y para los propósitos allí señalados.

(Fdo.) Julie A. Winterbottom
Notario Público

[Sello] Julie A. Winterbottom
Notario Público, Estado de Nueva York
No. 01WI6023921
Habilitada en el Condado de Clinton
La comisión expira el 3 de mayo de 2007

TERESA LARA R.
TRADUCTORA OFICIAL
-SOLUCION No. 01110
DE MINISTRIA

(Fdo.) Adam P. Michaud
Adam P. Michaud

11-Nov-2005
Fecha

RECONOCIMIENTO

Estado de Vermont }
 ss:
Condado de Chittenden }

A los 11 días del mes de noviembre de 2005, compareció personalmente ante mí Adam P. Michaud, a quien conozco como la misma persona descrita en el instrumento anterior y quien lo otorgó, y reconoció haber otorgado el mismo, por su propia voluntad y para los propósitos allí señalados.

(Fdo.) Julie A. Winterbottom
Notario Público

[Sello] Julie A. Winterbottom
Notario Público, Estado de Nueva York
No. 01WI6023921
Habilitada en el Condado de Clinton
La comisión expira el 3 de mayo de 2007

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. País: *Estados Unidos de América*
2. Este documento público ha sido firmado por: *Barbara A. Kiely*
3. actuando en calidad de: *Notario Público de Nueva Jersey*
4. lleva el sello/timbre de: *Barbara A. Kiely, Notario*

CERTIFICADO

5. en *Trenton, Nueva Jersey*
6. el día *5 de julio de 2007*
7. por *Bradley Abelow, TESORERO DE NUEVA JERSEY*
8. No. *A296298*
9. Sello/Timbre:
10. Firma

(Sello del Estado
de Nueva Jersey)

(Fdo.) Bradley Abelow

=====

La anterior es traducción fiel y completa del documento en referencia, de la cual se deja copia en este archivo para su confrontación.

MARIA TERESA LARA E.
TRADUCTORA OFICIAL
RESOLUCION No. 2707
DE MICHIGAN

21 7/10/27

APOSTILLE

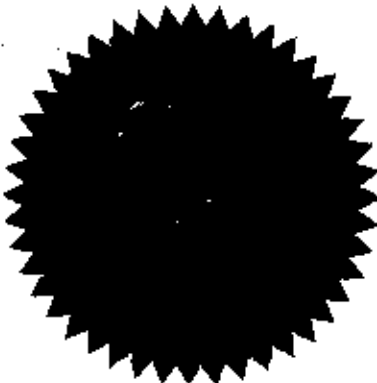
(CONVENTION DE LA HAYE DU 5 OCTOBRE 1961)

1. COUNTRY: UNITED STATES OF AMERICA
2. THIS PUBLIC DOCUMENT HAS BEEN SIGNED BY:
BARBARA A KIELY
3. ACTING IN THE CAPACITY OF:
NOTARY PUBLIC OF NEW JERSEY
4. BEARS THE SEAL/STAMP OF:
BARBARA A KIELY, NOTARY

CERTIFIED

5. AT TRENTON, NEW JERSEY
6. THE 5TH DAY OF JULY 2007
7. BY: Bradley Abelow, NEW JERSEY TREASURER
8. NO. A296298
9. SEAL/STAMP:
10. SIGNATURE

Bradley Abelow



22
60022

AM102034

AFFIDAVIT

I, Michelle L. McGowan, Legalization Associate, Wyeth, do hereby certify that the attached copy has been compared with the original Assignment (for U.S.S.N. 60/685,291, entitled: "TIGECYCLINE AND METHODS OF PREPARING 9-NITROMINOCYCLINE") dated November 11, 2005 from Anthony Scott Pilcher, Jeffrey Marshall Horne, Adam Joseph Tuper, Joseph James McCauley III, and Adam P. Michaud; and dated November 21, 2005 from Sylvain Daigneault and Michel Bernatchez; and dated November 28, 2005 from Lalitha Krishnan and Phaik-Eng Sum to Wyeth and that the said copy is a true copy of the original.

Dated this 27th day of June, 2007, at Madison, New Jersey, United States of America.

Wyeth

Michelle L. McGowan
Michelle L. McGowan
Legalization Associate

TO BE USED IN ECUADOR

ACKNOWLEDGMENT

State of New Jersey)
)
County of Morris)

On this 27th day of June, 2007, before me personally appeared Michelle L. McGowan, Legalization Associate of Wyeth, to me known and known to me to be the individual described in and who executed the foregoing instrument, and she acknowledged to me that she executed the same.

Barbara A. Kiely
Notary Public

Barbara A. Kiely ID. 33893
Notary Public of New Jersey
My Commission Expires June 20, 2009

Assignment of Invention

In consideration of the payment by ASSIGNEE to ASSIGNOR of good and valuable consideration, the receipt of which is hereby acknowledged,
ASSIGNOR:

- (1) Full Name of Inventor: Lalitha Krishnan
Residence: 2 Sonia Court, Suffern, New York 10901
Citizenship: United States

- (2) Full Name of Inventor: Phaik-Eng Sum
Residence: 16 Chamberlain Court, Pomona, New York 10970
Citizenship: United States

- (3) Full Name of Inventor: Sylvain Daigneault
Residence: 201 Des Peupliers, Laval, Qc, Canada H7R 1G6
Citizenship: Canada

- (4) Full Name of Inventor: Michel Bernatchez
Residence: 3990, boul. Gouin-est, Montreal-nord, Qc, Canada H1H 1C6
Citizenship: Canada

- (5) Full Name of Inventor: Anthony Scott Pilcher
Residence: 178 Arbor Lane, Colchester, Vermont 05446
Citizenship: United States

- (6) Full Name of Inventor: Jeffrey Marshall Horne
Residence: PO Box 288, 3 East Street, Mooers, New York 12958
Citizenship: United States

- (7) Full Name of Inventor: Adam Joseph Tuper
Residence: 10 Oakwood Drive, Rouses Point, New York 12979
Citizenship: United States

- (8) Full Name of Inventor: Joseph James McCauley III
Residence: 73 Beekman Street, Plattsburgh, New York 12901
Citizenship: United States

(9) Full Name of Inventor: Adam P. Michaud
Residence: 3 Pomfret Lane, Essex Junction, Vermont 05452
Citizenship: United States

hereby sells, assigns and transfers to ASSIGNEE:

Wyeth
Five Giralda Farms
Madison, New Jersey 07940

and the successors, assigns and legal representatives of the ASSIGNEE the entire right, title and interest for the United States and its territorial possessions and in all foreign countries, including all rights to claim priority, in and to the invention entitled:
TIGECYCLINE AND METHODS OF PREPARING 9-NITROMINOCYCLINE

and invented by ASSIGNOR and the following additional inventors, if any:

and which is found in U.S. Provisional Application No. 60/685,291 filed on: May 27, 2005.

☐ I/we the ASSIGNOR signing below, hereby authorize and request insertion above of the application number and filing date, when they become known,

[also check if foreign application(s) is(are) also being assigned]

☒ and any legal equivalent thereof in a foreign country,

including the right to claim priority, including any and all improvements disclosed therein, and in and to all Letters Patent to be obtained for said invention by the above application or any subsequently filed provisional, nonprovisional, continuation, divisional, renewal, or substitute thereof, and as to Letters Patent any reissue or re-examination thereof.

ASSIGNOR hereby covenants that no assignment, sale, agreement or encumbrance has been or will be made or entered into which would conflict with this assignment.

ASSIGNOR authorizes ASSIGNEE to make applications for and to receive Letters patent for said invention in any of said countries in its own name, or in ASSIGNOR's name, at its election.

ASSIGNOR covenants and agrees to execute or procure any further necessary assurance of the title to said invention and any Letters Patent which may issue therefore and to, at any time, upon the request and at the expense of ASSIGNEE deliver any testimony in any interference, litigation or proceeding related thereto and execute all papers that may be necessary or desirable to perfect the title to said invention or any Letters Patent which may be granted therefore in ASSIGNEE, its successors, assigns or other legal representatives, and that to, at any time, upon the request and at the expense of ASSIGNEE execute any continuation, continuation-in-part, divisional, renewal or substitute thereof, and as to Letters Patent and reissue or re-examination thereof, or any other additional applications of Letters Patent for said invention or any part thereof, all of which applications and any Letters Patent issuing thereon are hereby assigned to ASSIGNEE, and will make all rightful oaths or declarations, and do all lawful acts requisite for procuring the same therein, without further compensation, but at the expense of ASSIGNEE, its successors, assigns or other legal representatives.

25
01/02/05

ASSIGNOR authorizes and requests the Commissioner of Patents to issue any and all Letters Patent of the United States for said invention, resulting from any of the aforesaid applications to its ASSIGNEE.

Lalitha Krishnan

Lalitha Krishnan

Nov. 28, 2005

Date

ACKNOWLEDGMENT

State of New York }

ss:

County of Rockland }

On the 28th day of November 2005, Lalitha Krishnan personally appeared before me, known by me to be the same person described in and who executed the foregoing instrument, and acknowledged that he/she executed the same, of his/her own free will and for the purposes set forth.

ROSEANN D. JASTROW
NO. 01JAG085818
QUALIFIED IN ROCKLAND COUNTY
MY COMMISSION EXPIRES 01-06-2007

Roseann D. Jastrow
Notary Public

~~~~~

Phaik Eng Sum  
Phaik-Eng Sum

Nov 28, 2005  
Date

ACKNOWLEDGMENT

State of New York }  
County of Rockland }

On the 28<sup>th</sup> day of November 2005, Phaik-Eng Sum personally appeared before me, known by me to be the same person described in and who executed the foregoing instrument, and acknowledged that he/she executed the same, of his/her own free will and for the purposes set forth.

ROSEANN D. JASTROW  
NO. 01JA6086616  
QUALIFIED IN ROCKLAND COUNTY  
MY COMMISSION EXPIRES 01-06-20 07

Rose Ann D. Jastrow  
Notary Public

Sylvain Daigneault  
Sylvain Daigneault

21 NOVEMBER, 2005  
Date

ACKNOWLEDGMENT

State of CANADA }  
County of PROVINCE OF QUEBEC }

On the 21<sup>st</sup> day of November 2005, Sylvain Daigneault personally appeared before me, known by me to be the same person described in and who executed the foregoing instrument, and acknowledged that he/she executed the same, of his/her own free will and for the purposes set forth.

Gene Martin  
Gene MARTIN, notary  
for the Province of Quebec, Canada  
My commission is for life  
Notary Public

27  
000097

Michel Bernatchez  
Michel Bernatchez

21-Nov-2005  
Date

ACKNOWLEDGMENT

State of CANADA )  
County of PROVINCE OF QUEBEC ) ss:

On the 21st day of November, 2005, Michel Bernatchez personally appeared before me, known by me to be the same person described in and who executed the foregoing instrument, and acknowledged that he/she executed the same, of his/her own free will and for the purposes set forth.

Gene Martin  
Gene MARTIN, notary  
for the Province of Quebec, Canada  
My commission is for life

Notary Public

Anthony Scott Pilcher  
Anthony Scott Pilcher

11-Nov-2005  
Date

ACKNOWLEDGMENT

State of Vermont )  
County of Chittenden ) ss:

On the 11th day of November, 2005, Anthony Scott Pilcher personally appeared before me, known by me to be the same person described in and who executed the foregoing instrument, and acknowledged that he/she executed the same, of his/her own free will and for the purposes set forth.

Julie A. Winterbottom  
Notary Public, State of New York  
No. 01W16023921  
Qualified in Clinton County  
Commission Expires May 3, 2007

Julie A. Winterbottom  
Notary Public

Jeffrey Marshall Horne  
Jeffrey Marshall Horne

11-Nov-2005  
Date

ACKNOWLEDGMENT

State of New York }  
County of Clinton } ss:

On the 11th day of November 2005, Jeffrey Marshall Horne personally appeared before me, known by me to be the same person described in and who executed the foregoing instrument, and acknowledged that he/she executed the same, of his/her own free will and for the purposes set forth.

Julie A. Winterbottom  
Notary Public, State of New York  
No. 01W16023921  
Qualified in Clinton County  
Commission Expires May 3, 2007

Julie A. Winterbottom  
Notary Public

Adam Joseph Tuper  
Adam Joseph Tuper

11 NOV 2005  
Date

ACKNOWLEDGMENT

State of NEW YORK }  
County of CLINTON } ss:

On the 11th day of NOVEMBER 2005, Adam Joseph Tuper personally appeared before me, known by me to be the same person described in and who executed the foregoing instrument, and acknowledged that he/she executed the same, of his/her own free will and for the purposes set forth.

Julie A. Winterbottom  
Notary Public, State of New York  
No. 01W16023921  
Qualified in Clinton County  
Commission Expires May 3, 2007

Julie A. Winterbottom  
Notary Public

29.  
Gunnag

  
Joseph James McCauley III

11-Nov-2005  
Date

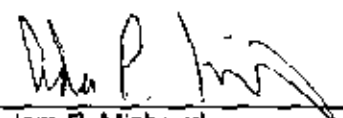
ACKNOWLEDGMENT

State of New York }  
County of Clinton } ss:

On the 11<sup>th</sup> day of November 2005, Joseph James McCauley III personally appeared before me, known by me to be the same person described in and who executed the foregoing instrument, and acknowledged that he/she executed the same, of his/her own free will and for the purposes set forth.

Julie A. Winterbottom  
Notary Public, State of New York  
No. 01W16023921  
Qualified in Clinton County  
Commission Expires 2007

  
Notary Public

  
Adam P. Michaud

11 Nov 2005  
Date

ACKNOWLEDGMENT

State of Vermont }  
County of Chittenden } ss:

On the 11<sup>th</sup> day of November 2005, Adam P. Michaud personally appeared before me, known by me to be the same person described in and who executed the foregoing instrument, and acknowledged that he/she executed the same, of his/her own free will and for the purposes set forth.

Julie A. Winterbottom  
Notary Public, State of New York  
No. 01W16023921  
Qualified in Clinton County  
Commission Expires May 3, 2007

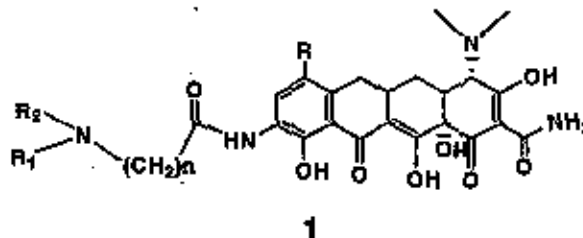
  
Notary Public



# TIGECYCLINE AND METHODS OF PREPARING 9-NITROMINOCYCLINE

This application claims benefit of U.S. Provisional Application No. 60/685,291, filed May 27, 2005, the contents of which are incorporated herein by reference.

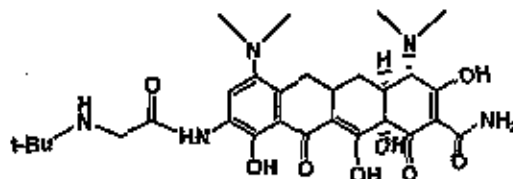
[001] Disclosed herein are methods of preparing at least one compound of formula 1,



or a pharmaceutically acceptable salt thereof,

wherein  $R_1$  and  $R_2$  are each independently chosen from hydrogen, straight and branched chain ( $C_1$ - $C_8$ )alkyl, and cycloalkyl, or  $R_1$  and  $R_2$ , together with N, form a heterocycle;  $R$  is  $-NR_3R_4$ , where  $R_3$  and  $R_4$  are each independently chosen from hydrogen, and straight and branched chain ( $C_1$ - $C_4$ )alkyl; and  $n$  ranges from 1-4.

[002] In one embodiment,  $R_1$  is hydrogen,  $R_2$  is *t*-butyl,  $R$  is  $-NR_3R_4$  where  $R_3$  is methyl and  $R_4$  is methyl, and  $n$  is 1, for example, tigecycline. Tigecycline, (9-(*t*-butylglycylamido)-minocycline, TBA-MINO), (4*S*,4*aS*,5*aR*,12*aS*)-9-[2-(*tert*-butylamino)acetamido]-4,7-bis(dimethylamino)-1,4,4*a*,5,5*a*,6,11,12*a*-octahydro-3,10,12,12*a*-tetrahydroxy-1,11-dioxo-2-naphthacenecarboxamide, where  $R_1$  is hydrogen,  $R_2$  is *t*-butyl,  $R_3$  is methyl,  $R_4$  is methyl, and  $n$  is 1. Tigecycline is a glycidycline antibiotic and an analog of the semisynthetic tetracycline, minocycline. Tigecycline is a 9-*t*-butylglycylamido derivative of minocycline, as shown in the structure below:



**Tigecycline**

[003] Tigecycline was developed in response to the worldwide threat of emerging resistance to antibiotics. Tigecycline has expanded broad-spectrum antibacterial activity both in vitro and in vivo. Glycylcycline antibiotics, like tetracycline antibiotics, act by inhibiting protein translation in bacteria.

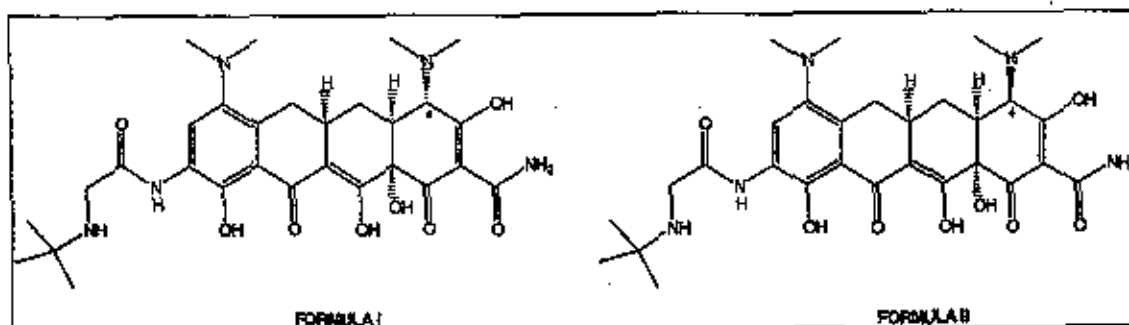
[004] Tigecycline is a known antibiotic in the tetracycline family and a chemical analog of minocycline. It may be used as a treatment against drug-resistant bacteria, and it has been shown to work where other antibiotics have failed. For example, it is active against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae*, vancomycin-resistant enterococci (D.J. Beidenbach et. al., Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 40:173-177 (2001); H.W. Boucher et. al., Antimicrobial Agents & Chemotherapy 44:2225-2229 (2000); P.A. Bradford Clin. Microbiol. Newslett. 26:163-168 (2004); D. Milatovic et. al., Antimicrob. Agents Chemother. 47:400-404 (2003); R. Patel et. al., Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 38:177-179 (2000); P.J. Petersen et. al., Antimicrob. Agents Chemother. 46:2595-2601 (2002); and P.J. Petersen et. al., Antimicrob. Agents Chemother. 43:738-744(1999), and against organisms carrying either of the two major forms of tetracycline resistance: efflux and ribosomal protection (C. Betriu et. al., Antimicrob. Agents Chemother. 48:323-325 (2004); T. Hirata et. al. Antimicrob. Agents Chemother. 48:2179-2184 (2004); and P.J. Petersen et. al., Antimicrob. Agents Chemother. 43:738-744(1999).

[005] Tigecycline may be used in the treatment of many bacterial infections, such as complicated intra-abdominal infections (cIAI), complicated skin and skin structure infections (cSSSI), Community Acquired Pneumonia (CAP), and Hospital Acquired Pneumonia (HAP) Indications, which may be caused by gram-negative and gram-positive pathogens, anaerobes, and both methicillin-susceptible and methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus* (MSSA and MRSA). Additionally, tigecycline may be used to treat or control bacterial infections in warm-blooded animals caused by bacteria having the TetM and TetK resistant determinants. Also, tigecycline may be used to treat bone and joint infections, catheter-related Neutropenia, obstetrics and gynecological infections,

or to treat other resistant pathogens, such as VRE, ESBL, enterics, rapid growing mycobacteria, and the like.

[006] Tigecycline suffers some disadvantages in that it may degrade by epimerization. Epimerization is a known degradation pathway in tetracyclines generally, although the rate of degradation may vary depending upon the tetracycline. Comparatively, the epimerization rate of tigecycline may be fast, even for example, under mildly acidic conditions and/or at mildly elevated temperatures. The tetracycline literature reports several methods scientists have used to try and minimize epimer formation in tetracyclines. In some methods, the formation of calcium, magnesium, zinc or aluminum metal salts with tetracyclines limit epimer formation when done at basic pHs in non-aqueous solutions. (Gordon, P.N, Stephens Jr, C.R., Noseworthy, M. M., Teare, F.W., U.K. Patent No. 901,107). In other methods, (Tobkes, U.S. Patent No. 4,038,315) the formation of a metal complex is performed at acidic pH and a stable solid form of the drug is subsequently prepared.

[007] Tigecycline differs structurally from its epimer in only one respect.



[008] In tigecycline, the N-dimethyl group at the 4 carbon is cis to the adjacent hydrogen as shown above in formula I, whereas in the epimer (i.e., the C<sub>4</sub>-epimer), formula II, they are trans to one another in the manner indicated. Although the tigecycline epimer is believed to be non-toxic, under certain conditions it may lack the anti-bacterial efficacy of tigecycline and may, therefore, be an undesirable degradation product. Moreover, the amount of epimerization can be magnified when synthesizing tigecycline in a large scale.

[009] Other methods for reducing epimer formation include maintaining pHs of greater than about 6.0 during processing; avoiding contact with conjugates

of weak acids such as formates, acetates, phosphates, or boronates; and avoiding contact with moisture including water-based solutions. With regard to moisture protection, Noseworthy and Spiegel (U.S. Patent No. 3,026,248) and Nash and Haeger, (U.S. Patent No. 3,219,529) have proposed formulating tetracycline analogs in non-aqueous vehicles to improve drug stability. However, most of the vehicles included in these disclosures are more appropriate for topical than parenteral use. Tetracycline epimerization is also known to be temperature dependent so production and storage of tetracyclines at low temperatures can also reduce the rate of epimer formation (Yuen, P.H., Sokoloski, T.D., J. Pharm. Sci. 66: 1648-1650, 1977; Pawelczyk, E., Matlak, B, Pol. J. Pharmacol. Pharm. 34: 409-421, 1982). Several of these methods have been attempted with tigecycline but apparently none have succeeded in reducing both epimer formation and oxidative degradation while not introducing additional degradants. Metal complexation, for example, was found to have little affect on either epimer formation or degradation generally at basic pH.

[010] Although the use of phosphate, acetate, and citrate buffers improve solution state stability, they seem to accelerate degradation of tigecycline in the lyophilized state. Even without a buffer, however, epimerization is a more serious problem with tigecycline than with other tetracyclines such as minocycline.

[011] In addition to the C<sub>4</sub>-epimer, other impurities include oxidation by-products. Some of these by-products are obtained by oxidation of the D ring of the molecule, which is an aminophenol. Compounds of formula 3 (see Scheme 1 below) can be readily oxidized at the C-11 and C-12a positions. Isolation of compounds of formula 3 by precipitation with a non-solvent can have the problem that oxidation by-products and metal salts coprecipitate with the product resulting in very low purities. The oxidation and degradation of the nucleus of compounds of formula 3 can be more pronounced under basic reaction conditions and more so on large-scale operations since processing times are typically longer and the compounds are in contact with the base for a longer time.

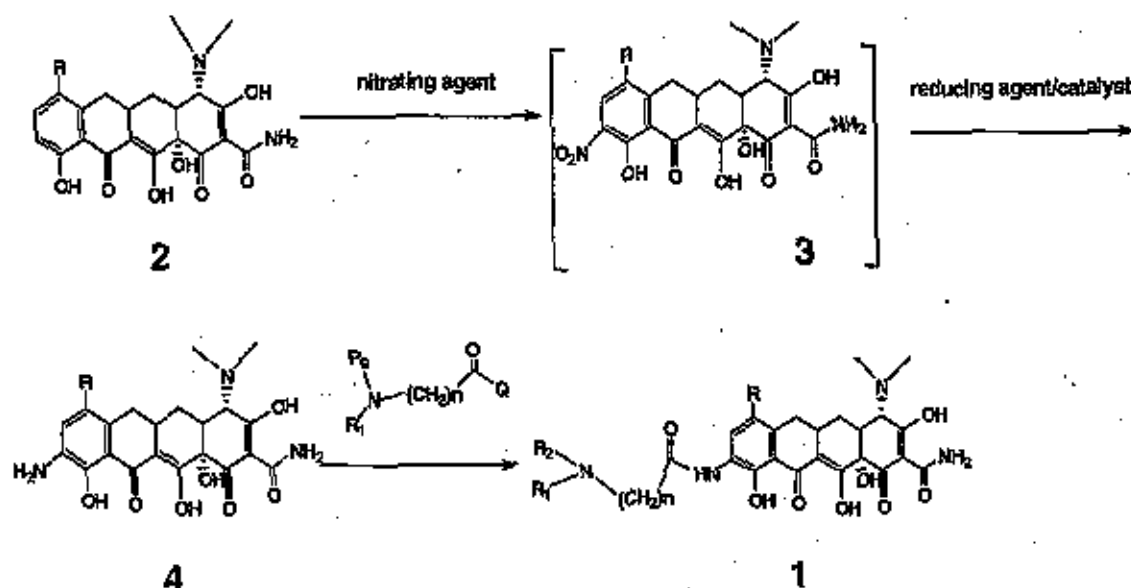
[012] Moreover, degradation products may be obtained during each of the different synthetic steps of a scheme, and separating the required compound from these degradation products can be tedious. For example, conventional

purification techniques, such as chromatography on silica gel or preparative HPLC cannot be used to purify these compounds easily because of their chelating properties. Although some tetracyclines have been purified by partition chromatography using columns made of diatomaceous earth impregnated with buffered stationary phases containing sequestering agents like EDTA, these techniques can suffer from very low resolution, reproducibility and capacity. These disadvantages may hamper a large-scale synthesis. HPLC has also been used for purification, but adequate resolution of the various components on the HPLC columns requires the presence of ion-pairing agents in the mobile phase. Separating the final product from the sequestering and ion-pairing agents in the mobile phase can be difficult.

[013] While on a small-scale the impure compounds obtained by precipitation may be purified by preparative reverse-phase HPLC, purification by reverse phase liquid chromatography can be inefficient and expensive when dealing with kilogram quantities of material.

[014] Accordingly, there remains a need to obtain the at least one compound of formula 1 in a more purified form than previously achieved. There also remains a need for new syntheses to minimize the use of chromatography for purification.

[015] Disclosed herein are methods for producing tetracyclines, such as tigecycline, as generically illustrated in Scheme 1 below:



Scheme 1

[016]  $R_1$  and  $R_2$  are each independently chosen from hydrogen, straight and branched chain ( $C_1$ - $C_6$ )alkyl, and cycloalkyl, or  $R_1$  and  $R_2$ , together with N, form a heterocycle; and R is  $-NR_3R_4$ , where  $R_3$  and  $R_4$  are each independently chosen from hydrogen, and straight and branched chain ( $C_1$ - $C_4$ )alkyl; and n ranges from 1-4.

[017] The compound of formula 2 is also known as a minocycline or minocycline derivative. Reaction of the compound of formula 2 with at least one nitrating agent results in a  $-NO_2$  substituent to form the compound of formula 3. The  $-NO_2$  substituent in formula 3 can be subsequently reduced to an amino, such as by hydrogenation, to form the compound of formula 4. Finally, acylation of the compound of formula 4 generates the compound of formula 1.

[018] Disclosed herein are methods for performing reactions to produce the compound formula 1, e.g., nitration, reduction, and acylation reactions. Also disclosed are methods for purifying the compound formula 1.

[019] The methods disclosed herein can form the desired product while reducing the amount of at least one impurity present in the final product, such as epimer formation, the presence of starting reagents, and oxidation by-products. Such reduction in impurities can be achieved during at least one stage of the synthesis, i.e., during any one of the nitration, reduction, and acylation reactions.

The methods disclosed herein can also facilitate large scale synthesis with suitable purities of the final products.

### **DRAWINGS**

- [020] **FIG. 1** depicts an exemplary scheme for preparing tigecycline.  
[021] **FIG. 2** depicts an exemplary scheme for preparing tigecycline.  
[022] **FIG. 3** depicts an exemplary scheme for preparing tigecycline.

### **DEFINITIONS**

[023] It should be noted that, as used in this specification and the appended claims, the singular forms "a," "an," and "the" include plural referents unless the content clearly dictates otherwise. Thus, for example, reference to a composition containing "a compound" includes a mixture of two or more compounds. It should also be noted that the term "or" is generally employed in its sense including "and/or" unless the content clearly dictates otherwise.

[024] "Tigecycline" as used herein includes tigecycline in free base form and salt forms, such as any pharmaceutically acceptable salt, enantiomers, and epimers. Tigecycline, as used herein, may be formulated according to methods known in the art.

[025] "Compound" as used herein refers to a neutral compound (e.g. a free base), and salt forms thereof (such as pharmaceutically acceptable salts). The compound can exist in anhydrous form, or as a hydrate, or as a solvate. The compound may be present as stereoisomers (e.g., enantiomers and diastereomers), and can be isolated as enantiomers, racemic mixtures, diastereomers, and mixtures thereof. The compound in solid form can exist in various crystalline and amorphous forms.

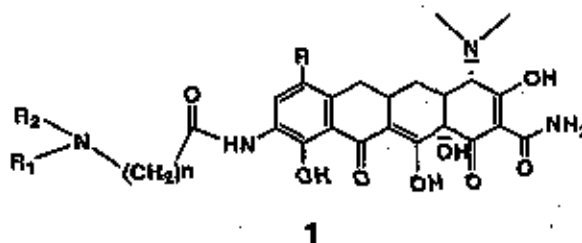
[026] "Pharmaceutically acceptable" as used herein to refer to those compounds, materials, compositions, and/or dosage forms which are, within the scope of sound medical judgment, suitable for use in contact with the tissues of patients without excessive toxicity, irritation, allergic response, or other problem or complication commensurate with a reasonable risk/benefit ratio.

[027] "Cycloalkyl" as used herein refers to a saturated carbocyclic ring system having 3 to 6 ring members.

[028] "Heterocycle" as used herein refers to a monocyclic heterocycle group containing at least one nitrogen ring member and having 3 to 6 ring members in each ring wherein each ring is saturated and not otherwise substituted.

## NITRATION

[029] One embodiment discloses a method of preparing at least one compound of formula 1,

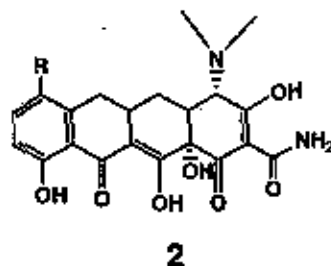


or a pharmaceutically acceptable salt thereof,

wherein  $R_1$  and  $R_2$  are each independently chosen from hydrogen, straight and branched chain ( $C_1$ - $C_6$ )alkyl, and cycloalkyl, or  $R_1$  and  $R_2$ , together with N, form a heterocycle;  $R$  is  $-NR_3R_4$ , where  $R_3$  and  $R_4$  are each independently chosen from hydrogen, and straight and branched chain ( $C_1$ - $C_4$ )alkyl; and  $n$  ranges from 1-4.

[030] One embodiment discloses a nitration reaction where the product of the nitration is not isolated. Accordingly, in one embodiment, the method comprises:

(a) reacting at least one nitrating agent with at least one compound of formula 2,



or a salt thereof, to produce a reaction mixture comprising an intermediate;  
and

(b) further reacting the intermediate to form the at least one compound of formula 1.

[031] In one embodiment, the intermediate is not isolated from the reaction mixture.

[032] The at least one compound of formula 2 can be provided as a free base or as a salt. In one embodiment, the at least one compound of formula 2 is a salt. "Salts" as used herein may be prepared in situ or separately by reacting a free base with a suitable acid. Exemplary salts include, but are not limited to, hydrochloride, hydrobromide, hydroiodide, phosphoric, nitric, sulfuric, acetic, benzoic, citric, cysteine, fumaric, glycolic, maleic, succinic, tartaric, sulfate, and chlorobenzenesulfonate salts. In another embodiment, the salt can be chosen from alkylsulfonic and arylsulfonic salts. In one embodiment, the at least one compound of formula 2 is provided as a hydrochloride salt, or as a sulfate salt.

[033] "Nitrating agent" as used herein refers to a reagent that can add a  $-NO_2$  substituent to a compound, or transform an existing substituent to an  $-NO_2$  substituent. Exemplary nitrating reagents include nitric acid and nitrate salts, such as alkali metal salts, e.g.,  $KNO_3$ . Where the nitrating agent is a nitric acid, the nitric acid can have a concentration of at least 80%, such as a concentration of 85%, 88%, 90%, 95%, 99%, or even 100%.

[034] The nitrating agent can react with the at least one compound of formula 2 in any solvent deemed suitable by one of ordinary skill in the art. In one embodiment, the reaction is performed in the presence of sulfuric acid and/or sulfate salts. In one embodiment, the sulfuric acid used is concentrated sulfuric acid, e.g., a concentration of at least 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, or at least 95%.

[035] In one embodiment, the at least one nitrating agent is provided in a molar excess relative to the at least one compound of formula 2. Suitable molar excesses can be determined by one of ordinary skill in the art and can include, but are not limited to, values such as at least 1.05, e.g., a molar excess ranging from 1.05 to 1.75 equivalents, such as a molar excess ranging from 1.05 to 1.5, or from

a1

000001

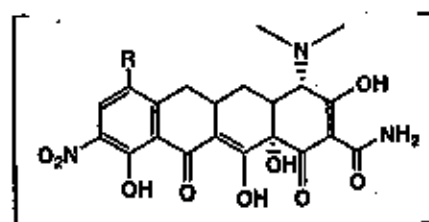
1.05 to 1.25, or from 1.05 to 1.1 equivalents. In another embodiment, the molar excess is 1.05, 1.1, 1.2, 1.3, or 1.4 equivalents.

[036] In one embodiment, the at least one nitrating agent is reacted with the at least one compound of formula 2 by adding the at least one nitrating agent over a period of time. One of ordinary skill in the art can determine a time period over which the total amount of nitrating agent is added to optimize the reaction conditions. For example, the addition of nitration reagent can be monitored by, for example, HPLC, to control the amount of the at least one nitrating agent used. In one embodiment, the total amount of the at least one nitrating agent is added over a period of time of at least 1 h, such as a period of time of at least 2 h, at least 3 h, at least 5 h, at least 10 h, at least 24 h, or a period of time ranging from 1 h to 1 week, ranging from 1 h to 48 h, ranging from 1 h to 24 h, or ranging from 1 h to 12 h.

[037] The at least one nitrating agent can be added continuously.

[038] In one embodiment, the nitrating agent can be reacted with the at least one compound of formula 2 at a temperature ranging from 0 to 25°C, such as a temperature ranging from 5 to 15°C, from 5 to 10°C, or from 10 to 15°C.

[039] An "intermediate" as used herein refers to a compound that is formed as an intermediate product between the starting material and the final product. In one embodiment, the intermediate is a product of the nitration of at least one compound of formula 2. For example, the intermediate can be at least one compound of formula 3 or a salt thereof,



3

[040] The intermediate can exist as a free base or as a salt, such as any of the salts disclosed herein. In one embodiment, the intermediate is a sulfate salt.

[041] In one embodiment, the intermediate is not isolated from the reaction mixture. "Reaction mixture" as used herein refers to a solution or slurry

comprising at least one product of a chemical reaction between reagents, as well as by-products, e.g., impurities (including compounds with undesired stereochemistries), solvents, and any remaining reagents, such as starting materials. In one embodiment, the intermediate is the product of the nitration and is present in the reaction mixture, which can also contain starting reagents (such as the nitrating agent and/or at least one compound of formula 2), by-products (such as the C<sub>4</sub>-epimer of either formula 2 or formula 3). In one embodiment, the reaction mixture is a slurry, where a slurry can be a composition comprising at least one solid and at least one liquid (such as water, acid, or a solvent), e.g., a suspension or a dispersion of solids.

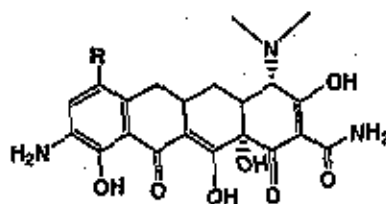
[042] In one embodiment, the nitration reaction produces the intermediate while generating a low amount of the corresponding C<sub>4</sub>-epimer. For example, where the intermediate is the at least one compound of formula 3, the nitration results in the formation of C<sub>4</sub>-epimer of formula 3 in an amount less than 10%, as determined by high performance liquid chromatography (HPLC). In another embodiment, the C<sub>4</sub>-epimer is present in an amount less than 5%, less than 3%, less than 2%, less than 1%, or less than 0.5%.

[043] HPLC parameters for each step, i.e., nitration, reduction, and acylation, are provided in the Examples section.

[044] In one embodiment, the nitration is performed such that the amount of starting material, e.g., the at least one compound of formula 2, is low. In one embodiment, the at least one compound of formula 2 is present in the nitration product in an amount less than 10%, as determined by HPLC, or less than 5%, less than 3%, less than 2%, less than 1%, or less than 0.5%.

[045] In one embodiment, the nitration can be performed in a large scale. In one embodiment, "large scale" refers to the use of at least 1 gram of the compound according to formula 2, such as the use of at least 2 grams, at least 5 grams, at least 10 grams, at least 25 gram, at least 50 grams, at least 100 grams, at least 500 g, at least 1 kg, at least 5 kg, at least 10 kg, at least 25 kg, at least 50 kg, or at least 100 kg.

[046] In one embodiment, the reducing forms at least one compound of formula 4,

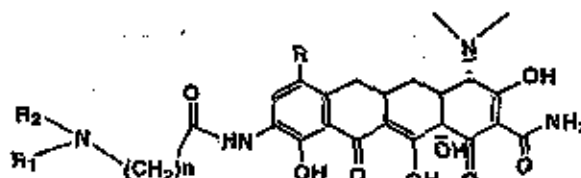


4

or a salt thereof.

[047] In one embodiment, the further reacting in (b) comprises reducing the intermediate. In another embodiment, the method further comprises acylating the reduced intermediate.

[048] Another embodiment disclosed herein is a method of preparing at least one compound of formula 1,



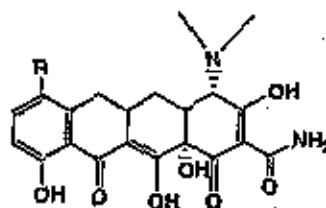
1

or a pharmaceutically acceptable salt thereof,

wherein  $R_1$  is hydrogen,  $R_2$  is *t*-butyl,  $R$  is  $-NH_2R_3$  where  $R_3$  is methyl and  $R_4$  is methyl, and  $n$  is 1,

comprising:

(a) reacting at least one nitrating agent with at least one compound of formula 2,



2

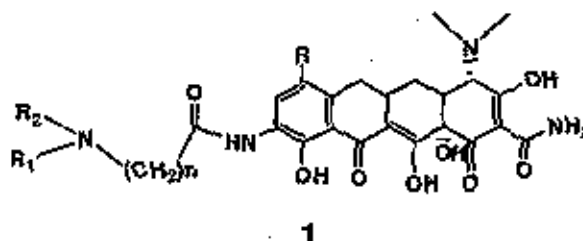
or a salt thereof, to produce a reaction mixture comprising an intermediate;  
and

(b) further reacting the intermediate to form the at least one compound of formula 1,

[048] In one embodiment, the intermediate is not isolated from the reaction mixture.

[050] In one embodiment, the at least one compound of formula 1 is tigecycline.

[051] Another embodiment disclosed herein is a method of preparing at least one compound of formula 1,

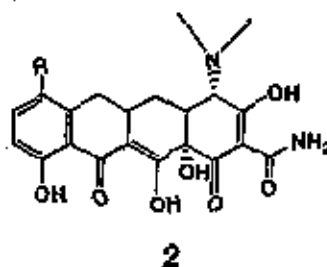


or a pharmaceutically acceptable salt thereof,

wherein  $R_1$  and  $R_2$  are each independently chosen from hydrogen, straight and branched chain ( $C_1$ - $C_6$ )alkyl, and cycloalkyl, or  $R_1$  and  $R_2$ , together with N, form a heterocycle;  $R$  is  $-NR_3R_4$ , where  $R_3$  and  $R_4$  are each independently chosen from hydrogen, and straight and branched chain ( $C_1$ - $C_4$ )alkyl; and  $n$  ranges from 1-4,

comprising:

(a) reacting at least one nitrating agent with at least one compound of formula 2,



or a salt thereof, to produce a slurry; and

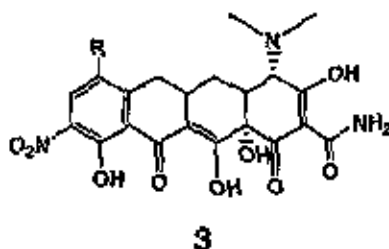
(b) further reacting the slurry to form the at least one compound of formula 1.

[052] In one embodiment,  $R_1$  is hydrogen,  $R_2$  is t-butyl,  $R$  is  $-NR_3R_4$  where  $R_3$  is methyl and  $R_4$  is methyl, and  $n$  is 1. In another embodiment, the at least one compound of formula 1 is tigecycline.

45

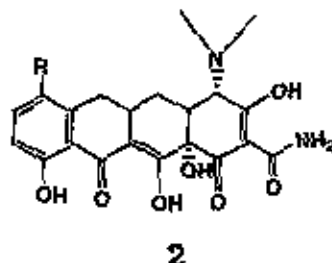
Pub 45

[053] Another embodiment disclosed herein is a method of preparing at least one compound of formula 3 or a salt thereof,



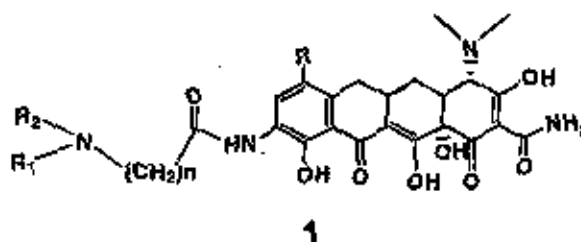
wherein R is  $-NR_3R_4$ , where  $R_3$  and  $R_4$  are each independently chosen from hydrogen, and straight and branched chain ( $C_1$ - $C_4$ )alkyl, comprising:

reacting at least one nitrating agent with at least one compound of formula 2 or a salt thereof,



wherein the reacting is performed at a temperature ranging from 5 to 15°C.

[054] Another embodiment disclosed herein is a method of preparing least one compound of formula 1,



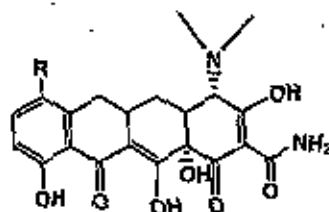
or a pharmaceutically acceptable salt thereof,

wherein  $R_1$  and  $R_2$  are each independently chosen from hydrogen, straight and branched chain ( $C_1$ - $C_6$ )alkyl, and cycloalkyl, or  $R_1$  and  $R_2$ , together with N, form a heterocycle; R is  $-NR_3R_4$ , where  $R_3$  and  $R_4$  are each independently chosen from hydrogen, and straight and branched chain ( $C_1$ - $C_4$ )alkyl; and n ranges from 1-4,

comprising:

2/6  
2006/020540

(a) reacting at least one nitrating agent with at least one compound of formula 2 or a salt thereof to produce a reaction mixture comprising an intermediate; and



2

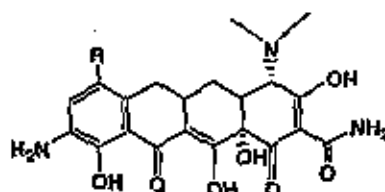
(b) further reacting the intermediate to form the at least one compound of formula 1

wherein the reacting in (a) is performed at a temperature ranging from 5 to 15°C.

[055] In one embodiment,  $R_1$  is hydrogen,  $R_2$  is t-butyl,  $R_3$  is methyl,  $R_4$  is methyl, and  $n$  is 1.

### REDUCTION

[056] One embodiment discloses a method of preparing at least one compound of formula 4,

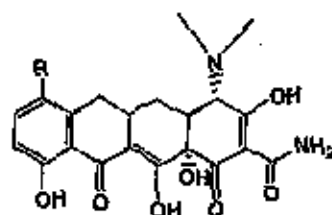


4

or a salt thereof,

wherein  $R = -NR_3R_4$ , where  $R_3$  and  $R_4$  are each independently chosen from hydrogen, and straight and branched chain ( $C_1$ - $C_4$ ) alkyl, comprising:

combining at least one reducing agent with a reaction mixture, such as a reaction mixture slurry, comprising an intermediate prepared from a reaction between at least one nitrating agent and at least one compound of formula 2,



2

or a salt thereof.

[057] In one embodiment, the method describes a "one-pot" process, where the nitration and reduction steps are performed without isolating the products of the nitration from the nitration reaction mixture.

[058] In one embodiment,  $R_1$  is hydrogen,  $R_2$  is t-butyl,  $R_3$  is methyl,  $R_4$  is methyl, and  $n$  is 1.

[059] "Reducing agent" as used herein refers to a chemical agent that adds hydrogen to a compound. In one embodiment, a reducing agent is hydrogen. The reduction can be performed under a hydrogen atmosphere at a suitable pressure as determined by one of ordinary skill in the art. In one embodiment, the hydrogen is provided at a pressure ranging from 1 to 75 psi, such as a pressure ranging from 1 to 50 psi, or a pressure ranging from 1 to 40 psi.

[060] In another embodiment, the reducing agent is provided in the presence of at least one catalyst. Exemplary catalysts include, but are not limited to, rare earth metal oxides, Group VIII metal-containing catalysts, and salts of Group VIII metal-containing catalyst. An example of a Group VIII metal-containing catalyst is palladium, such as palladium on carbon.

[061] Where the catalyst is palladium on carbon, in one embodiment, the catalyst is present in an amount ranging from 0.1 parts to 1 part, relative to the amount of the at least one compound of formula 2 present prior to the reaction with the at least one nitrating agent.

[062] In one embodiment, the intermediate is at least one compound of formula 3. In one embodiment, in the compound of formula 3,  $R_1$  is hydrogen,  $R_2$  is t-butyl,  $R_3$  is methyl,  $R_4$  is methyl, and  $n$  is 1.

[063] One of ordinary skill in the art can determine a suitable solvent for the reduction reaction. In one embodiment, prior to the combining, e.g., prior to

u8 48

the reduction, the reaction mixture is combined with a solvent comprising at least one (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>) alcohol. The at least one (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>) alcohol can be chosen, for example, from methanol and ethanol.

[064] One of ordinary skill in the art can determine a suitable temperature for the reduction reaction. In one embodiment, the combining, e.g., the reduction, is performed at a temperature ranging from 0°C to 50°C, such as a temperature ranging from 20°C to 40°C, or a temperature ranging from 26°C to 28°C.

[065] In one embodiment, after the combining, e.g., after the reduction, the resulting reaction mixture is added to or combined with a solvent system comprising a (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>) branched chain alcohol and a (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>) hydrocarbon. In one embodiment, the (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>) branched chain alcohol is isopropanol. In one embodiment, the (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>) hydrocarbon is chosen from hexane, heptane, and octane.

[066] In one embodiment, after the combining, e.g., after the reduction, the resulting reaction mixture is added to the solvent system at a temperature ranging from 0°C to 50°C, such as a temperature ranging from 0°C to 10°C.

[067] In one embodiment, the method further comprises isolating the at least one compound of formula 4 as a solid, or as a solid composition. In one embodiment, the at least one compound of formula 4 is precipitated or isolated as a salt, such as any of the salts described herein.

[068] In one embodiment, the solid composition comprises a C<sub>4</sub>-epimer of formula 4 in an amount less than 10% as determined by high performance liquid chromatography. In another embodiment, the C<sub>4</sub>-epimer is present in an amount less than 5%, less than 3%, less than 2%, less than 1%, or less than 0.5%.

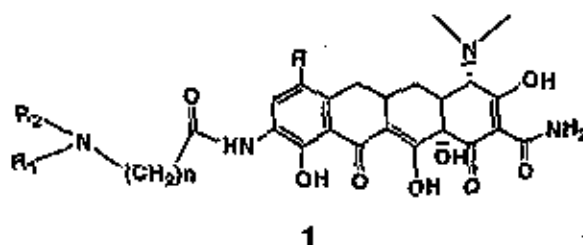
[069] In one embodiment, the solid composition comprises the at least one compound of formula 2 in an amount less than 2%, such as an amount less than 1%, or less than 0.5%, as determined by high performance liquid chromatography.

[070] In one embodiment, the reduction can be performed in a large scale. In one embodiment, "large scale" refers to the use of at least 1 gram of the compound according to formula 2, such as the use of at least 2 grams, at least 5 grams, at least 10 grams, at least 25 gram, at least 50 grams, at least 100 grams,

u9 00039

at least 500 g, at least 1 kg, at least 5 kg, at least 10 kg, at least 25 kg, at least 50 kg, or at least 100 kg.

[071] Another embodiment disclosed herein is a method of preparing at least one compound of formula 1,

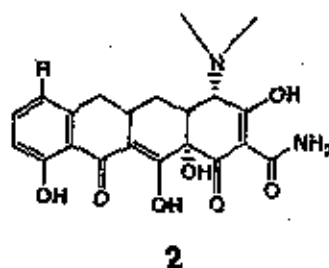


or a pharmaceutically acceptable salt thereof,

wherein  $R_1$  and  $R_2$  are each independently chosen from hydrogen, straight and branched chain ( $C_1$ - $C_6$ )alkyl, and cycloalkyl, or  $R_1$  and  $R_2$ , together with N, form a heterocycle; R is  $-NR_3R_4$ , where  $R_3$  and  $R_4$  are each independently chosen from hydrogen, and straight and branched chain ( $C_1$ - $C_4$ )alkyl; and n ranges from 1-4,

comprising:

(a) combining at least one reducing agent with a reaction mixture, such as a reaction mixture slurry, comprising an intermediate prepared from a reaction between at least one nitrating agent and at least one compound of formula 2,

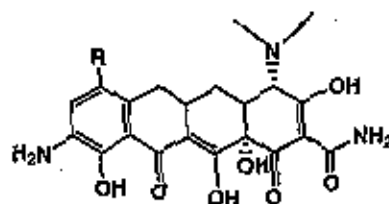


or a salt thereof, to form a second intermediate; and

(b) further reacting the second intermediate in the reaction mixture to prepare the at least one compound of formula 1.

[072] In one embodiment,  $R_1$  is hydrogen,  $R_2$  is t-butyl,  $R_3$  is methyl,  $R_4$  is methyl, and n is 1.

[073] In one embodiment, the intermediate is at least one compound of formula 3 or salt thereof, and the second intermediate is at least one compound of formula 4,

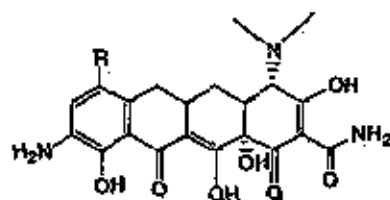


4

or a salt thereof.

[074] In one embodiment, the further reacting in (b) comprises acylating the second intermediate. In one embodiment, prior to the acylating, the second intermediate can be precipitated or isolated as a salt.

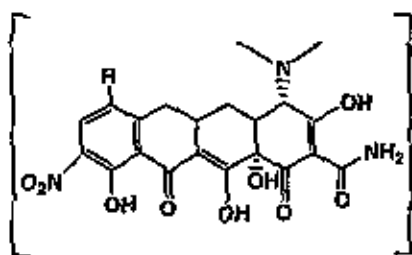
[075] Another embodiment disclosed herein is a method of preparing at least one compound of formula 4 or a salt thereof,



4

wherein R = -NR<sub>3</sub>R<sub>4</sub>, where R<sub>3</sub> and R<sub>4</sub> are each independently chosen from hydrogen, and straight and branched chain (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)alkyl, comprising:

reducing an intermediate of formula 3 or a salt thereof,

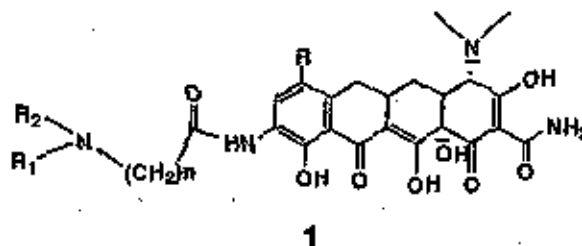


3

[076] In one embodiment, the intermediate of formula 3 may be present in a reaction mixture slurry.

[077] In one embodiment, the reducing comprises combining at least one reducing agent with the reaction mixture.

[078] Another embodiment disclosed herein is a method of preparing at least one compound of formula 1,

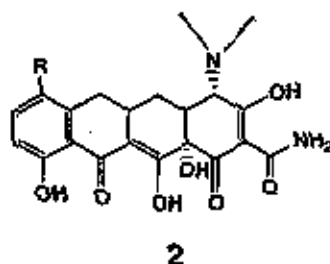
51  
3000-1

or a pharmaceutically acceptable salt thereof,

wherein  $R_1$  and  $R_2$  are each independently chosen from hydrogen, straight and branched chain ( $C_1$ - $C_6$ )alkyl, and cycloalkyl, or  $R_1$  and  $R_2$ , together with N, form a heterocycle;  $R$  is  $-NR_3R_4$ , where  $R_3$  and  $R_4$  are each independently chosen from hydrogen, and straight and branched chain ( $C_1$ - $C_4$ )alkyl; and  $n$  ranges from 1-4,

comprising:

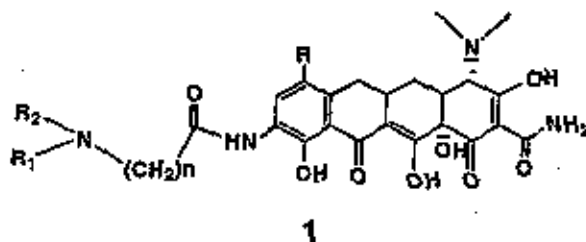
(a) reacting at least one nitrating agent with at least one compound of formula 2 or a salt thereof to prepare a reaction mixture,



(b) without isolating or precipitating any solids from the reaction mixture, combining at least one reducing agent with the reaction mixture to prepare an intermediate; and

(c) preparing the at least one compound of formula 1 from the intermediate.

[079] Another embodiment disclosed herein is method of preparing at least one compound of formula 1,

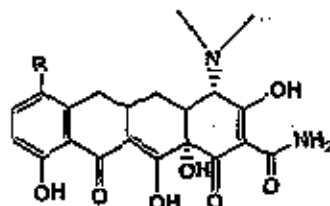


or a pharmaceutically acceptable salt thereof,

wherein  $R_1$  and  $R_2$  are each independently chosen from hydrogen, straight and branched chain ( $C_1$ - $C_6$ )alkyl, and cycloalkyl, or  $R_1$  and  $R_2$ , together with N, form a heterocycle; R is  $-NR_3R_4$ , where  $R_3$  and  $R_4$  are each independently chosen from hydrogen, and straight and branched chain ( $C_1$ - $C_4$ )alkyl; and n ranges from 1-4,

comprising:

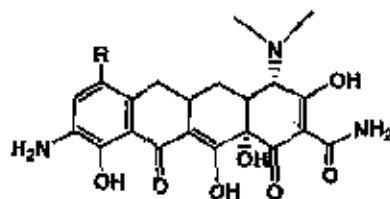
(a) combining at least one Group VIII metal-containing catalyst in the presence of hydrogen with a reaction mixture, such as a reaction mixture slurry, prepared from a reaction between at least one nitrating agent and at least one compound of formula 2 or a salt thereof,



2

[080] In one embodiment, the at least one Group VIII metal-containing catalyst is present in an amount ranging from 0.1 parts to 1 part relative to the amount of the at least one compound of formula 2 present prior to the reaction with the at least one nitrating agent.

[081] Another embodiment disclosed herein is a composition comprising: at least one compound of formula 4,



4

or a salt thereof,

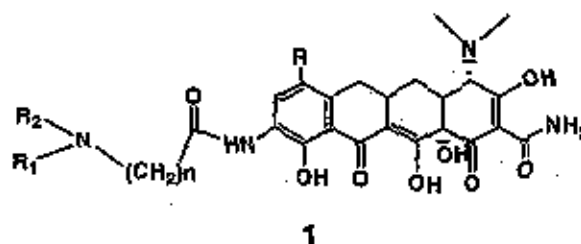
wherein R is  $-NR_3R_4$ , where  $R_3$  and  $R_4$  are each independently chosen from hydrogen, and straight and branched chain ( $C_1$ - $C_4$ )alkyl,

wherein a  $C_4$ -epimer of formula 4 is present in an amount less than 10%, as determined by high performance liquid chromatography.

[082] In one embodiment,  $R_1$  is hydrogen,  $R_2$  is t-butyl,  $R_3$  is methyl,  $R_4$  is methyl, and  $n$  is 1.

### ACYLATION

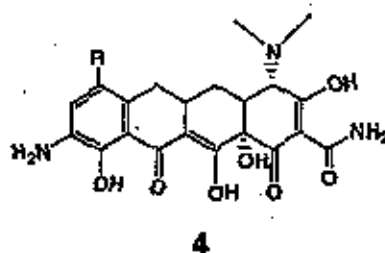
[083] One embodiment of the present disclosure provides a method for preparing at least one compound of Formula 1:



or a pharmaceutically acceptable salt thereof,

wherein  $R_1$  and  $R_2$  are each independently chosen from hydrogen, straight and branched chain ( $C_1$ - $C_6$ )alkyl, and cycloalkyl, such as ( $C_3$ - $C_6$ )cycloalkyl, or  $R_1$  and  $R_2$ , together with N, form a heterocycle, such as a 5-membered ring;  $R$  is  $-NR_3R_4$ , where  $R_3$  and  $R_4$  are each independently chosen from hydrogen, and straight and branched ( $C_1$ - $C_4$ )alkyl; and  $n$  ranges from 1-4,

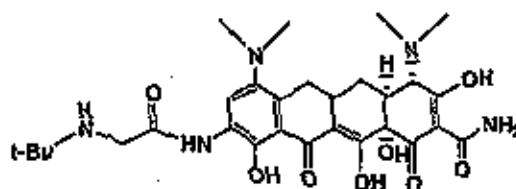
comprising reacting at least one compound of Formula 4:



or a salt thereof,

with at least one aminoacyl compound in a reaction medium. In one embodiment, the reaction medium may be chosen from an aqueous medium, and at least one basic solvent in the absence of a reagent base.

[084] In one embodiment, the method for preparing a compound of formula 1 is a method for preparing tigecycline:



Tigecycline

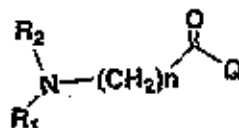
or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

[085] In one embodiment, variable  $n$  is 1,  $R_1$  is hydrogen,  $R_2$  is *t*-butyl, and  $R_3$  and  $R_4$  are each methyl. In another embodiment, variable  $n$  is 1,  $R_1$  and  $R_2$ , together with N, forms a pyrrolidiny group, and  $R_3$  and  $R_4$  are each methyl. The salt of the at least one compound of Formula 4 may be a halogenated salt, such as a hydrochloride salt.

[086] The reaction medium may be a solvent chosen from a polar aprotic solvent or mixture of solvents thereof. In one embodiment, the polar aprotic solvent is chosen from acetonitrile, 1,2-dimethoxyethane, dimethylacetamide, dimethylformamide, hexamethylphosphoramide,  $N,N'$ -dimethylethylenurea,  $N,N'$ -dimethylpropyleneurea, methylene chloride,  $N$ -methylpyrrolidinone, tetrahydrofuran, and mixtures thereof. In another embodiment, the polar aprotic solvent is chosen from acetonitrile, dimethylformamide,  $N,N'$ -dimethylpropyleneurea,  $N$ -methylpyrrolidinone, tetrahydrofuran, and mixtures thereof. The at least one basic solvent may be a mixture of acetonitrile and  $N,N'$ -dimethylpropyleneurea. In another embodiment, the at least one basic solvent may be a mixture of water and  $N,N'$ -dimethylpropyleneurea. In a further embodiment, the at least one basic solvent is  $N,N'$ -dimethylpropyleneurea.

[087] The reaction medium may be an aqueous medium. In a further embodiment, the at least one basic solvent in the absence of a base is water in the absence of a base. In another embodiment, the reaction medium may be at least one basic solvent in the absence of a reagent base. A basic solvent is a solvent capable of accepting, either partially or fully, a proton. A reagent base refers to a base that is added at the start of the reaction, either concurrently or sequentially with the at least one compound of Formula 4 and the at least one aminoacyl compound and is capable of accepting, either partially or fully, a proton. A reagent base also refers to a base that is added during the reaction.

[088] The at least one aminoacyl compound may be chosen from aminoacyl halides, aminoacyl anhydrides, and mixed aminoacyl anhydrides. In one embodiment, the aminoacyl compound is at least one aminoacyl halide of Formula 6:



6

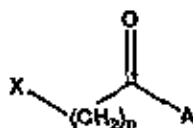
or a salt thereof,

wherein  $R_1$  and  $R_2$  are each independently chosen from hydrogen, straight and branched chain ( $C_1$ - $C_8$ )alkyl, and cycloalkyl, or  $R_1$  and  $R_2$ , together with N, form a heterocycle;  $n$  ranges from 1-4; and wherein Q is a halogen chosen from fluoride, bromide, chloride, and iodide.

[089] In a further embodiment, Q is chloride. The salt of the compound of Formula 6 may be chosen from a halogenated salt. Halogenated salt refers to any salt formed from interaction with a halogen anion, such as a hydrochloride salt, a hydrobromide salt, and a hydroiodic salt. In one embodiment, the halogenated salt is a hydrochloride salt.

[090] The at least one aminoacyl halide of Formula 6 may be obtained by a method comprising:

A) reacting at least one ester of Formula 7:



7

or a salt thereof,

with at least one amine,  $R_1R_2NH$ , to prepare at least one carboxylic acid,

wherein  $R_1$  and  $R_2$  are each independently chosen from hydrogen, straight and branched chain ( $C_1$ - $C_8$ )alkyl, and cycloalkyl, or  $R_1$  and  $R_2$ , together with N, form a heterocycle; X is a halogen chosen from bromide, chloride, fluoride and iodide; A is  $-OR_6$ , where  $R_6$  is chosen from straight or branched ( $C_1$ - $C_8$ )alkyl and

arylalkyl, such as aryl(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)alkyl, e.g., where aryl is phenyl; n ranges from 1-4; and

B) reacting the at least one carboxylic acid with at least one chlorinating agent to give at least one aminoacyl compound of Formula 6 or a salt thereof.

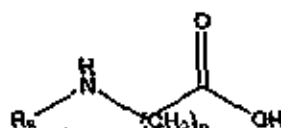
[091] In one embodiment, R<sub>1</sub> and R<sub>6</sub> may each be t-butyl. In another embodiment, R<sub>1</sub> and R<sub>2</sub>, together with N, may form a heterocycle, such as pyrrolidine, and R<sub>6</sub> may be arylalkyl, such as benzyl. In another embodiment, n is one. In a further embodiment, X is bromide.

[092] In another embodiment, the at least one ester of Formula 7 is a hydrochloride salt. An excess of amine R<sub>1</sub>R<sub>2</sub>NH compared to the ester of Formula 7 may be present in the reaction to prepare at least one carboxylic acid. In one embodiment, the at least one chlorinating agent may be thionyl chloride. In another embodiment, the reaction of the at least one carboxylic acid with at least one chlorinating agent includes addition of a catalytic amount of dimethylformamide. An excess of chlorinating agent relative to the at least one carboxylic acid may be present in the reaction to give at least one aminoacyl compound of Formula 6. When R<sub>6</sub> is arylalkyl, the arylalkyl of the at least one compound of Formula 7 may be cleaved by hydrogenation after reaction with the at least one amine to give the at least one carboxylic acid.

[093] The reaction of the at least one carboxylic acid with a chlorinating agent may be performed at a temperature ranging from 55 °C to 85 °C, such as from 80 °C to 85 °C, and further such as 55 °C. In one embodiment, an additional amount of chlorinating agent may be added to the reaction to effect completion, such as attaining a level of less than 4% carboxylic acid. Following reacting the at least one carboxylic acid with at least one chlorinating agent, the resulting suspension may be filtered to remove salts, such as t-butylamine hydrochloride salts. The aminoacyl halide of Formula 6 may be isolated as HCl salt or treated with an inorganic acid, such as hydrochloric acid, to prepare an aminoacyl halide salt.

[094] In another embodiment, the at least one aminoacyl halide of Formula 6 is obtained by a method comprising:

reacting at least one carboxylic acid of Formula 8:

57  
3111-57

8

or a salt thereof,

wherein  $\text{R}_5$  is chosen from straight or branched  $(\text{C}_1\text{--C}_6)$ alkyl, and  $n$  ranges from 1 to 4, and

with at least one chlorinating agent to give at least one aminoacyl halide of Formula 6 or a salt thereof.

[095] In another embodiment, the at least one carboxylic acid of Formula 8 is a halogenated salt, such as a hydrochloride salt. The time period for reacting at least one compound of Formula 8 with at least one chlorinating agent may range from 1 to 50 hours, such as from 2 to 45 hours, and further such as 1 to 3 hours. The at least one carboxylic acid of Formula 8 may have a particle size of less than 150 microns, such as less than 110 microns, and further such as ranging from 50 to 100 microns. A compound of Formula 8 having a given particle size may be attained by milling the compound.

[096] Reacting at least one compound of Formula 4 with the at least one aminoacyl compound may be conducted at a temperature ranging from 0 °C to 30 °C, such as from 20 °C to 25 °C, such as from 10 °C to 17 °C, such as from 0 °C to 5 °C, and further such as from 2 °C to 8 °C. The time period for reaction may range from 1 hour to 24 hours, such as from 0.5 hours to 4 hours, and further such as from 2 hours to 8 hours. An excess of aminoacyl compound relative to the amount of a compound of Formula 4 may be used in the reaction. In one embodiment, the excess may be 3 equivalents of aminoacyl compound to 1 equivalent of the at least one compound of Formula 4. In another embodiment, the ratio of aqueous medium to the at least one compound of Formula 4 may be 6:1 w/w or 5:1 volumes. In one embodiment, the aminoacyl compound is added to or combined with a solution of the at least one compound of Formula 4 in an aqueous medium.

[097] In one embodiment, where the reaction medium is an aqueous medium, the pH of the aqueous medium may be adjusted to a pH ranging from 4

to 9, such as from 5 to 7.5, such as from 6.3 to 6.7, such as from 7.0 to 7.5, further such as 6.5, and still further such as 7.2. Water may be added prior to adjusting the pH. Adjusting the pH may involve addition of a base, including but not limited to ammonium hydroxide. The concentration of ammonium hydroxide may range from 25% to 30%. In another embodiment, an acid, such as hydrochloric acid, may be used to adjust the pH. The reaction medium during pH adjustment may be at a temperature ranging from -5 °C to 25 °C, such as from 5°C to 8 °C, and further such as from 0 °C to 5 °C.

[0098] Following adjustment of the pH, at least one organic solvent or mixture of solvents may be added to the aqueous medium. In one embodiment, the at least one organic mixture of solvents may comprise methanol and methylene chloride. The concentration of methanol may range from 5% to 30%, including but not limited to 20% and 30%. In another embodiment, the at least one organic solvent or mixture of solvents comprises tetrahydrofuran. The temperature of the mixture may range from 15 °C to 25 °C.

[0099] In one embodiment, the aqueous medium may be extracted with a mixture of at least one polar protic solvent and at least one polar aprotic solvent. In one embodiment, the at least one polar aprotic solvent comprises methylene chloride and the at least one polar protic solvent comprises methanol. In another embodiment, the aqueous medium is extracted with at least one polar aprotic solvent, such as methylene chloride. The extraction may be conducted at a temperature ranging from -5 °C to 25 °C, further such as from 0 °C to 5 °C. In a further embodiment, the pH of the aqueous medium is adjusted to a range from 7.0 to 7.5, such as 7.2, after each extraction. The extraction process may be repeated, for example, up to 10 times.

[0100] In one embodiment, the combined organic extracts may be treated with a drying agent, such as sodium sulfate. The organic extracts may also be treated with charcoal, such as Norit CA-1. The solids are removed by filtration to give a solution. In one embodiment, the solution may be concentrated to afford the compound of Formula 1.

[0101] The compound of Formula 1 obtained from the reaction may be crystallized in at least one organic solvent or mixture of solvents. In one

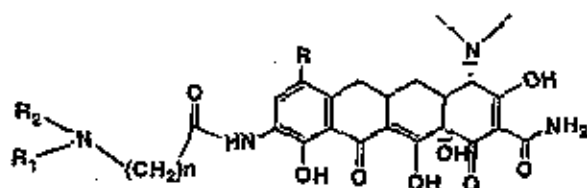
embodiment, the organic mixture of solvents comprises methanol and methylene chloride. Crystallization may, for example, occur at a temperature ranging from -15 °C to 155 °C, such as from 0 °C to 15 °C, and further such as from 2 °C to 5 °C.

[0102] In another embodiment, following extraction, the resulting organic mixture of at least one polar protic solvent and at least one polar aprotic solvent may be concentrated to give a slurry and filtered to give the at least one compound of Formula 1. Concentration and filtration may, for example, occur at 0 °C to 5 °C.

[0103] A method for preparing a compound of Formula 1 may be performed using greater than 5 grams of the amine of Formula 4, such as greater than 10 grams, such as greater than 50 grams, such as greater than 100 grams, such as greater than 500 grams, such as greater than 1 kilograms, and further such as greater than 10 kilograms.

[0104] One embodiment discloses a compound prepared by any of the methods described herein, including but not limited to a compound of Formula 1, a compound of Formula 4, a compound of Formula 6, a compound of Formula 7, a compound of Formula 8, and salts thereof. Another embodiment includes a composition comprising a compound prepared by any of the methods described herein. The composition may further comprise a pharmaceutically acceptable carrier.

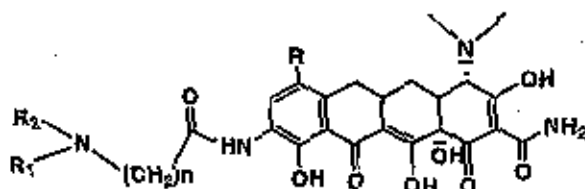
[0105] In one embodiment, the composition may comprise at least one compound of Formula 1:



**Formula 1**

or a pharmaceutically acceptable salt thereof,

wherein  $n$  is 1,  $R_1$  and  $R_2$ , together with  $N$ , forms a *t*-butyl group, and  $R_3$  and  $R_4$  are each methyl. In another embodiment, the composition may comprise at least one compound of formula 1:



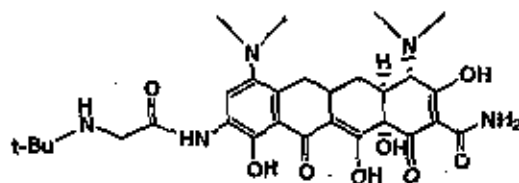
**Formula 1**

or a pharmaceutically acceptable salt thereof,

wherein  $R_1$  and  $R_2$  are each independently chosen from hydrogen, straight and branched chain ( $C_1$ - $C_6$ )alkyl, and cycloalkyl, or  $R_1$  and  $R_2$ , together with N, form a heterocycle; R is  $-NR_3R_4$ , where  $R_3$  and  $R_4$  are each independently chosen from hydrogen, and straight and branched ( $C_1$ - $C_4$ )alkyl; and n ranges from 1-4, and

less than 0.5% of the C-4 epimer of the at least one compound of formula 1 or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

[0106] In a further embodiment, the composition may comprise Tigecycline:



**Tigecycline**

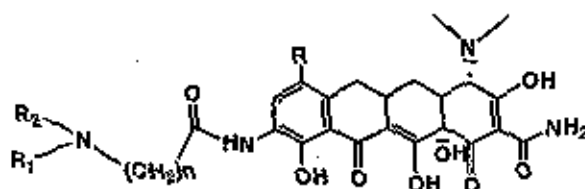
or a pharmaceutically acceptable salt thereof, and

less than 0.5% of the C-4 epimer of Tigecycline or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

[0107] In one embodiment, the compound of Formula 1 prepared by any of the methods described herein contains less than 10.0% impurities as determined by high performance liquid chromatography, such as less than 5% impurities, such as less than 2% impurities, and further such as 1-1.4% impurities. In a further embodiment, the compound of Formula 1 contains a C<sub>4</sub>-epimer in an amount less than 1.0% as determined by high performance liquid chromatography, such as less than 0.5% C<sub>4</sub>-epimer, and further such as less than 0.2% C<sub>4</sub>-epimer. In one embodiment, the compound of formula 1 contains less than 1% minocycline as determined by high performance liquid chromatography, such as less than 0.6% minocycline. In another embodiment, the compound of

formula 1 contains less than 5% dichloromethane, such as less than 2-3% dichloromethane.

[0108] One embodiment of the disclosure includes a method for preparing at least one compound of Formula 1:

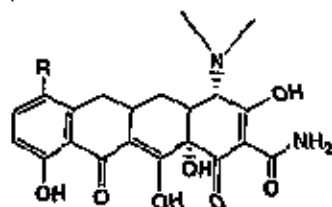


**Formula 1**

or a pharmaceutically acceptable salt thereof,

wherein  $R_1$  and  $R_2$  are each independently chosen from hydrogen, straight and branched chain ( $C_1$ - $C_6$ ) alkyl, and cycloalkyl, or  $R_1$  and  $R_2$ , together with N, form a heterocycle;  $R$  is  $-NR_3R_4$ , where  $R_3$  and  $R_4$  are each independently chosen from hydrogen, and straight and branched ( $C_1$ - $C_4$ ) alkyl; and  $n$  ranges from 1-4, comprising:

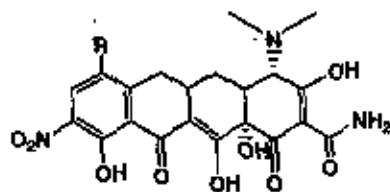
A) reacting at least one nitrating agent with at least one compound of Formula 2:



**Formula 2**

or a salt thereof,

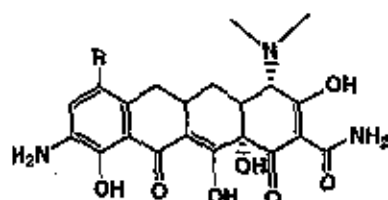
to prepare a reaction mixture slurry comprising at least one compound of Formula 3:



**Formula 3**

or a salt thereof,

B) combining at least one reducing agent with the reaction mixture slurry to prepare at least one compound of Formula 4,

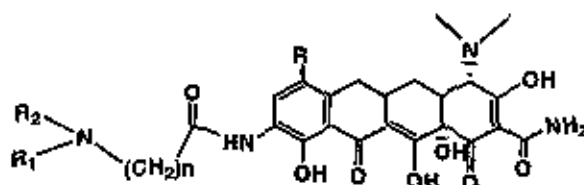
**Formula 4**

or a salt thereof, and

C) reacting the at least one compound of Formula 4 with at least one aminoacyl compound in a reaction medium chosen from an aqueous medium, and at least one basic solvent in the absence of a reagent base.

[0109] The compound of formula 1 prepared by this method may be tigecycline.

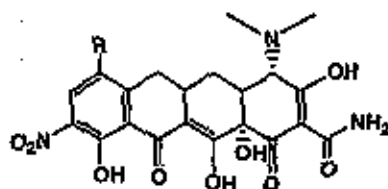
[0110] Another embodiment of the present disclosure includes a method for preparing at least one compound of Formula 1:

**Formula 1**

or a pharmaceutically acceptable salt thereof,

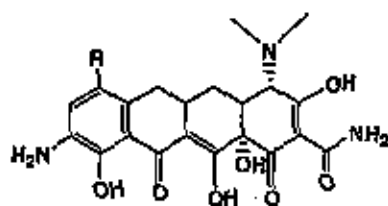
wherein  $R_1$  and  $R_2$  are each independently chosen from hydrogen, straight and branched chain ( $C_1$ - $C_6$ )alkyl, and cycloalkyl, or  $R_1$  and  $R_2$ , together with N, form a heterocycle;  $R$  is  $-NR_3R_4$ , where  $R_3$  and  $R_4$  are each independently chosen from hydrogen, and straight and branched ( $C_1$ - $C_4$ )alkyl; and  $n$  ranges from 1-4, comprising:

A) combining at least one reducing agent with a reaction mixture slurry comprising at least one compound of Formula 3:

**Formula 3**

or a salt thereof,

to prepare at least one compound of Formula 4:

**Formula 4**

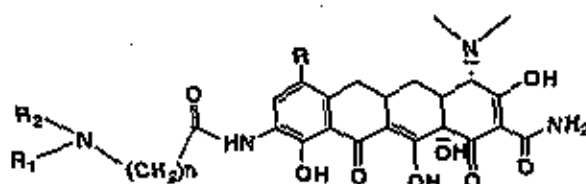
or a salt thereof, and

B) reacting the at least one compound of Formula 4 with at least one aminoacyl compound in a reaction medium chosen from an aqueous medium, and at least one basic solvent in the absence of a reagent base.

[0111] In another embodiment, the compound of formula 1 prepared by the above method may be tigecycline.

### PURIFICATION

[0112] One embodiment of the present disclosure provides a method for purifying at least one compound of Formula 1:

**Formula 1**

or a pharmaceutically acceptable salt thereof,

wherein  $R_1$  and  $R_2$  are each independently chosen from hydrogen, straight and branched chain ( $C_1$ - $C_6$ )alkyl, and cycloalkyl, or  $R_1$  and  $R_2$ , together with N, form a heterocycle; R is  $-NR_3R_4$ , where  $R_3$  and  $R_4$  are each independently chosen from hydrogen, and straight and branched ( $C_1$ - $C_4$ )alkyl; and n ranges from 1-4, comprising:

A) combining the at least one compound of Formula 1 with at least one polar aprotic solvent and at least one polar protic solvent to give a first mixture,

B) mixing the first mixture for at least one period of time such as from 15 minutes to 2 hours at a temperature ranging from 0 °C to 40 °C, and

C) obtaining the at least one compound of Formula 1.

[0113] As used herein, the term "obtaining" refers to isolating a compound at a useful level of purity, including but not limited to levels of purity greater than

90%, 95%, 96%, 97%, 98%, and 99%. The level of purity may be determined by high pressure liquid chromatography.

[0114] In one embodiment, the method for purifying at least one compound of Formula 1 involves the steps of:

- A) combining the at least one compound of Formula 1 with at least one polar aprotic solvent and at least one polar protic solvent to give a first mixture,
- B) mixing the first mixture for a period of time at a temperature ranging from 30 °C to 40 °C,
- C) cooling the first mixture to a temperature ranging from 15 °C to 25 °C and allowing the mixture to stand without mixing for a second period of time,
- D) cooling the first mixture to a temperature ranging from 0 °C to 6 °C and allowing the mixture to stand without mixing for a third period of time, and
- E) obtaining the at least one compound of Formula 1.

[0115] In one embodiment, the method may include at least one compound of Formula 1 where  $n$  is 1,  $R_1$  is hydrogen,  $R_2$  is *t*-butyl, and  $R_3$  and  $R_4$  are each methyl. Another embodiment includes at least one compound of Formula 1, where  $n$  is 1,  $R_1$  and  $R_2$ , together with N, forms a pyrrolidinyl group, and  $R_3$  and  $R_4$  are each methyl. The at least one compound of Formula 1 that is combined with the at least one polar aprotic solvent and the at least one polar protic solvent may be provided in a form chosen from a solid, a slurry, a suspension, and a solution.

[0116] In one embodiment, the at least one polar aprotic solvent may be chosen from acetone, 1,2-dichloroethane, methyl acetate, methyl ethyl ketone, methyl isobutyl ketone, methylene chloride, and ethyl acetate. In a further embodiment, the at least one polar aprotic solvent may be chosen from acetone and methylene chloride. In another embodiment, the at least one polar protic solvent may be chosen from methanol, ethanol, isopropanol, and *t*-butanol. In a further embodiment, the at least one polar protic solvent may be methanol.

[0117] The combination of the at least one polar aprotic solvent and at least one polar protic solvent may include acetone and methanol. Another embodiment provides a combination of the at least one polar aprotic solvent, methylene chloride, and the at least one polar protic solvent, methanol. In a further embodiment, the combination of the at least one polar aprotic solvent and at least

one polar protic solvent may include methyl acetate and methanol. The compound of Formula 1 may, for example, be combined with equal volumes of the at least one polar aprotic solvent and the at least one polar protic solvent.

[0118] In one embodiment, the first mixture may, for example, be mixed for a first period of time ranging from 30 minutes to 2 hours where the temperature ranges from 15 °C to 25 °C, then for a second period of time ranging from 30 minutes to 2 hours, where the temperature ranges from 0 °C to 2 °C. In one embodiment, the first period of time and the second period of time are each 1 hour. In another embodiment, the method may comprise mixing the first mixture for at least one period of time ranging from 30 minutes to 2 hours at a temperature ranging from 15 °C to 25 °C, then filtering the first mixture to obtain a solid. The method may further comprise combining the solid with at least one polar aprotic solvent and at least one polar protic solvent, such as at equal volumes, for a first period of time ranging from 30 minutes to 2 hours at a temperature ranging from 15 °C to 25 °C, and filtering to obtain a second solid. In a further embodiment, these combining and filtering steps may be repeated two to fifteen times.

[0119] The method for purifying a compound of Formula 1 may further comprise obtaining a solid from the first mixture, and combining the solid with at least one polar protic solvent and at least one polar aprotic solvent to obtain a second mixture. The second mixture may, for example, comprise methanol and methylene chloride in a ratio by volume ranging from 1:5 to 1:15 methanol:methylene chloride. In one embodiment, the second mixture may be mixed at a temperature ranging from 30 °C to 36 °C and then filtered to obtain a solution. In a further embodiment, the concentration of the polar protic solvent in the solution may be reduced to a level below 5%, and the solution may be mixed, for example, at a temperature ranging from 0 °C to 6 °C, for a time period, for example, ranging from 30 minutes to 2 hours prior to filtering.

[0120] In one embodiment, mixing the first mixture may occur during a period of time ranging from 10 to 20 minutes, such as 15 minutes. In one embodiment, cooling the first mixture to a temperature ranging from 15 °C to 25 °C and allowing the mixture to stand without mixing may occur during a second period of time ranging from 30 minutes to 3 hours, such as from 1 hour to 2 hours.

The first mixture may be further cooled to a temperature ranging from 0 °C to 6 °C and allowed to stand without mixing for a third period of time ranging from 30 minutes to 2 hours, such as 1 hour.

[0121] Obtaining the compound of Formula 1 may include filtering any mixture described herein through at least one filter selected from pyrogen reducing filters and clarifying filters.

[0122] As disclosed herein, mixing may be carried out by using a mechanical mixing device, for instance, a stirrer or agitator. Mixing may also be effected by solubility of the compound having Formula 1 in the solvent system. Increasing the temperature may increase solubility.

[0123] In one embodiment, when at least one compound of Formula 1 is to be combined with at least one polar aprotic solvent and at least one polar protic solvent, the at least one compound of Formula 1 may be used in the form of a pharmaceutically acceptable salt thereof. Where at least one compound of Formula 1 is obtained as the product of the method of the invention, the at least one compound of Formula 1 may be recovered in the form of a pharmaceutically acceptable salt thereof.

[0124] In another embodiment, where a compound of Formula 1 is obtained by the method according to the invention, the compound may be converted into a pharmaceutically acceptable salt thereof by addition of an acid.

[0125] In one embodiment, the at least one compound of Formula 1 may be [4S-(4 $\alpha$ ,12 $\alpha$ )]-4,7-Bis(dimethylamino)-9-[(1-butylamino)acetyl]amino]-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-octahydro-3,10,12,12a-tetrahydroxy-1,11-dioxo-2-naphthacene-carboxamide, such as pharmaceutically acceptable salts such as HCl salts. In another embodiment, the at least one compound of Formula 1 may be [4S-(4 $\alpha$ ,12 $\alpha$ )]-4,7-Bis(dimethylamino)-9-[(pyrrolidinyl)acetyl]amino]-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-octahydro-3,10,12,12a-tetrahydroxy-1,11-dioxo-2-naphthacene-carboxamide, such as pharmaceutically acceptable salts such as HCl salts.

[0126] A method for purifying at least one compound of Formula 1 may be a method for purifying tigecycline, comprising:

A) combining tigecycline with at least one polar aprotic solvent and at least one polar protic solvent to give a first mixture,

B) mixing the first mixture for at least one period of time, for example, ranging from 15 minutes to 2 hours and at a temperature ranging from 0 °C to 40 °C, and

C) obtaining tigecycline.

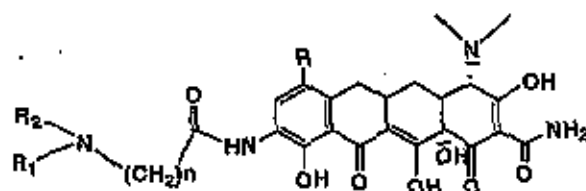
[0127] The tigecycline that is combined with at least one polar aprotic solvent and at least one polar protic solvent may be provided in a form chosen from a solid, a slurry, a suspension, and a solution. In one embodiment, the tigecycline obtained from the method may contain less than 1% of the C-4 epimer of tigecycline or a pharmaceutically acceptable salt thereof as determined by high pressure liquid chromatography (HPLC).

[0128] The at least one compound of Formula 1 obtained from the method may contain less than 3.0% impurities as determined by HPLC, such as less than 1.0% impurities, such as less than 0.7% impurities. In another embodiment, the at least one compound of Formula 1 may contain less than 2% of the C-4 epimer of the compound of formula 1 or a pharmaceutically acceptable salt thereof, as determined by HPLC, such as less than 1% of the C-4 epimer, such as less than 0.5% of the C-4 epimer.

[0129] The method may be performed on greater than 5 grams of the at least one compound of Formula 1, such as greater than 50 grams, such as greater than 100 grams, such as greater than 500 grams, such as greater than 1 kilogram, and further such as greater than 10 kilograms.

[0130] One embodiment discloses a compound prepared by any of the methods described herein, including but not limited to a compound of Formula 1 and tigecycline. Another embodiment includes a composition comprising a compound prepared by any of the methods described herein. The composition may further comprise a pharmaceutically acceptable carrier.

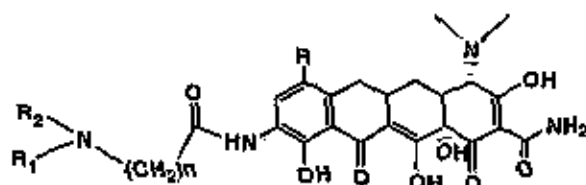
[0131] In one embodiment, the composition may comprise at least one compound of Formula 1:

**Formula 1**

or a pharmaceutically acceptable salt thereof,

wherein  $n$  is 1,  $R_1$  is hydrogen,  $R_2$  is *t*-butyl, and  $R_3$  and  $R_4$  are each methyl.

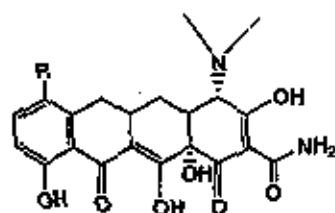
[0132] One embodiment of the disclosure includes a method for preparing at least one compound of Formula 1:

**Formula 1**

or a pharmaceutically acceptable salt thereof,

wherein  $R_1$  and  $R_2$  are each independently chosen from hydrogen, straight and branched chain ( $C_1$ - $C_8$ ) alkyl, and cycloalkyl, or  $R_1$  and  $R_2$ , together with N, form a heterocycle;  $R$  is  $-NR_3R_4$ , where  $R_3$  and  $R_4$  are each independently chosen from hydrogen, and straight and branched ( $C_1$ - $C_4$ ) alkyl; and  $n$  ranges from 1-4, comprising:

A) reacting at least one nitrating agent with at least one compound of Formula 2:

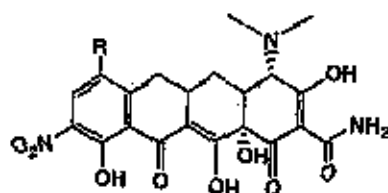
**Formula 2**

or a salt thereof,

to prepare a reaction mixture, such as a reaction mixture slurry, comprising an intermediate, such as at least one compound of Formula 3:

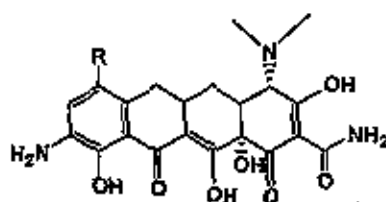
69

annex

**Formula 3**

or a salt thereof,

B) combining at least one reducing agent with the reaction mixture slurry to prepare a second intermediate, such as at least one compound of Formula 4,

**Formula 4**

or a salt thereof,

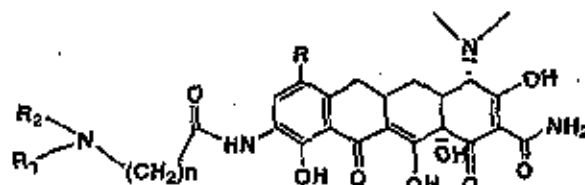
C) reacting the second intermediate with at least one aminoacyl compound in a reaction medium to obtain at least one compound of formula 1. In one embodiment, the reaction medium is chosen from an aqueous medium, and at least one basic solvent in the absence of a reagent base. Additional steps may include, for example at least one of:

D) combining the at least one compound of Formula 1 with at least one polar aprotic solvent and at least one polar protic solvent to give a first mixture,

E) mixing the first mixture for at least one period of time, such as ranging from 15 minutes to 2 hours, at a temperature, such as ranging from 0 °C to 40 °C, and

F) obtaining at least one compound of Formula 1. In one embodiment, any of the intermediates of the methods disclosed may be isolated or precipitated out. In another embodiment, two or more steps of any of the methods disclosed are "one-pot" procedures.

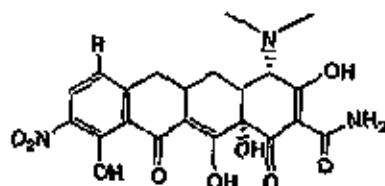
[0133] Another embodiment of the disclosure includes a method for preparing at least one compound of Formula 1:

**Formula 1**

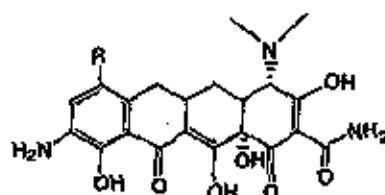
or a pharmaceutically acceptable salt thereof,

wherein  $R_1$  and  $R_2$  are each independently chosen from hydrogen, straight and branched chain ( $C_1$ - $C_6$ )alkyl, and cycloalkyl, or  $R_1$  and  $R_2$ , together with N, form a heterocycle;  $R$  is  $-NR_3R_4$ , where  $R_3$  and  $R_4$  are each independently chosen from hydrogen, and straight and branched ( $C_1$ - $C_4$ )alkyl; and  $n$  ranges from 1-4, comprising:

A) combining at least one reducing agent with a reaction mixture, such as a reaction mixture slurry, comprising at least one compound of Formula 3:

**Formula 3**

or a salt thereof, to prepare at least one intermediate, such as a compound of Formula 4,

**Formula 4**

or a salt thereof,

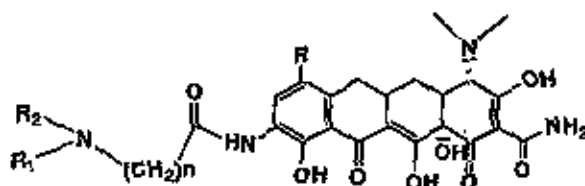
B) reacting the intermediate with at least one aminoacyl compound in a reaction medium chosen from an aqueous medium to obtain the compound of Formula 1. In one embodiment, the reaction medium may be chosen from at least one basic solvent in the absence of a reagent base. Additional steps may include, for example, at least one of:

C) combining the at least one compound of Formula 1 with at least one polar aprotic solvent and at least one polar protic solvent to give a first mixture,

D) mixing the first mixture for at least one period of time, such as ranging from 15 minutes to 2 hours, at a temperature, such as ranging from 0 °C to 40 °C, and

E) obtaining at least one compound of Formula 1.

[0134] A further embodiment of the disclosure includes a method for preparing at least one compound of Formula 1:

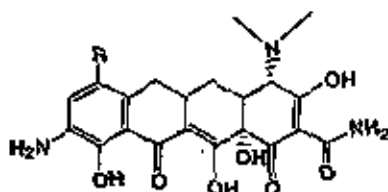


**Formula 1**

or a pharmaceutically acceptable salt thereof,

wherein  $R_1$  and  $R_2$  are each independently chosen from hydrogen, straight and branched chain ( $C_1$ - $C_6$ )alkyl, and cycloalkyl, or  $R_1$  and  $R_2$ , together with N, form a heterocycle; R is  $-NR_3R_4$ , where  $R_3$  and  $R_4$  are each independently chosen from hydrogen, and straight and branched ( $C_1$ - $C_4$ )alkyl; and n ranges from 1-4, comprising:

A) reacting at least one compound of Formula 4:



**Formula 4**

or a salt thereof,

with at least one aminoacyl compound in a reaction medium, for example, chosen from an aqueous medium, and at least one basic solvent in the absence of a reagent base to obtain the compound of Formula 1. Additional steps may include at least one of:

B) combining the at least one compound of Formula 1 with at least one polar aprotic solvent and at least one polar protic solvent to give a first mixture,

72

C) mixing the first mixture for at least one period of time, such as ranging from 15 minutes to 2 hours, at a temperature, such as ranging from 0 °C to 40 °C, and

D) obtaining at least one compound of Formula 1.

[0135] Any of these methods disclosed for preparing a compound of Formula 1 may be a method for preparing a compound of Formula 1, where n is 1, R<sub>1</sub> is hydrogen, R<sub>2</sub> is t-butyl, and R<sub>3</sub> and R<sub>4</sub> are each methyl.

### PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS

[0136] "Pharmaceutical composition" as used herein refers to a medicinal composition. The pharmaceutical composition may contain at least one pharmaceutically acceptable carrier.

[0137] "Pharmaceutically acceptable excipient" as used herein refers to pharmaceutical carriers or vehicles suitable for administration of the compounds provided herein including any such carriers known to those skilled in the art to be suitable for the particular mode of administration. For example, solutions or suspensions used for parenteral, intradermal, subcutaneous, or topical application can include a sterile diluent (e.g., water for injection, saline solution, fixed oil, and the like); a naturally occurring vegetable oil (e.g., sesame oil, coconut oil, peanut oil, cottonseed oil, and the like); a synthetic fatty vehicle (e.g., ethyl oleate, polyethylene glycol, glycerine, propylene glycol, and the like, including other synthetic solvents); antimicrobial agents (e.g., benzyl alcohol, methyl parabens, and the like); antioxidants (e.g., ascorbic acid, sodium bisulfite, and the like); chelating agents (e.g., ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) and the like); buffers (e.g., acetates, citrates, phosphates, and the like); and/or agents for the adjustment of tonicity (e.g., sodium chloride, dextrose, and the like); or mixtures thereof. By further example, where administered intravenously, suitable carriers include physiological saline, phosphate buffered saline (PBS), and solutions containing thickening and solubilizing agents such as glucose, polyethylene glycol, polypropyleneglycol, and the like, and mixtures thereof.

[0138] By way of non-limiting example, tigecycline may be optionally combined with one or more pharmaceutically acceptable excipients, and may be administered orally in such forms as tablets, capsules, dispersible powders,

73  
00073

granules, or suspensions containing, for example, from about 0.05 to 5% of suspending agent, syrups containing, for example, from about 10 to 50% of sugar, and elixirs containing, for example, from about 20 to 50% ethanol, and the like, or parenterally in the form of sterile injectable solutions or suspensions containing from about 0.05 to 5% suspending agent in an isotonic medium. Such pharmaceutical preparations may contain, for example, from about 25 to about 90% of the active ingredient in combination with the carrier, more usually between about 5% and 60% by weight. Other formulations are discussed in U.S. Patent Nos. 5,494,903 and 5,529,990, which are herein incorporated by reference.

[0139] The term "pharmaceutically acceptable salt" refers to acid addition salts or base addition salts of the compounds in the present disclosure. A pharmaceutically acceptable salt is any salt which retains the activity of the parent compound and does not impart any deleterious or undesirable effect on the subject to whom it is administered and in the context in which it is administered. Pharmaceutically acceptable salts include metal complexes and salts of both inorganic and organic acids. Pharmaceutically acceptable salts include metal salts such as aluminum, calcium, iron, magnesium, manganese and complex salts. Pharmaceutically acceptable salts include acid salts such as acetic, aspartic, alkylsulfonic, arylsulfonic, axetil, benzenesulfonic, benzoic, bicarbonic, bisulfuric, bitartaric, butyric, calcium edetate, camsylic, carbonic, chlorobenzoic, cilexetil, citric, edetic, edisyllic, estolic, esyl, esyllic, formic, fumaric, gluceptic, gluconic, glutamic, glycolic, glycolylarsanilic, hexamic, hexylresorcinic, hydrabamic, hydrobromic, hydrochloric, hydroiodic, hydroxynaphthoic, isethionic, lactic, lactobionic, maleic, malic, malonic, mandelic, methanesulfonic, methylnitric, methylsulfuric, mucic, muconic, napsylic, nitric, oxalic, p-nitromethanesulfonic, pamoic, pantothenic, phosphoric, monohydrogen phosphoric, dihydrogen phosphoric, phthalic, polygalactouronic, propionic, salicylic, stearic, succinic, sulfamic, sulfanilic, sulfonic, sulfuric, tannic, tartaric, teoclic, toluenesulfonic, and the like. Pharmaceutically acceptable salts may be derived from amino acids, including but not limited to cysteine. Other acceptable salts may be found, for example, in Stahl et al., *Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use*, Wiley-VCH; 1st edition (June 15, 2002).

[0140] Other than in the examples, and where otherwise indicated, all numbers used in the specification and claims are to be understood as modified in all instances by the term "about." Accordingly, unless indicated to the contrary, the numerical parameters set forth in this specification and attached claims are approximations that may vary depending upon the desired properties sought to be obtained by the present disclosure. At the very least, and not as an attempt to limit the application of the doctrine of equivalents to the scope of the claims, each numerical parameter should be construed in light of the number of significant digits and ordinary rounding approaches.

[0141] Notwithstanding that the numerical ranges and parameters setting forth the broad scope of the disclosure are approximations, the numerical values set forth in the specific examples are reported as precisely as possible. Any numerical value, however, inherently contains certain errors necessarily resulting from the standard deviation found in their respective testing measurements.

[0142] The following examples are intended to illustrate the invention in a non-limiting manner.

### EXAMPLES

#### NITRATION

[0143] Minocycline was prepared according to the method described in U. S. Patents No. 3,226,436.

[0144] HPLC analyses were performed under the following conditions:

|               |                                                                                                                                                                                                                            |
|---------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Column:       | Inertsil ODS3 5 $\mu$ m, 25 x 0.46 cm                                                                                                                                                                                      |
| Mobile Phase: | 80% A + 20% B, where<br>A = 90% (0.05 M $\text{KH}_2\text{PO}_4$ + 5 mL triethylamine/L phosphate + $\text{H}_3\text{PO}_4$ to pH 6)/ 10% Acetonitrile adjusted to pH 3.0 with $\text{H}_3\text{PO}_4$<br>B = Acetonitrile |
| Flow rate     | 1.0 mL/min                                                                                                                                                                                                                 |
| Detection     | 250 nm                                                                                                                                                                                                                     |

**Comparative Example 1: Preparation of 9-nitrominocycline**

[0145] This Example describes the nitration of minocycline where the product of the nitration was isolated.

[0146] 13.44 grams of minocycline p-chlorobenzenesulfonate (i.e., [4S-(4 $\alpha$ ,12 $\alpha$ )]-4,7-bis(dimethylamino)-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-octahydro-3,10,12,12a-tetrahydroxy-1,11-dioxo-2-naphthacenecarboxamide p-chlorobenzenesulfonate) was added slowly with stirring to 50 mL of concentrated sulfuric acid. The solution was cooled to 0-15°C. Nitric acid (90%, 0.6 mL) was added slowly and the solution was stirred at 0-15°C for 1-2 h until the reaction was complete, as determined by HPLC. The solution containing the intermediate 9-nitrominocycline sulfate (i.e., [4S-(4 $\alpha$ ,12 $\alpha$ )-9-nitro]-4,7-bis(dimethylamino)-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-octahydro-3,10,12,12a-tetrahydroxy-1,11-dioxo-2-naphthacenecarboxamide sulfate) was transferred with stirring to 300 g of ice and water over 20 min. The pH of the quench was adjusted to 5.0-5.5 with 28% aqueous ammonium hydroxide while maintaining the temperature between 0-8°C. The precipitate was filtered and washed with water (2 x 10 mL). The solid was dried under vacuum under a stream of nitrogen to give 9 g of crude 9-nitrominocycline sulfate.

[0147] Analysis (area %) by HPLC showed a purity of 90% with a C4-epimer content of 1.5%. MS(FAB): m/z 503 (M+H), 502 (M+). The product was isolated by precipitation at its isoelectric point from an aqueous solution. The crude sulfate molar yield was 45%.

[0148] Table 1 below lists data for other nitration processes:

**Table 1**

| Nitrominocycline | Impurities | minocycline<br>( $\mu$ g/mg) | Molar yield<br>(%) |
|------------------|------------|------------------------------|--------------------|
|                  |            |                              |                    |
| A                | 43.15      | 3.62                         | 38                 |
| B                | 27.88      | 5.5                          | 34                 |

76  
2006.20

[0149] It can be seen that isolation of the 9-nitrominocycline resulted in a high amount of impurities.

**Comparative Example 2: Preparation of 9-nitrominocycline**

[0150] This Example describes the nitration of minocycline where the product of the nitration is isolated.

[0151] A 2-L multi-neck glass flask was equipped with a mechanical stirrer, thermocouple, liquid addition tube, nitrogen line, and gas outlet to a 30% (wt.) caustic scrubber. The flask was charged with sulfuric acid 66° Be (1,507 g, 819 mL, 15 moles). The solution was cooled to 0 - 2°C. Minocycline.HCl (92.7% potency, 311 g, 0.58 moles) was added to the sulfuric acid over 0.7 hours at 0 - 14 °C with stirring. After addition, the mixture was stirred at 0°C for 0.5 hours to obtain a yellow solution. Nitric acid (95.9% nitrate content, 48 g, 32 mL, 0.73 moles, 1.25 mol equivalents) was added over 3 hours while keeping the mixture at 0 - 2 °C. The mixture was stirred at 0°C for 0.3 hours (dark red/black solution). Analysis (area %) by HPLC showed: 0% minocycline, 75.6% 9-nitrominocycline, 8.2% largest single impurity (LSI); relative retention time to minocycline (RRT) = 2.08.

[0152] A 22-L multi-neck glass flask was equipped with a mechanical stirrer, thermocouple, and a condenser with nitrogen protection. The flask was charged with 6,704 g (8,540 mL) of isopropanol (IPA) and 1,026 g (1,500 mL) of heptanes. The solution was then cooled to 0 - 5°C. The 9-nitrominocycline reaction mixture was transferred to the 22-L flask over 2 hours at 0 - 39 °C to yield a yellow slurry. The slurry temperature was maintained at 34 - 39°C for 2 hours then cooled to 20 - 34°C and stirred at 20 - 34 °C for 14.6 hours.

[0153] A solution of isopropanol 3,028 g (3,857 mL) and heptanes 660 g (965 mL) was prepared and maintained at 20 - 25°C (4:1, IPA:heptanes by volume). The slurry was filtered on a 30-cm diameter Büchner funnel using #1 Whatman filter paper under vacuum and nitrogen protection. The resulting wet cake was transferred to a 4-L glass Erlenmeyer flask, equipped with a mechanical

77  
8/11/07

stirrer and nitrogen protection. The cake was slurried by adding 1,608 mL of the prepared IPA/heptanes solution for 0.5 hours at 23 - 26°C.

[0154] The slurry was filtered again as described above. The wet cake was reslurried two more times as above (total of three reslurries). After the last filtration, the cake was maintained under vacuum under nitrogen protection for 0.2 hours. The product was dried at 40°C under 23 - 11 mmHg of vacuum for 48 hours to a loss on drying (LOD, 80°C, 1 hour, > 49 mmHg vacuum) value of 1.54. The weight of 9-nitrominocycline sulfate obtained was 380.10g, HPLC strength = 76.3% (as the disulfate salt), total impurities = 34.6%, largest single impurity (LSI) 9.48% (RRT = 0.94). Yield from minocycline.HCl = 86%. Yield corrected for strength of product and starting material = 71%.

[0155] It can be seen that isolating the 9-nitrominocycline compound resulted in a product having a large percentage of impurities.

#### Example 1

[0156] Table 2 below outlines nitration experiments conducted using the procedure outlined in Comparative Example 2, where the following variables were modified: nitric acid addition time; reaction temperature; molar equivalents of nitric acid (relative to minocycline HCl); and agitation rate. In accordance with the methods disclosed herein, none of these reactions were quenched or worked up to isolate product. The sole analytical tool used was HPLC analysis.

**Table 2**

| HNO <sub>3</sub><br>Addition<br>Time (hrs.) | Reaction<br>Temp.<br>(°C) <sup>1</sup> | mol.<br>Equiv.<br>HNO <sub>3</sub> | Mino<br>(Area %) | 8-Nitro<br>(Area %) | Tot. Imp.<br>(Area %) | RRT 0.44<br>(Area %) | RRT 0.51<br>(Area %) | RRT 0.57<br>(Area %) | RRT 1.23<br>(Area %) |
|---------------------------------------------|----------------------------------------|------------------------------------|------------------|---------------------|-----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| 2                                           | 0                                      | 1.09                               | 7.6              | 69.7                | 22.7                  | 0.8                  | 3.8                  | 5.7                  | 9.8                  |
| 2.25                                        | 0                                      | 1.2                                | 5.2              | 70.3                | 24.5                  | 0.4                  | 4.9                  | 6.9                  | 10.8                 |
| 2.5                                         | 0                                      | 1.3                                | 2.4              | 68.2                | 29.4                  | 0.0                  | 5.4                  | 8.9                  | 12.9                 |
| 2.75                                        | 0                                      | 1.43                               | 0.0              | 65.6                | 34.4                  | 0.0                  | 6.7                  | 11.2                 | 14.0                 |
| 2                                           | 0                                      | 1.36                               | 4.0              | 55.0                | 41.0                  | 0.3                  | 6.5                  | 11.1                 | 17.0                 |
| 2.25                                        | 0                                      | 1.5                                | 0.7              | 50.6                | 48.7                  | 0.0                  | 7.2                  | 11.3                 | 19.0                 |
| 2.2                                         | 20                                     | 1.36                               | 7.5              | 54.3                | 38.2                  | 2.8                  | 8.6                  | 15.9                 | 5.1                  |
| 2.45                                        | 20                                     | 1.5                                | 4.0              | 52.0                | 44.0                  | 2.9                  | 10.0                 | 17.7                 | 5.6                  |
| 2.7                                         | 20                                     | 1.66                               | 2.7              | 52.0                | 45.3                  | 3.3                  | 11.0                 | 19.4                 | 6.2                  |
| 0.25                                        | 0                                      | 1.38                               | 1.6              | 56.7                | 41.7                  | 6.3                  | 0.0                  | 13.9                 | 18.4                 |
| 0.5                                         | 0                                      | 1.62                               | 0.8              | 43.8                | 55.4                  | 5.3                  | 0.0                  | 24.6                 | 23.2                 |
| 0.8                                         | 0                                      | 1.3                                | 2.1              | 63.4                | 34.5                  | 3.5                  | 0.0                  | 9.4                  | 18.2                 |
| 1                                           | 0                                      | 1.62                               | 0.7              | 43.5                | 55.8                  | 5.8                  | 0.0                  | 21.6                 | 23.5                 |
| 2.4                                         | 0                                      | 1.3                                | 2.2              | 60.8                | 37.2                  | 5.7                  | 0.0                  | 12.8                 | 15.3                 |
| 3                                           | 0                                      | 1.62                               | 0.4              | 43.3                | 56.3                  | 9.3                  | 0.0                  | 23.7                 | 19.7                 |
| 1.6                                         | 0                                      | 1.3                                | 4.6              | 60.9                | 34.5                  | 3.1                  | 0                    | 9.5                  | 21                   |
| 2                                           | 0                                      | 1.62                               | 0                | 48.5                | 51.5                  | 5.1                  | 0                    | 16.1                 | 26.8                 |
| 2.8                                         | 5                                      | 1.38                               | 1.8              | 71.9                | 26.3                  | 3.8                  | 0                    | 8                    | 12.5                 |
| 3.1                                         | 5                                      | 1.58                               | 0                | 60                  | 40                    | 6.1                  | 0                    | 15.6                 | 15.4                 |
| 2.4                                         | 5                                      | 1.07                               | 3.6              | 74.8                | 21.6                  | 1.9                  | 0                    | 4.1                  | 11.1                 |
| 3                                           | 5                                      | 1.33                               | 0                | 70                  | 30                    | 4.2                  | 9.3                  | 0                    | 14.9                 |

<sup>1</sup> Only the bath temperature was monitored in these reactions due to vessel size.<sup>2</sup> Reaction was at 50wt% of original minocycline concentration.<sup>3</sup> Agitation was vigorous compared to all other experiments.<sup>4</sup> HNO<sub>3</sub> was added as 50wt% in H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

[0157] It can be seen that despite the various conditions attempted, the amount of starting minocycline was present in an amount less than 10% and under certain conditions, was substantially removed.

### **Example 2**

[0158] Experiments were also performed that modified the nitration reaction, the reaction quench, and work up of the nitration reaction. The

experiments were conducted using the procedure outlined in Comparative Example 2, modifying the following variables: nitric acid addition time; reaction temperature; molar equivalents of nitric acid (relative to minocycline HCl); temperature of the quench; composition of the quench solution; addition time of the reaction mixture to the quench solution; and wash method of the isolated cake. The data are shown in Table 3, below. The sole analytical tool used was HPLC analysis.

**Table 3**

| HNO <sub>3</sub><br>Addition<br>Time<br>(hrs.) | Reaction<br>Temp.<br>(°C) <sup>1</sup> | mol.<br>Equiv.<br>HNO <sub>3</sub> | Strength<br>(dl H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub><br>salt, %) | Tot.<br>Imp.<br>(%) | LSI (%) | Quench<br>Comp. <sup>2</sup> | Quench<br>Temp.<br>(°C) | Quench<br>Add.<br>Time<br>(hrs.) | Wash<br>Method <sup>3</sup> | Yield<br>(corr.,<br>%) <sup>4</sup> |
|------------------------------------------------|----------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------------------------------|---------------------|---------|------------------------------|-------------------------|----------------------------------|-----------------------------|-------------------------------------|
| 4.6                                            | 5                                      | 1.67                               | 62.7                                                       | 40.1                | 21.6    | IPA/hep                      | 0                       | 0.1                              | 1                           | 60                                  |
| 4.6                                            | 5                                      | 1.67                               | 61.0                                                       | 39.7                | 18.8    | IPA/hep                      | 34                      | 0.1                              | 1                           | 65                                  |
| 5.1                                            | 5                                      | 1.75                               | 55.8                                                       | 36.2                | 18.3    | IPA                          | 0                       | 0.2                              | 1                           | 58                                  |
| 5.1                                            | 5                                      | 1.75                               | 56.0                                                       | 38.9                | 18.2    | IPA                          | 34                      | 0.2                              | 1                           | 52                                  |
| 3                                              | 5                                      | 1.63                               | 75.4                                                       | 29.5                | 19.1    | IPA/hep                      | 0                       | 1                                | 1                           | 70                                  |
| 3                                              | 5                                      | 1.63                               | 74.8                                                       | 27.8                | 18.9    | IPA/hep                      | 34                      | 1                                | 1                           | 79                                  |
| 3                                              | 5                                      | 1.51                               | 83.6                                                       | 22.2                | 13.0    | IPA                          | 0                       | 1                                | 1                           | 64                                  |
| 3                                              | 5                                      | 1.51                               | 84.8                                                       | 22.4                | 12.9    | IPA                          | 34                      | 1                                | 1                           | 102                                 |
| 3.5                                            | -5                                     | 1.38                               | 84.3                                                       | 7.7                 | 7.2     | IPA/hep                      | 0 <sup>5</sup>          | 2                                | 1                           | 96                                  |
| 3.5                                            | -5                                     | 1.38                               | 101.8                                                      | 11.4                | 8.3     | IPA/hep                      | 0 <sup>5</sup>          | 2                                | 2                           | 104                                 |

<sup>1</sup> Only the bath temperature was monitored in these reactions due to vessel size.

<sup>2</sup> When IPA was used as the quench, heptanes were then added to obtain the composition of the original quench mixture.

<sup>3</sup> Wash method 1: wet cake was washed on the filter with 4:1 IPA:hep. (vol.). Wash method 2: wet cake was slurried three times with 4:1 IPA:hep. (vol.). Wash method #2 used 20% more wash solution than method #1.

<sup>4</sup> Yield is corrected for strength of the product and starting material.

<sup>5</sup> The quench was started at 0°C then immediately heated to 34°C and held at 34°C for the remainder of the quench.

[0159] It can be seen from the data of Table 3 that the yield was at least 50%.

### Example 3

[0160] This Example shows the results of varying the amount of nitric acid (in equivalents) needed for the nitration step. The nitric acid was titrated at 89.5% and amount used corrected accordingly.

[0161] Three trials were performed. Trial 1 used 1.25 equivalent nitric acid, Trial 2 used 1.09 equivalent, and Trial 3 used 1.00 equivalent nitric acid.

[0162] The HPLC completion test of Trial 1 showed no signal of minocycline while completion test for Trial 2 showed 2.5% unreacted starting material. Both reactions were hydrogenated and then converted to the aminominocycline hydrochloride salt using the SLP procedure.

[0163] Hydrogenated product 1 (from Trial 1) showed a minocycline content of 0.37%; Strength = 83.0%, total imp. = 3.20%; single imp. = 0.52%; epimer content = 1.1%

[0164] Hydrogenated product 2 (from Trial 2) showed a minocycline content of 1.6%; Strength = 84.2%; total imp. = 4.00%; single imp. = 0.35%; epimer content = 1.0%.

[0165] Trial 3: Strength = 83.0%; total imp. = 5.0%; single imp. = 2.7%; epimer content = 1.1%.

### REDUCTION

[0166] HPLC analyses were performed under the following conditions:

|               |                                                                                                                                                                                                                            |
|---------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Column:       | Inertsil ODS3 5 $\mu$ m, 25 x 0.46 cm                                                                                                                                                                                      |
| Mobile Phase: | 80% A + 20% B, where<br>A = 90% (0.05 M $\text{KH}_2\text{PO}_4$ + 5 mL triethylamine/L phosphate + $\text{H}_3\text{PO}_4$ to pH 6)/ 10% Acetonitrile adjusted to pH 6.0 with $\text{H}_3\text{PO}_4$<br>B = Acetonitrile |
| Flow rate     | 1.0 mL/min                                                                                                                                                                                                                 |
| Detection     | 250 nm                                                                                                                                                                                                                     |

### Example 1

[0167] This Example describes a hydrogenation reaction where the 9-nitrominocycline intermediate was not isolated.

[0168] 10.1 grams of minocycline p-chlorobenzenesulfonate was added slowly with stirring to 27 mL of concentrated sulfuric acid. The solution is cooled to 0-2°C. Nitric acid (0.6 mL, 90%) was added slowly and the solution was stirred at 0-2°C for 1 - 2 h until the reaction was complete as determined by HPLC. After the nitration was complete, the solution containing the intermediate 9-nitrominocycline sulfate was transferred with stirring to 150 mL of isopropanol and 1200 mL of methanol while keeping the temperature below 10-15°C. The solution was hydrogenated at 26-28°C at 40 psi for 3 h in the presence of 10% Pd on carbon catalyst, which was 50% wet. After hydrogenation was complete, the catalyst was filtered off and the solution was slowly poured into 250 mL isopropanol with stirring at 0 - 5°C. The solid (3.4g) was filtered off. Crude purity by HPLC (area %) was 90%. C<sub>4</sub>-epimer was present in an amount of 0.9%). MS(FAB): m/z 473 (M+H), 472 (M+).

### Example 2

[0169] This Example describes a hydrogenation reaction where the 9-nitrominocycline intermediate was not isolated.

[0170] 84.3 grams of minocycline p-chlorobenzenesulfonate was added slowly with stirring to 368 g of concentrated sulfuric acid. The solution was cooled to 10-15°C. Nitric acid (6.0 mL, fuming) was added slowly. The solution was stirred at 10-15°C for 1 to 2 h until the reaction is complete, as determined by HPLC. After the nitration was complete, the solution containing the intermediate 9-nitrominocycline sulfate was transferred with stirring to 0.3 Kg of methanol while keeping the temperature below 10 - 15°C. The solution was hydrogenated at 26-28°C at 50 psi for 2-3 h in the presence of 10% Pd on carbon catalyst, which was 50% wet. After hydrogenation was complete, the catalyst was filtered off and the solution was slowly poured into 0.6 kg of isopropanol and 0.3 Kg of n-heptane with stirring at 0-5 °C. The solid was filtered off.

[0171] The wet solid was dissolved in 100 g of water at 0-5°C. The mixture was stirred and the organic phase was separated and discarded. To the aqueous phase was added 14.4 g of concentrated HCl. The pH of the solution was adjusted to  $4.0 \pm 0.2$  with ammonium hydroxide. 100 mg of sodium sulfite was added and the solution was seeded with 100 mg of 9-aminomincycline. The mixture was stirred for 4 h at 0 - 5°C and the product was filtered and dried to give 28.5 g of solid. Purity by HPLC (area %) was 96.5 %, with 0.9% C4-epimer. MS(FAB): m/z 473 (M+H), 472 (M+). Yield :54.2%.

### Comparative Example 1

[0172] This Example describes a hydrogenation reaction where the 9-nitromincycline Intermediate was isolated.

[0173] 52.0 kg of minocycline.HCl (92.4% potency) was charged to 4.8 parts (251 kg) sulfuric acid 66° Be at 0 to 15°C in a 300 gallon vessel and stirred to effect removal of HCl. 7.48 kg of nitric acid, fuming 100% (95.9% nitrate content, 1.26 equivalents) was charged over 3 hours and 20 minutes.

[0174] HPLC analysis indicated >1% minocycline remained. Accordingly, 0.31 kg of nitric acid, fuming 100% (95.5% nitrate content, 0.05 equivalents) was added. HPLC analysis still indicated >1% minocycline remained. Another 0.74 kg of nitric acid, fuming 100% (95.5% nitrate content, 0.12 equivalents) was added. As HPLC testing once again indicated >1% minocycline remained, another 1.11 kg of nitric acid, fuming 100% (95.5% nitrate content, 0.19 equivalents) was added, after which <1% minocycline remained.

[0175] The nitration reaction mixture was transferred to a solution of 21.5 parts IPA / 3.3 parts heptane (1120 kg IPA / 171 kg heptane) at 0 to 36 °C. The slurry was filtered (lengthy filtration time), washed with IPA/heptane 4:1 and dried at NMT 40°C to an LOD of NMT 6%, yielding 70.9 kg of sulfate salt (97% crude yield) for use in reduction reaction.

### Example 3

[0176] This Example describes a hydrogenation reaction where the 9-nitromincycline intermediate was not isolated.

[0177] 25.0 kg of minocycline.HCl (94.4% potency) was charged to 7.3 parts (183 kg) sulfuric acid 66° Be at 5 to 15 °C in a 100 gallon vessel and stirred to effect removal of HCl. 2.5015 kg of nitric acid, 85% (86.6% nitrate content, 1.25 equivalents) was added to the vessel over 78 minutes at 9 to 15°C.

[0178] HPLC analysis indicated >1% minocycline remained. Another 0.261 kg nitric acid, 85% (86.6% nitrate content, 0.13 equivalents) was added. As HPLC once again indicated >1% minocycline remained, another 0.261 kg nitric acid, 85% (86.6% nitrate content, 0.13 equivalents) was added. As HPLC still indicated >1% minocycline remained, another 0.174 kg nitric acid, 85% (86.6% nitrate content, 0.09 equivalents) was added, after which it appeared the reaction reached a plateau at 1.7% minocycline starting material.

[0179] The nitration reaction mixture was transferred to 4.2 parts (106 kg) methanol at -20 to 10°C. The quenched batch was adjusted to 4 to 10°C and used as-is in the reduction reaction.

#### Comparative Example 2

[0180] This Example describes a hydrogenation reaction where the 9-nitrominocycline intermediate was isolated.

[0181] 104 kg minocycline.HCl (90.3% potency) charged to 4.8 parts (502 kg) sulfuric acid 66°Be at 0 - 10°C in a 300 gallon vessel and stirred to effect removal of HCl. 15.2 kg fuming nitric acid (100.4%, 1.25 equivalents) charged over 3 hours at 0 - 6°C, 100 rpm. As HPLC testing indicated >1% minocycline remained, another 0.69 kg fuming nitric acid (100.4%, 0.06 equivalents), was added, after which minocycline <1%. The nitration mixture was transferred to a solution of 21.5 parts IPA / 3.3 part heptane at 0-36°C.

[0182] The slurry was filtered (lengthy filtration time), washed with IPA/heptane 4:1 and dried at NMT 40°C to an LOD of NMT 6%, yielding 140 kg of sulfate salt (95% crude yield) for use in reduction reaction.

#### Example 4

[0183] This Example describes a hydrogenation reaction where the 9-nitrominocycline intermediate was not isolated.

84  
2006/130501

[0184] 104 kg minocycline HCl (90% potency) charged to 7.3 parts (763 kg) sulfuric acid 66°Be at 5-15°C and stirred to effect removal of HCl. 14.9 kg fuming nitric acid (100%, 1.25 equivalents) was charged over 1 hour at 5-15°C, 120 rpm. As HPLC analysis indicated that >1% minocycline remained, another 0.69 kg fuming nitric acid (100%, 0.06 equivalents), was added after which minocycline <1%.

[0185] The nitration mixture was transferred to 4.2 parts (440 kg) methanol at -10 to -20°C. The quenched batch was adjusted to 4 - 10°C and used as is in the reduction reaction.

### Comparative Example 3

[0186] This Example describes a hydrogenation reaction where the 9-nitrominocycline intermediate was isolated. Proportions of solvents/reagents are relative to the initial charge of minocycline prior to nitration reaction.

[0187] The 9-nitrominocycline sulfate reaction mixture of Comparative Example 4 was quenched into 2240 kg (21.5 parts) isopropanol and 342 kg (3.3 parts) heptane, over 1 hour, while maintaining the batch temperature at 0 to 36°C. The resulting slurry was stirred at 30 to 36°C for 2 hours, then cooled and stirred at 19 to 25°C for 1 hour. One half of the slurry was filtered, washed with 3 x 205 kg IPA/heptane (4:1) v/v and dried at NMT 40°C to an LOD of NMT 6%. Filtration and drying took 16 days (for 7 of these days the wet cake was idle under nitrogen during a scheduled plant shutdown) and yielded 58 kg of sulfate salt. The second half of the slurry was drummed and refrigerated pending filter availability. It was refrigerated for 12 days, then charged back to the vessel and stirred at 0 to 6°C for 2 days, then adjusted to 19 to 25°C, filtered, washed with 3 x 205 kg IPA/heptane (4:1) v/v and dried at NMT 40°C to an LOD of NMT 6%. Filtration and drying took 6 days and yielded 82 kg of sulfate salt.

[0188] Both sub-lots of 9-nitrominocycline sulfate were dissolved in 672 kg (6.5 parts) methanol and 8.4 kg (0.08 parts) water for injection, USP at 19 to 25°C and reduced to 9-aminominocycline sulfate using 70 psig hydrogen gas and 2.74 kg (0.026 parts) Palladium on Carbon, wet 10% (w/w). The hydrogenation reaction took 10.5 hours and resulted in no detectable starting material.

[0189] The 9-aminomincycline sulfate reaction mixture was filtered to remove catalyst and quenched into a solution of 1660 kg (16 parts) IPA / 710 (6.8 parts) heptane at 0 to 27°C, over 1 hour. The resulting mixture was adjusted to 19 to 25°C and stirred for 1 hour.

[0190] The 9-aminomincycline sulfate slurry was filtered on a Nutsche filter, washed with 2 x 162 kg (1.5 parts each) IPA / heptane (4:1) v/v and dried at 40°C to an LOD of less than 4%. The filtration, washing and drying took 10 days and gave 94.0 kg of 9-aminomincycline sulfate. After filtration, solids were observed in the mother liquors. These were filtered, washed with 113 kg IPA / heptane (4:1) v/v and dried at 40 °C to an LOD of less than 4%. 24.1 kg were recovered and retained as a separate lot. Total crude yield of 9-aminomincycline sulfate from minocycline was 84%.

[0191] The 94.0 kg '1<sup>st</sup> crop' of dried 9-aminomincycline sulfate and 0.084 kg (0.0008 parts) sodium sulfite were dissolved in 538 kg (5.17 parts) water for injection, USP and cooled to 0 to 6°C. 0 kg hydrochloric acid, 20°Be was required to bring the 9-aminomincycline sulfate solution pH to 1.1 +/- 0.1 because the initial pH was 1.16. 48.3 kg (0.46 parts) of hydrochloric acid, reagent was added to the 9-aminomincycline solution, forming 9-aminomincycline HCl. 56 kg (0.54 parts) of ammonium hydroxide, 28% and 4.0 kg (0.039 parts) hydrochloric acid, reagent were added to the solution to obtain a batch pH of 4.0 +/- 0.2.

[0192] The batch was then stirred for 90 minutes at 0 to 6°C while ensuring the pH stayed at 4.0 +/- 0.2. The final pH reading was 4.05 pH units. The batch was filtered on a Nutsche filter, washed with 2 x 33 kg (0.3 parts each) water for injection (pH'ed to 4.0) pre-cooled to 2 to 8°C, followed by 2 x 26.1 kg (0.25 parts acetone (pre-cooled to 2 to 8°C) and dried at NMT 40 °C to a moisture content of NMT 7.0%. 43.2 kg of 9-Aminomincycline HCl was isolated, a 40% yield from minocycline HCl.

[0193] Processing of the 24.1 kg '2<sup>nd</sup> crop' of dried 9-aminomincycline sulfate through the salt change proceeded similarly to the process as described in the previous four paragraphs using proportional quantities of reagents. An additional 9.9 kg of 9-Aminomincycline HCl were recovered representing an

86  
2006

incremental additional yield of 9.2%. The total batch yield including both crops was 53.1%.

### Example 5

[0194] This Example describes a hydrogenation reaction where the 9-nitrominocycline intermediate was not isolated. Proportions of solvents/reagents are relative to the initial charge of minocycline prior to nitration reaction.

[0195] The 9-nitrominocycline sulfate reaction mixture from Example 7 was transferred into 440 kg (4.2 parts) of methanol, over 90 minutes, while maintaining the batch temperature at -20 to -10 °C and the agitation rate at 130 RPM.

[0196] The quenched batch was adjusted to 4 to 10°C and reduced to 9-aminominocycline sulfate using 50 psig hydrogen gas and 52 kg (0.5 parts) Palladium on Carbon, wet 10% (w/w). The hydrogenation reaction took 5 hours and resulted in no detectable starting material. The 9-aminominocycline sulfate reaction mixture was filtered to remove catalyst and quenched into a solution of 1241 kg (12 parts) IPA / 537 kg (5.2 parts) heptane at 17 to 23 °C, over 30 minutes. The resulting mixture was then cooled to -18 to -12°C and stirred for 1 hour.

[0197] The resulting 9-aminominocycline sulfate slurry was filtered on a Nutsche filter in two portions and washed with a total of 3.6 parts IPA / heptane (2:1) v/v pre-cooled to 0 to 6°C and 506 kg (4.9 parts) cold heptane. The filtration and washing took 99 hours for both portions (filtered in two portions due to size limitation of the filter). The 9-aminominocycline sulfate wet cakes were dissolved in 150 kg (1.4 parts) water for injection, USP at 0 to 6°C and the upper organic layer separated off as waste.

[0198] 25.7 kg (0.3 parts) hydrochloric acid, 20°Be was added to the 9-aminominocycline sulfate solution at 0 to 6°C for conversion to 9-aminominocycline HCl. Ammonium hydroxide, 28% was added to the reaction mix to obtain a batch pH of 4.0 +/- 0.2; this took 48.5 kg (0.48 parts). 0.15 kg Sodium sulfite (0.0014 parts) was added to the reaction mixture.

[0199] The batch was seeded with 5 g of 9-aminomincycline HCl and stirred for 3 hours while maintaining the pH at 4.0 +/- 0.2 using ammonium hydroxide, 28% (took 0.05 parts). The batch was filtered on a Nutsche filter, washed with 1 part water for injection (pH'ed to 4.0) pre-cooled to 2 to 8°C, followed by 0.2 parts isopropanol (pre-cooled to 2 to 8°C) and dried at NMT 50°C to an LOD of NMT 10.0% and a moisture content of NMT 8.0%.

[0200] 63.1 kg of 9-Aminomincycline HCl was isolated, a 59% yield from minocycline HCl.

[0201] Table 4 below lists the Comparative Data.

**Table 4**

| Batch                        | Scale<br>(kg<br>minocycline<br>HCl) | Strength | Strength<br>corrected<br>yield | Total<br>Impurities | Single<br>Largest<br>Impurity | Epimer | Cycle<br>Time <sup>1</sup> |
|------------------------------|-------------------------------------|----------|--------------------------------|---------------------|-------------------------------|--------|----------------------------|
| (Example 3)                  | 30 kg                               | 84.1%    | 40.3%                          | 4.48%               | 2.76%                         | 2.76%  | 8 days                     |
| (Comp.<br>Example 1)         | 62 kg                               | 90.4%    | 37.0%                          | 6.45%               | 0.84%                         | 1.75%  | 24<br>days                 |
|                              | 52 kg                               | 87.9%    | 27.2%                          | 9.72%               | 3.73%                         | 3.88%  | 25<br>days                 |
| (Comp.<br>Example 2 or<br>3) | 104 kg                              | 86.4%    | 48% <sup>2</sup>               | 10.76%              | 0.63%                         | 3.16%  | 33<br>days <sup>3</sup>    |
|                              |                                     | 87.8%    |                                | 9.91%               | 0.57%                         | 2.46%  |                            |
| (Example 4 or<br>5)          | 104 kg                              | 87.7%    | 67%                            | 3.5%                | 1.2%                          | 0.72%  | 14<br>days                 |

<sup>1</sup> cycle time is from minocycline.HCl to 9-aminomincycline HCl.

<sup>2</sup> combined yield of 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> crops

<sup>3</sup> Does not include 7 day plant shutdown that occurred during process, does include time to process 2nd crop.

[0202] Table 4 indicates that hydrogenation of a reaction mixture without isolation results in a product with a lower amount of impurities and C<sub>4</sub>-epimer.

### **ACYLATION**

[0203] HPLC analyses were performed under the following conditions:

|               |                                                                                                                                              |
|---------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Column:       | Luna C8 5 $\mu$ m, 15 x 0.46 cm                                                                                                              |
| Mobile Phase: | 80% (0.05 M $\text{KH}_2\text{PO}_4$ + 10 mL triethylamine/L phosphate + $\text{H}_3\text{PO}_4$ to pH 6.2)/ 20% Acetonitrile + 0.5 g NaEDTA |
| Flow rate     | 1.0 mL/min                                                                                                                                   |
| Detection     | 250 nm                                                                                                                                       |

### Example 1

#### N-t-Butylglycine Hydrochloride

[0204] To a mixture of t-butyl amine (1.57 L) and toluene (1.35 L) at 45-50 °C is added t-butyl bromoacetate (420 mL). The mixture is stirred for 1 h at 50-60 °C, the temperature is increased to 75 °C over 1 h. After 2 h at 75 °C, the mixture is cooled to  $-12 \pm 3$  °C and let stand for 1 h. The solid is collected by filtration, and the filtrate is concentrated by distillation (30-40 °C, 25-35 mm Hg) to a volume of 825 mL. The resulting concentrate is cooled to 20-25 °C and 6N HCl (1.45 kg) is added. After 3 h, the phases are separated and the aqueous phase is concentrated by distillation (30-40 °C, 25-35 mm Hg) to a volume of 590 mL. Isopropanol (2.4 L) is added and the mixture is concentrated by distillation (15-20 °C, 10-20 mm Hg) to a volume of 990 mL. The resulting slurry is cooled to  $-12 \pm 3$  °C over 30 min. and let stand for 1 h. The solid is collected by filtration, washed with i-PrOH, and dried ( $45 \pm 3$  °C, 10 mm Hg) for 24 h to afford (407.9 g, 86%) of the desired product.

### Example 2

#### N-t-Butylglycine Acid Chloride Hydrochloride

[0205] To a mixture of milled N-t-butylglycine hydrochloride (250.0 g), toluene (1.14 L), and DMF (7.1 g) is added thionyl chloride (143 mL) over 20 min. The mixture is brought to 80-85 °C and heated with stirring for 3 h. After cooling to 20 °C, the solid is collected by filtration under  $\text{N}_2$ , washed with toluene, and dried (40 °C, 10 mm Hg) for 16 h to afford the desired product (260.4 g, 93.8%). Purity by HPLC area %: 98.12%

89  
annex

### Example 3

#### Tigecycline

[0206] To a mixture of 9-aminomincycline•HCl (140.0 g) and cold (0-4 °C) water (840 mL) is added N-t-butylglycine acid chloride hydrochloride (154.0 g) over 15 min with stirring. The mixture is stirred at 0-4 °C for 1-3 h. Ammonium hydroxide (126 g, 30%) is added to bring the pH to 7.2 while maintaining the temperature at 0-10 °C. Methanol (930 mL) and CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (840 mL) are added and the mixture is stirred at 20-25 °C for 1 h, while maintaining the pH at 7.2 by addition of ammonium hydroxide (13.5 g, 30%). The phases are separated, and the solids are combined with the organic layer. The aqueous layer is extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1 x 840 mL, 3 x 420 mL) and the pH of the mixture is adjusted to 7.2 during each extraction. To the combined organic layers is added methanol (200 mL) to afford a solution. The solution is washed with water (2x140 mL), then dried over sodium sulfate (140 g) with stirring for 30 min. The mixture is filtered and the filtrate is concentrated by distillation (20 °C, 15-25 mm Hg) to a volume of 425 mL. To this mixture is added CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1.4 L) and the distillation is repeated two times. The resulting suspension is cooled to 0-2 °C and stirred for 1 h. The solid is collected by filtration, washed with 0-5 °C CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 x 150 mL), and dried (65-70 °C, 10 mm Hg) for 24 h to afford of the desired product (120.0 g, 75%). Purity by HPLC area %: 98.9% and C-4 epimer 0.12%.

### Example 3A

#### Tigecycline

[0207] To a mixture of 9-aminomincycline•HCl (100.0 g) and cold (0-4 °C) water (600 mL) was added N-t-butylglycine acid chloride hydrochloride (110.0 g) over 50 min with stirring. The mixture was stirred well at 0-4 °C for 1.5 h. Ammonium hydroxide (112 g, 28%) was added to bring the pH to 7.2 while maintaining the temperature at 0-5 °C. Methylene chloride (600 mL), then methanol (440 mL) were added and the mixture was stirred at 0-5 °C for 30 min, while maintaining the pH at 7.2 by addition of ammonium hydroxide (10.0 g, 28%). The mixture was warmed to 20-25 °C over 15 min. Methanol (244 mL) was added

dp  
ann 20

and the phases were separated. The aqueous layer was extracted with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (1 x 600 mL, 3 x 300 mL) and the pH of the mixture was adjusted to 7.2 during each extraction. To the combined organic layers was added methanol (144 mL) to afford a solution. The solution was washed with water (2x100 mL), then dried over sodium sulfate (100 g) with stirring for 30 min. The mixture was filtered and the filtrate was concentrated by distillation (20 °C, 80-120 mm Hg) to a volume of 400 mL. To this mixture was added  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (1.0 L) and the distillation was repeated two times. The resulting suspension was cooled to 0-2 °C and stirred for 1 h. The solid was collected by filtration, washed with 0-5 °C  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (2 x 110 mL), and dried (65-70 °C, 20 mm Hg for 18 h, then 3-5 mm Hg for 16 h) to afford the desired product (82.4 g, 71.7%). Purity by HPLC area %: 98.5% and C-4 epimer 0.28%.

#### Example 4

##### N-t-Butylglycine Acid Chloride Hydrochloride

[0208] t-Butylamine (88 g) was dissolved in 300 mL of toluene. The mixture was heated to 45-50 °C and 117.5 g of t-butylbromoacetate was added over 1 h while maintaining the temperature at 50-60 °C. The mixture was heated to 75 °C for 2 hours. The reaction mixture was then cooled to 12 -15 °C and stirred for 1 hour. The solids were filtered off and washed with cold toluene. The solid which was t-butylamine hydrobromide was discarded. The filtrate was cooled to 10-12 °C and HCl gas was bubbled in for 0.5 h. The mixture was stirred for 3 h at 10-12 °C, then the product was collected by filtration and washed with cold toluene. The product was dried under vacuum at 40-50 °C to give 107 g of N-t-butylglycine hydrochloride. MS: m/z 187 (M+)

[0209] N-t-butylglycine hydrochloride (7 g) from the material prepared as described above was added to 35 mL of toluene. Thionyl chloride (11.6 mL) was added and the slurry was heated at 75-80 °C for 1 h. The suspension is cooled to 20 °C and the solid is collected by filtration and washed with 2X15 mL of toluene. The resulting solid is dried under vacuum at 40 °C to afford 4.4 g (65% yield) of product, which is protected from moisture and used immediately in the next step.

### Example 5

#### Tigecycline

[0210] 9-Aminomincycline (10.00 g) was added portion-wise to 60 mL of water at 0-5 °C. t-Butylglycine acid chloride hydrochloride (10.98 g) was added portion-wise keeping the temperature at 0-5 °C. After stirring for 40-60 min., 30% ammonium hydroxide was added dropwise to the reaction mixture while keeping the temperature at 0-5 °C to adjust pH to 7.2. To the solution was added 83 mL methanol followed by 60 mL methylene chloride. After stirring for 15 min., the phases were separated. The aqueous phase was extracted with 4 X 40mL methylene chloride adjusting pH to 7.2 before each extraction. To the combined organics was added 10 mL methanol, and the solution was dried over sodium sulfate. After filtering, the solution was concentrated to give a suspension (net weight 51g). The suspension was stirred at 5-10 °C for 1 h then filtered. The solid was washed with 2 X 10 mL cold methylene chloride, then dried to give 8.80 g of product (76.8% yield). Purity by HPLC area %: 98.4% and C-4 epimer 0.1%. MS(FAB): m/z 586 (M+H); 585 (M<sup>+</sup>).

### Example 6

#### N-t-Butylglycine Acid Chloride Hydrochloride

[0211] t-Butylamine (1.5 kg) was dissolved in 1.35 L of toluene. The mixture was heated to 45-50 °C, and 548 g of t-butybromoacetate is added over 1 h while maintaining the temperature at 50-60 °C. The mixture was heated at 75 °C for 3 h. The reaction mixture was then cooled to 12 -15 °C and stirred for 1 h. The solids were filtered off and washed with cold toluene. The solid which was t-butylamine hydrobromide was discarded. The filtrate was concentrated to ~ 800 mL by distilling off the solvent. The concentrate was cooled to 25 °C and 900 mL of 6N HCl was added to the mixture. After stirring for 3 h at 20 to 25 °C, the phases were separated. The organic phase was discarded and the aqueous phase was concentrated to a volume of 600 mL. Isopropanol (2.4 L) was added to the concentrate. The slurry was cooled to -12 to -9 °C and held for 0.5 h. The

product was collected by filtration, washed with cold isopropanol, then dried under vacuum at 40-50 °C to give 408 g of solid. Purity by NMR >95%. MS: m/z 187 (M+).

[0212] N-t-butylglycine hydrochloride (250 g) from the material prepared as described above was added to 1.3 L of toluene and 7.5 mL of DMF. Thionyl chloride (143 mL) was added and the slurry is heated at 80-85 °C for 3-4 h. The suspension was cooled to 20 °C and the solid was collected by filtration and washed with 2X250 mL of toluene. The solid was dried in vacuum at 40 °C to afford 260 g (82% yield) of product. Purity by HPLC area %: 98.2%

### Example 7

#### Tigecycline

[0213] 9-Aminomincycline•HCl (140.0 g) was added portion-wise to 840 mL of water at 0-4 °C. t-Butylglycine acid chloride hydrochloride (154 g) was added over 15 min with good stirring while maintaining the temperature at 0-4 °C. The solution was stirred for 1-3 h. The pH of the mixture was adjusted to 7.2±0.2 with 30% ammonium hydroxide while maintaining the temperature at 0-10 °C. Methanol (930 mL) and 840 mL of methylene chloride were added to the solution, which was stirred for 1 h at 20-25 °C. The phases were separated. The aqueous phase was extracted with 3X600 mL of methylene chloride, and the organic phases were combined, dried and concentrated to a volume of approximately 500 mL. The resulting suspension was cooled to 0-2 °C for 1 h. The solid was filtered and dried to give 120 g of product (75% yield). Purity by HPLC area %: 98%, C-4 epimer 0.1%. MS(FAB): m/z 586 (M+H); 585 (M+).

### Example 8

#### Pyrrolidinylacetic acid hydrochloride

[0214] Pyrrolidine (14.2 g) was dissolved in 40 mL of methyl t-butyl ether. The solution was cooled to 0 to -5 °C. Benzyl bromoacetate (22.9 g) was added dropwise with stirring. The thick white slurry was stirred for 0.5 h at 0-5 °C. The solid was filtered off and washed with methyl t-butyl ether. The filtrate was concentrated to give 21.3 g of pyrrolidinylbenzyl acetate. The benzyl ester (21.0 g) was dissolved in 200 mL of methanol and 4.0 g of 10% Pd/C catalyst (50% wet) was added. The solution was hydrogenated at 40 psi for 6 h. The catalyst was filtered off and washed with methanol. The filtrate was concentrated to give 11.8 g of pyrrolidinyl acetic acid as a colorless oil. 15.8 g pyrrolidinyl acetic acid was slurried in 15 mL of methyl-t-butyl ether. Acetonitrile (15 mL) was added and the suspension is cooled to 0-5 °C. Ethereal HCl (120 mL, 1.0 M) was added with stirring. The resulting white precipitate was filtered, washed with methyl t-butyl ether, and dried to give 15 g of pyrrolidinyl acetic acid hydrochloride. Purity by GC/MS area%: 98%. MS: m/z 129 (M+).

### Example 9

#### [4S-(4 $\alpha$ ,12 $\alpha$ )]-4,7-Bis(dimethylamino)-9-[(pyrrolidinyl)acetyl]amino]-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-octahydro-3,10,12,12a-tetrahydroxy-1,11-dioxo-2-naphthacene-carboxamide

[0215] Pyrrolidinylacetic acid (7.7 g) was suspended in 7 mL of acetonitrile. After cooling to 0-5 °C, 5.3 mL of thionyl chloride was added slowly with stirring. The suspension was heated to 55 °C. The dark solution was kept at 55 °C for 0.5 h and then cooled to room temperature to afford pyrrolidinylacetyl chloride hydrochloride. 9-Aminomincycline hydrochloride (5.0 g), prepared as described in Example 4 above, was suspended in 5.0 mL of water. The suspension was cooled to -15 °C. To this suspension was added dropwise the solution of pyrrolidinylacetyl chloride hydrochloride prepared as described above, keeping the temperature below 22 °C. The dark reaction mixture was stirred at 22-25 °C for 3

h. Water (2 mL) was added to the mixture, and the pH was adjusted to  $6.5 \pm 0.2$  with 30% ammonium hydroxide. The solution was extracted with 6X15 mL of  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . The organic extracts were pooled and concentrated at 40 °C. Anhydrous ethanol (10 mL) was added to the concentrate, and the slurry was stirred at 5-7 °C for 1 h. The solid was filtered and dried in vacuum at 40 °C to afford 3.5 g of product. Purity by HPLC area%: 98.7 %, C-4 epimer 0.4%. MS(FAB): m/z 586 (M+H); 585 (M<sup>+</sup>).

### Example 10

#### Tigecycline

[0216] 9-Aminomincycline (4.0 g) was added portion-wise to 10 mL of acetonitrile and 5 mL of DMPU at 10-15 °C. t-Butylglycine acid chloride hydrochloride (4.4 g) was added portion-wise keeping temperature at 10-15 °C. After stirring for 2 h, 10 mL MeOH and 17 mL of water was added slowly to the reaction mixture maintaining temperature between 10-17 °C. Ammonium hydroxide (30%) was added dropwise to the reaction mixture, keeping the temperature at 5-8 °C, to adjust pH to 7.2. To the solution was added 15 mL methylene chloride. After stirring for 15 min., the phases were separated. The aqueous phase was extracted with 2X20 mL of methylene chloride, adjusting pH to 7.2 before each extraction. To combined organics was added 700 mg of Norit CA-1 (charcoal) and 10 g sodium sulfate, then the mixture was filtered. The cake was washed with 2X20 mL of methylene chloride. The solution was concentrated and the resulting suspension was stirred at 5-8 °C for 16 h. After filtering, the solid was washed with 2 X 10 mL cold methylene chloride, then dried to give 2.3 g of product (50% yield). Purity by HPLC area %: 95.2%, C-4 epimer: 0.5%. MS(FAB): m/z 586 (M+H); 585 (M<sup>+</sup>).

### Examples 11-19

#### Tigecycline

[0217] Examples 11- 19 followed the procedure of Example 10 with the solvent modification as indicated below.

| Example | Solvent                         | Yield                         | Results <sup>1</sup>                                                  |
|---------|---------------------------------|-------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|
| 11      | DMPU                            | 50%                           | Purity: 95.2%, C-4 epimer: 0.5%, sm: 3.35%                            |
| 12      | DMPU-<br>H <sub>2</sub> O (1:1) | 48%                           | Purity: 98.1%, C-4 epimer: 0.5%, sm: 0.7%                             |
| 13      | DMPU-<br>MeCN                   | 60-72%<br>yield, 6 g<br>scale | required extensive workup                                             |
| 14      | THF                             | --                            | Reaction "does not go to completion."                                 |
| 15      | MeCN                            | --                            | "incomplete reaction"                                                 |
| 16      | CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> | --                            | "incomplete reaction"                                                 |
| 17      | THF:H <sub>2</sub> O<br>(6:1)   | --                            | Reaction was not successful                                           |
| 18      | NMP                             | --                            | Reaction "works well on small scale,"<br>"led to a complete reaction" |
| 19      | DMF <sup>2</sup>                | 58%                           | Unknown impurity: 1.5%                                                |

### Example 20

#### N-t-Butylglycine Acid Chloride Hydrochloride

[0218] To a 5-L multi-neck flask with a mechanical stirrer, thermocouple, condenser with a nitrogen line to a 30% (wt.) caustic scrubber, and a 250-mL pressure equalizing addition funnel was added the milled N-t-butylglycine hydrochloride (436 g, 2.60 moles, d(0.5) = 103  $\mu$ m), toluene (1,958 g, 2,263 mL), and N,N-dimethylformamide (13.6 g, 14.4 mL, 0.19 moles). Thionyl chloride (405 g, 248 mL, 3.40 moles) was added to the off-white slurry, using the 250-mL addition funnel over 33 min at 20 – 23 °C. The slurry was slowly heated to 80 °C over 1 hour, then stirred at 80 °C for 3 hours. After 3 hours the reaction was

<sup>1</sup> Purity assessed by HPLC area. sm = starting material 9-Aminomincylina.

<sup>2</sup> Reaction mixture was quenched with isopropanol-ethyl acetate, then partitioned between water and CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. The organic phase was concentrated, then diluted with toluene prior to isolation of the product.

complete by thin layer chromatography (< 2% starting material). The yellow-orange suspension was cooled to 20 °C over 32 min., then stirred at 15 – 20 °C for 32 min. The solid was collected by vacuum filtration on a 15-cm Büchner funnel using #42 Whatman paper. The cake was washed with three portions of toluene (272 g, 314 mL each wash) at 20 – 25 °C. The wet caked was dried with suction for 20 minutes under nitrogen protection. The product was then dried in an oven with a vacuum of 23 mm Hg and 38 °C for 21.2 hours to yield a loss on drying of 1.23%. Weight of t-butylaminoacetyl chloride HCl obtained = 462 g, GC strength = 91.0%, IR identification = positive. Yield from t-butylaminoacetic acid HCl = 96%. Yield corrected for strength of product and starting material = 87%.

### Example 21

#### N-t-Butylglycine Acid Chloride Hydrochloride

[0219] To a 5-L multi-neck flask with a mechanical stirrer, thermocouple, condenser with a nitrogen line to a 25% (wt.) caustic scrubber, and a 250-mL pressure equalizing addition funnel was added the milled N-t-butylglycine hydrochloride (450 g, 2.68 moles, d(0.5) = 664 µm), toluene (2,863 g, 3,310 mL), and N,N-dimethylformamide (15 g, 15 mL, 0.21 moles). Thionyl chloride (422 g, 259 mL, 3.54 moles) was added to the white slurry, using the 250-mL addition funnel over 19 min at 19 – 22 °C. The slurry was slowly heated to 79 °C over 7.1 hours, then stirred at 78 – 82 °C for 44 hours. The reaction was checked at 3 hours and found to be incomplete by thin layer chromatography (TLC). An additional 26 mL (42 g, 0.35 moles) of thionyl chloride was added. After a total of 27 hours, the reaction was still incomplete by TLC and an additional 26 mL (42 g, 0.35 moles) of thionyl chloride was added. After a total of 44 hours, at 79– 82 °C, the reaction was complete by TLC (< 4% starting t-butylaminoacetic acid HCl). The dark brown suspension was cooled to 25 °C over 17 min., then stirred at 21 – 25 °C for 37 min. The solid was collected by vacuum filtration on a 2-L coarse glass sintered funnel. The cake was washed with six portions of toluene (282 g, 325 mL each wash) at 20 – 25 °C. The wet caked was dried with suction for 16 minutes under nitrogen protection. The product was then dried in an oven with a vacuum of 23 mmHg and 38 °C for 26.1 hours to yield an loss on drying of 0.75%.

Weight of t-butylaminoacetyl chloride HCl obtained = 395 g, GC strength = 89.5%, (IR identification = positive. Yield from t-butylaminoacetic acid HCl = 79%. Yield corrected for strength of product and starting material = 71%.

### Example 22

#### Tigecycline

[0220] 9-Aminomincycline HCl (43.0 kg) was dissolved in 258 kg (6.0 parts water) for injection at 0 to 6 °C. N-t-Butylglycine acid chloride HCl (47.3 kg, 1.1 parts, 3.01 equivalents) was added to the batch solution slowly while maintaining the batch temperature at 0 to 6 °C. The reaction mixture was stirred for 1 h and determined to have 0.2% starting material (additional N-t-Butylglycine acid chloride HCl not required). The GAR-936 reaction mixture was then brought to pH 7.2 +/- 0.2 using 32 kg (0.7 parts) of ammonium hydroxide, 28%, and 2 kg reagent hydrochloric acid (to readjust overshoot). The initial pH equaled 0.42 and the final pH equaled 7.34. Methylene chloride (342 kg, 8 parts) and 148 kg (3.4 parts) methanol were added to the reaction mixture at 0 to 7 °C. Since the pH was 7.09, no adjustment was required. The batch was warmed to 19 to 25 °C. Methanol (83 kg, 1.9 parts) was added and the lower organic phase was split off. The product remaining in the aqueous phase was then extracted into the organic phase using 1 x 342 kg (8 parts) and 3 x 172 kg (4 parts) methylene chloride while maintaining pH at 7.2 +/- 0.2 with ammonium hydroxide, 28%. Methanol (49 kg, 1.14 parts) was added to the resulting methylene chloride/methanol solution, which was washed with 2 x 43 kg (1 part) water for injection before being dried with 43 kg (1 part) sodium sulfate. Three vacuum distillations were then performed to remove methanol with chases of 568 kg (13.2 parts) methylene chloride added prior to the second and third distillations. The residual level of methanol in the mother liquor was 0.21%. The batch was filtered, washed with 2 x 60 kg (1.4 parts) of pre-cooled (0 to 6 °C) methylene chloride. The resulting crude material was not dried, but isolated as a wet cake (72.5 kg, 38.2 kg dry weight as calculated from loss on drying), affording a 77% yield from 9-aminomincycline HCl. Wet cake analytical results: minocycline = 1.26%, single largest impurity = 0.37%, C-4 epimer = 0.50%.

### Example 23

#### Tigecycline

[0221] 9-Aminomincycline HCl (61.0 kg) was dissolved in 258 kg (6.0 parts water) for injection at 0 to 6 °C. N-t-Butylglycine acid chloride HCl (67.1 kg, 1.1 parts, 3.01 equivalents) was added to the batch solution slowly while maintaining the batch temperature at 0 to 6 °C. The reaction mixture was stirred for 3.5 h and determined to have 0.13% starting material (additional N-t-Butylglycine acid chloride HCl not required). The reaction mixture was then brought to pH 7.2 +/- 0.2 using 45 kg (0.7 parts) of ammonium hydroxide, 28%. The initial pH equaled 0.82 and the final pH equaled 7.07. Methylene chloride (485 kg, 8 parts) and 210 kg (3.4 parts) methanol were added to the reaction mixture at 0 to 6 °C. Since the pH was still in range (7.04), no adjustment was required. The batch was warmed to 19 to 25 °C. Methanol (118 kg, 1.9 parts) was added and the lower organic phase was split off. The product remaining in the aqueous phase was then extracted into the organic phase using 1 x 485 kg (8 parts) and 3 x 244 kg (4 parts) methylene chloride while maintaining the pH at 7.2 +/- 0.2 with ammonium hydroxide, 28%. Methanol (70 kg, 1.14 parts) were added to the resulting methylene chloride/methanol solution, which was then washed with 2 x 61 kg (1 part) water for injection before being dried with 61 kg (1 part) sodium sulfate. Three vacuum distillations were then performed to remove methanol with chases of 805 kg (13.2 parts) methylene chloride added prior to the second and third distillations. The residual level of methanol in the mother liquor was 0.05%. The batch was filtered and washed with 2 x 85 kg (1.4 parts) of pre-cooled (0 to 6 °C) methylene chloride. The resulting crude material was not dried, but isolated as a wet cake (103 kg, 53.4 kg dry weight as calculated from loss on drying), affording a 76% yield from 9-aminomincycline HCl.

99  
200609

## Comparative Example 24

### Tigecycline Monohydrochloride

#### *Example 24A: 9-chloroacetamidomincycline*

[0222] Methylene chloride (1.3 L) was cooled to 0-2 °C in a 3-L round-bottom flask fitted with a mechanical stirrer, a thermometer and a 1-L addition-funnel. Recrystallized 9-aminomincycline hydrochloride (400 g) was added portion-wise with stirring. Triethylamine (428 mL) was added over 10 min. while keeping the temperature between 0-2 °C. The reaction mixture was stirred for 10 min. and then cooled to -22 °C. A solution of 280 g chloroacetic anhydride in 540 ml methylene chloride was then added at such a rate that the temperature did not rise above 5 °C. An additional 132 ml of methylene chloride was used to rinse the addition funnel. The reaction mixture was assayed by HPLC 15 min after the start of anhydride addition. When the amount of starting material present was less than 2%, the reaction was quenched with 680 mL of 0.05M sodium bicarbonate solution. The mixture was stirred for 15 min, then transferred to a 5-L separatory funnel. The phases were allowed to separate. The methylene chloride phase was separated and washed with an additional 680 mL of 0.05M sodium bicarbonate solution. The washed methylene chloride solution was added dropwise into 17 L of a 10:1 mixture of n-heptane and isopropanol (15.4 L of n-heptane and 1.54 L of isopropanol). The slurry was stirred for 5 min. and then allowed to settle for 10 min. The supernatant was decanted off and the precipitate was filtered through a coarse-porosity fritted-funnel. The solid was washed with 2 L of 10:1 n-heptane:isopropanol. The solid was dried at 40°C under vacuum to afford 550 g of the crude product.

#### *Example 24B: Tigecycline*

[0223] Crude 9-chloroacetamidomincycline (100 g) was added at room temperature (25-28 °C) slowly with efficient stirring to 500 mL of t-butylamine in a 1-L two-necked round-bottom flask fitted with a stirrer and thermometer. Sodium iodide (10 g) was added and the reaction mixture was stirred at room temperature for 7.5 h. The reaction was monitored by HPLC and when <2% starting material remained, 100 ml of methanol was added and the solvent was stripped off on a rotary evaporator at 40°C. To the residue was added 420 mL of methanol and

680 mL of water. The solution was cooled to 0-2°C and adjusted to pH 7.2 with concentrated HCl (91 mL) to give a reaction mixture volume of 1300 mL. It was diluted to 6.5 L with water and the pH was adjusted to 4.0-4.2 with concentrated HCl (12 mL). Washed Amberchrom® (CG161cd) (860 g) was added to the solution and the mixture was stirred for 30 min., adjusting the pH to 4.0-4.2. The resin was filtered off and the spent aqueous solution was assayed by HPLC for product and stored at 4-8 °C. The resin was slurried in 4.8 L of 20% methanol in water (4 L methanol + 16 L water). The suspension was stirred for 15 min., adjusting pH 4.0-4.2. The resin was filtered off and the filtrate was assayed for product. The extraction of the resin was repeated 3 more times with 4.8 L of 20% methanol in water. All the resin extracts and the spent aqueous solution from above were pooled and the pH was adjusted to 7.0-7.2 with 30% ammonium hydroxide. The aqueous solution was extracted with 6X2.8 L of methylene chloride, adjusting the pH to 7.0-7.2 between extractions. The pooled methylene chloride extract was filtered through 250 g of anhydrous sodium sulfate, concentrated to 500 mL and cooled to 0-3 °C. After the product crystallized, the slurry was stirred for 1 h at 0-3 °C. The solids were filtered, washed with 2X 50 mL of cold methylene chloride and dried at 40 °C under vacuum to afford 26 g of solid.

*Example 24C: Tigecycline Monohydrochloride*

[0224] Tigecycline (49 g, 0.084 mole) was dissolved portion-wise in 500 mL of water for injection with stirring. The solution was filtered through a medium porosity funnel and washed with 420 mL of water for injection. The solution was cooled to 0-2 °C and 5.6 mL of concentrated HCl was added dropwise while maintaining the temperature between 0-2 °C. The initial pH was 8.0 and the final pH was 6.0. The solution was lyophilized by freezing the sample at -30 °C and lyophilizing at -15 °C. The shelf temperature was raised to 21 °C for 2 h. The resulting solid (49.6 g) was ground and stored at 4-5 °C. Elemental Analysis: C (52.92% theory, 51.75% found); H (6.73% theory, 6.75% found); N (10.65% theory, 10.32% found); Cl (5.4% theory, 5.5% found).

## Comparative Example 25

### Tigecycline Monohydrochloride

#### *Example 25A: 9-chloroacetamidomincycline*

[0225] Methylene chloride (325 mL) was cooled to -5 to 0 °C and 9-Aminomincycline hydrochloride (100 g) was added portion-wise over 10 min. Triethylamine (77.6 g) was added while maintaining the temperature at -10 to -5 °C. A solution of 97% chloroacetic anhydride (70 g) in methylene chloride (133 mL) was prepared by stirring at 20-25 °C and added to the reaction mixture of 45 min while maintaining the mixture temperature at -10 to -2 °C. The flask containing the chloroacetic anhydride solution was rinsed with 31 mL methylene chloride and the rinse added to the reaction mixture. After stirring for 30 min., the reaction was assayed by HPLC to determine if the reaction was complete. Aqueous sodium bicarbonate (185 mL, 0.05M) was added over 30 min while maintaining the reaction mixture temperature at 0 to 5 °C. After stirring for 10 min., the layers were separated and sodium sulfate (15 g) was added to the organic layer. The mixture was stirred for 15 min at 0 to 5 °C and filtered. The resulting cake was rinsed with methylene chloride (2 x 38 mL) and the combined filtrates were transferred into 4.19 L of 10:1 heptane:isopropanol over 20 min, followed by a 15 mL methylene chloride rinse of the filtrate flask. The resulting suspension was stirred for 15 min at 20 to 25 °C, then filtered. The cake was rinsed with 680 mL of 10:1 heptane:isopropanol and dried for 24 h at 37 to 40 °C (5-10 mm Hg). Purity by HPLC area%: 78.1.

#### *Example 25B: Tigecycline*

[0226] 9-Chloroacetamidomincycline (100 g) was added with vigorous stirring to 483 mL of t-butylamine at 0-10 °C in a 2-L multi-necked round-bottom flask fitted with a stirrer, thermometer and condenser. Sodium iodide (16 g) was added and the reaction mixture was stirred at 33-38 °C for 4 h. The reaction mixture was assayed by HPLC for completion, then cooled to 5-10 °C. Methanol (300 mL) was added over 10 min., then the reaction solution was concentrated by distillation (10-17 °C, 68 mm Hg) to 350 mL. A second portion of methanol (600

mL) was added to the concentrate, and the mixture was concentrated by distillation to 350 mL. Methanol (46 mL) and cold water (565 mL) were added while maintaining the reaction temperature below 30 °C. The solution was cooled to 0-5 °C and the pH adjusted to 4.0 with 100 mL of HCl 20 °Be. The solution was transferred to a 5-L multi-neck flask with a 500 mL water rinse, then diluted with 1 L of water. After stirring for 1 h at 0-5 °C, washed Amberchrom®(CG161) resin<sup>3</sup> was added and the resulting suspension was stirred for 30 min. at 20-25 °C. The suspension was filtered and the resulting wet cake was added to 340 mL of a 5:1 water:methanol solution. The filtrate was set aside. After stirring for 30 min. at 20-25 °C, the suspension was filtered and the resulting wet cake was added to a second 340 mL portion of a 5:1 water:methanol solution. This second filtrate was set aside. This suspension was filtered and the resulting wet cake was added to a third 340 mL portion of a 5:1 water:methanol solution. After filtering, the third filtrate was combined with the first and second filtrates and cooled to 0-5 °C. The pH was adjusted to 7.0 with 11 mL of 28% ammonium hydroxide. The solution was stirred at 0-5 °C for 16 h, adjusting the pH to 7.0 as necessary, and at 22-25 °C for 1 h, adjusting the pH to 7.0 as necessary. The aqueous solution was extracted with methylene chloride (5 X 980 mL), adjusting the pH to 7.0 for each extraction. The combined organic phases were transferred to a separatory funnel and the aqueous layer was separated. The organic layer was combined with 100 g sodium sulfate and stirred for 1 h at 20-25 °C. The suspension was filtered through a celite pad and the cake was rinsed with 250 mL of methylene chloride. The filtrate was concentrated by distillation (-5 to 5 °C, 150 mm Hg) to 150 mL, then cooled to 0-5 °C for 1 h. The resulting suspension was filtered and the cake was washed with 0-5 °C methylene chloride (2 x 30 mL). The wet cake was stirred in methylene chloride (335 mL) and methanol (37 mL) at 26-32 °C until a solution was obtained. The solution was filtered through celite, rinsing the celite

<sup>3</sup> The washed Amberchrom®(CG161M) resin was prepared by adding 183 g of filtered, homogenized Amberchrom®(CG161M) resin to 340 mL of a 5:1 water:methanol solution. After stirring for 1 h at 22-25 °C, the suspension was filtered to give a wet cake that was dried by suction. The wet cake was stirred in 340 mL of a 5:1 water:methanol solution for 1 hr at 20 °C, then filtered. The process was repeated once more to afford the washed resin.

103  
00103

with methylene chloride (2 x 15 mL), and concentrated by distillation (-5 to 5 °C, 150 mm Hg) to 54 mL. The concentration procedure was repeated twice, first adding 335 mL methylene chloride and reducing the volume to 55-70 mL, then adding 254 mL methylene chloride and reducing the volume to 90-105 mL. The resulting suspension was stirred for 1 h at 0-5 °C, then filtered and washed with 10 °C methylene chloride (2 x 25 mL). The solid was dried at 35-40 °C for 16 h, then at 45-50 °C for 27 h. Purity by HPLC area%: 97.7 %, C-4 epimer 1.23%.

## PURIFICATION

### Example 1

#### Tigecycline

[0227] A mixture of crude tigecycline (110.0 g) and methyl acetate (1.65 L) was stirred and heated to 30-35 °C and methanol (550 mL) was added over 15 min. After holding at 30-35 °C, the warm solution was filtered over infusorial earth (36 g) and the cake was washed with methyl acetate (2 x 106 g). The filtrate was concentrated by distillation (20 °C, 150 mm Hg) to 550 mL. Methyl acetate (1.1 L) was added and the resulting suspension was concentrated by distillation (20 °C, 150 mm Hg) to 550 mL. This step was repeated, then the concentrate was cooled to 0-4 °C for 1 h. The resulting solid was collected by filtration and washed with 0-5 °C methyl acetate (2 x 150 mL). The solid was dried under vacuum (65-70 °C, 10 mm Hg) for 100 h to afford 98.0 g (89.1% yield) of the desired product. Purity by HPLC area %: 98.8% and C-4 epimer 0.55%.

### Example 2

#### Tigecycline

[0228] 9-Aminomincycline•HCl (140.0 g) was added portion-wise to 840 mL of water at 0-4 °C. t-Butylglycine acid chloride hydrochloride (154 g) was added over 15 min with good stirring while maintaining the temperature at 0-4 °C. The solution was stirred for 1-3 h. The pH of the mixture was adjusted to 7.2±0.2 with

30% ammonium hydroxide while maintaining the temperature at 0-10 °C.

Methanol (930 mL) and 840 mL of methylene chloride were added to the solution, which was stirred for 1 h at 20-25 °C. The phases were separated. The aqueous phase was extracted with 3X600 mL of methylene chloride, and the organic phases were combined, dried and concentrated to a volume of approximately 500 mL. The resulting suspension was cooled to 0-2 °C for 1 h. The solid was filtered and dried to give 120 g of product (75% yield). Purity by HPLC area %: 98%, C-4 epimer 0.1%. MS(FAB): m/z 586 (M+H); 585 (M<sup>+</sup>).

### Example 3

#### Tigecycline

[0229] Tigecycline (15.00 g) prepared as described in Example 2 was added to 113 mL of acetone and 113 mL of methanol. The suspension was stirred at 20-25 °C for 1 h, then cooled to 0-2 °C. After stirring for 1 h, the suspension was filtered and washed to give 12.55 g of product (83.7% yield). Purity by HPLC area % >99 %, C-4 epimer 0.4%.

### Example 4

#### Tigecycline

[0230] Tigecycline (105 g) prepared as described in Example 2 was added to 800 mL of acetone and 800 mL of methanol. The suspension was stirred and heated to 30-35 °C for 15 min, then cooled to 20-25 °C. After holding at 20-25 °C for 1 h, the suspension was cooled to 0-4 °C and held for 1 h. The solid was filtered, washed and dried to give 83 g of product (79% yield). Purity by HPLC area %: >99 %, C-4 epimer: 0.4%.

### Example 5

#### Tigecycline

[0231] To a 1-L multi-necked flask, equipped with a mechanical stirrer and nitrogen protection, was added 94.3 g of wet crude tigecycline,<sup>4</sup> methanol (305 g, 388 mL), and acetone (291 g, 368 mL). The mixture was stirred at 16 – 23 °C for 4 hours. The slurry was filtered on a 9-cm Büchner funnel with #1 Whatman paper. The wet cake was washed with methanol (87 g, 110 mL) at 20 – 25 °C. The wet cake was dried with suction and nitrogen protection for 0.1 h. The wet cake (75.3 g) was transferred back to the 1-L multi-necked flask and a solution of methanol (233 g, 295 mL) and acetone (244 g, 309 mL) was added. The slurry was stirred at 15 – 20 °C for 5.5 hours. The slurry was filtered on a 9-cm Büchner funnel with #1 Whatman paper. The wet cake was washed with methanol (70 g, 88 mL) at 18 – 24 °C. The wet cake was dried with suction and nitrogen protection for 0.1 h. The wet cake (59.0 g) was transferred back to the 1-L multi-necked flask and a solution of methanol (195 g, 247 mL) and acetone (187 g, 236 mL) was added. The slurry was stirred at 18 – 24 °C for 3 hours. The slurry was filtered on a 9-cm Büchner funnel with #1 Whatman paper. The wet cake was washed with methanol (55 g, 70 mL) at 20 – 25 °C. The wet cake was dried with suction and nitrogen protection for 0.1 h. The wet cake (48.9 g) was sampled for high pressure liquid chromatography (HPLC) analysis (total impurities = 0.62%, minocycline = 0.17%, C-4 epimer = 0.35%, largest other single impurity = 0.05%).

[0232] The wet cake (48.9 g) was transferred to a 2-L multi-neck flask with a vacuum distillation set up. To the wet cake was added a premixed solution of methanol (90 g, 114 mL) and dichloromethane (1,023 g, 772 mL). The slurry was stirred at 15 – 20 °C to obtain a red solution. The solution was distilled to 160 mL at 13 – 17 °C with a vacuum of 330 mmHg over 0.8 h to yield an orange slurry. To the 2-L flask was added dichloromethane (818 g, 617 mL) and the slurry was

<sup>4</sup> Crude tigecycline was prepared from minocycline•HCl obtained from the supplier Interchem.

redistilled to 183 mL at 6 – 13 °C with a vacuum of 817 mmHg over 0.7 h.

Dichloromethane (635 g, 479 mL) was added and the slurry redistilled to 183 mL at 6 – 7 °C with a vacuum of 817 mmHg over 0.6 hours. The resulting orange slurry was cooled to 0 – 5 °C and held at 0 – 5 °C, with stirring, for 2 hours. The slurry was filtered on a 7-cm Büchner funnel with #1 Whatman paper. The wet cake was washed with two 69 g (52 mL) portions of dichloromethane at 0 °C. The wet cake was dried with suction, under nitrogen protection, for 5 min. A sample of the wet cake (48.7 g) was submitted for HPLC analysis (total impurities = 0.49%, minocycline = 0.12%, C-4 epimer = 0.32%, other impurities = 0%.) The wet cake was then dried at 25 °C with a vacuum of < 10 mmHg for 57.5 hours to a dichloromethane level of 2.2%, giving 32.3 g of tigecycline (34.2% yield).

[0233] This procedure was followed using crude Tigecycline that had been prepared from Minocycline•HCl obtained from suppliers Hovione and Nippon Kayaku. A comparison of the impurities present in the Tigecycline obtained from the above process using each source of Minocycline•HCl starting material is given in Tables 1 and 2. These tables indicate that the process provides a good yield of Tigecycline with a low level of impurities.

TABLE 1

| Minocycline•HCl source | Tigecycline processing stage | Total Impurities in final Tigecycline (%) | Recovered Minocycline•HCl (%) | C-4 epimer in final Tigecycline (%) |
|------------------------|------------------------------|-------------------------------------------|-------------------------------|-------------------------------------|
| Nippon Kayaku crude    | crude                        | 0.71                                      | 0.33                          | 0.26                                |
| Nippon Kayaku purified | purified                     | 0.26                                      | 0.13                          | 0.13                                |
| Interchem crude        | crude                        | 0.66                                      | 0.17                          | 0.29                                |
| Interchem              | purified                     | 0.38                                      | 0.10                          | 0.15                                |

109  
111-117

| Minocycline•HCl<br>source | Tigecycline<br>processing<br>stage | Total<br>Impurities in<br>final<br>Tigecycline<br>(%) | Recovered<br>Mino-<br>cycline•HCl<br>(%) | C-4 epimer<br>in final<br>Tigecycline<br>(%) |
|---------------------------|------------------------------------|-------------------------------------------------------|------------------------------------------|----------------------------------------------|
| purified                  |                                    |                                                       |                                          |                                              |
| Hovione crude             | crude                              | 0.64                                                  | 0.18                                     | 0.32                                         |
| Hovione purified          | purified                           | 0.39                                                  | 0.13                                     | 0.14                                         |

TABLE 2

| Test                              | Nippon Kayaku    | Interchem        | Hovione       |
|-----------------------------------|------------------|------------------|---------------|
| Description                       | Orange powder    | Orange powder    | Orange powder |
| Yield (g)                         | 28.5             | 32.3             | 36.4          |
| Strength (%) <sup>1</sup>         | 100              | 99.6             | 99.6          |
| Total impurities (%) <sup>2</sup> | 0.13             | 0.23             | 0.25          |
| LSI (%) [RRT] <sup>3</sup>        | brl <sup>4</sup> | 0.13 [0.64]      | 0.07 [0.67]   |
| Minocycline (%)                   | 0.13             | 0.10             | 0.13          |
| Epimer (%)                        | 0.13             | 0.15             | 0.14          |
| Dichloromethane (%)               | 1.3              | 2.2              | 2.1           |
| Methanol (%)                      | 0.001            | 0.003            | 0.002         |
| Acetone (%)                       | 0.001            | brl <sup>5</sup> | brl           |
| Heptane (%)                       | 0.001            | brl <sup>6</sup> | brl           |
| Isopropyl alcohol (%)             | 0.002            | brl <sup>7</sup> | brl           |
| Toluene (ppm)                     | brl <sup>8</sup> | brl              | brl           |
| N,N-Dimethyl-formamide (ppm)      | brl <sup>9</sup> | brl              | brl           |

|                                              |          |          |          |
|----------------------------------------------|----------|----------|----------|
| Water (KF, %)                                | 1.32     | 0.72     | 0.51     |
| Residue on ignition (%)                      | 0.039    | 0.005    | 0.014    |
| IR                                           | Positive | Positive | Positive |
| Specific rotation <sup>1</sup> (°)           | -219.4   | -213.4   | -218.7   |
| Crystallinity                                | Conforms | Conforms | Conforms |
| Yield (%)                                    | 21       | 26       | 24       |
| Yield (corrected, %) <sup>10</sup>           | 24       | 30       | 27       |
| Yield from Mino (%)                          | 10       | 12       | 13       |
| Yield from Mino (corrected, %) <sup>10</sup> | 11       | 13       | 14       |

1. On an anhydrous basis, solvent free. 2. Excluding epimer. 3. Largest single impurity (LSI) excluding C-4 epimer and Minocycline. Relative retention time (RRT) relative to GAR-936. 4. brl: below reporting limit, 0.05% for HPLC. 5. brl of 0.0005%. 6. brl of 0.0003%. 7. brl of 0.0030% (single sample). 8. brl of 2 ppm. 9. brl of 63 ppm. 10. Corrected for strength of starting material and product.

### Example 6

#### Tigecycline

[0234] Crude Tigecycline wet cake (72.5 kg, 38.2 kg dry weight<sup>6</sup>) was stirred and slurried in 191 kg (5 parts) acetone and 191 kg (5 parts) methanol. The slurry was then warmed to 30 to 36 °C, immediately cooled to 19 to 25 °C, and held at 19 to 25 °C for two hours. The slurry was then cooled to 0 to 6 °C, and held at 0 to 6 °C for 1 hour. After filtering and washing with 2 x 34 kg (0.9 parts) acetone/methanol (1:1), the wet cake was then tested for minocycline (0.23%), 9-aminomincycline (0%), and for the largest single impurity other than

<sup>6</sup> Dry weight calculated from loss on drying data.

the C-4 epimer (0.09%). The C-4 epimer content was 1.12%. Based on the analytical data, an additional reslurry was not performed. To the wet cake was added 440 kg (11.5 parts) of methylene chloride and 39.3 kg (1.0 parts) methanol and the mixture was heated to 30 to 36 °C to dissolve. The batch solution was filtered through 0.3-micron pyrogen reducing and 0.2-micron clarifying filters. Three vacuum distillations were then performed to remove methanol, with methylene chloride chases (440 kg and 339 kg, respectively) before the second and third distillations. The residual methanol level was 0.3%. The batch was cooled to 0 to 6 °C and stirred for 1 hour. The batch was filtered, washed with 2 x 42.1 kg (1.1 parts) of pre-cooled (-13 to -7 °C) methylene chloride and dried at no more than 60 °C to a loss on drying of <2.5%. The material was milled to give 22.3 kg of Tigecycline (58% yield). Purity by HPLC area %: 98.2%, C-4 epimer: 1.55%, Minocycline 0.1%, 9-aminominocycline 0%, single largest other impurity = 0.08%.

### Example 7

#### Tigecycline

[0235] Crude Tigecycline wet cake (103.5 kg, 53.4 kg dry weight<sup>6</sup>) was stirred and slurried in 191 kg (5.1 parts) acetone and 191 kg (5.1 parts) methanol. The slurry was then warmed to 30 to 36 °C, immediately cooled to 19 to 25 °C, and held at 19 to 25 °C for two hours. The slurry was then cooled to 0 to 6 °C, and held at 0 to 6 °C for 1 hour. After filtering and washing with 2 x 34 kg (0.9 parts) acetone/methanol (1:1), the wet cake was then tested for minocycline (0.12%), 9-aminominocycline (0%), and for largest single impurity other than C-4 epimer (0.13%). The C-4 epimer content was 0.37%. Based on analytical data, an additional reslurry was not performed. To the wet cake was added 440 kg (11.7 parts) of methylene chloride and 55.7 kg (1.0 parts) methanol and the mixture was heated to 30 to 36 °C to dissolve. The batch solution was filtered through 0.3-micron pyrogen reducing and 0.2-micron clarifying filters. Three

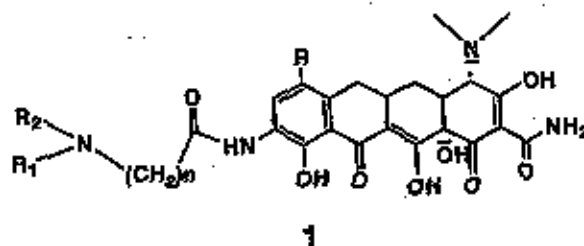
<sup>6</sup> Dry weight calculated from loss on drying data.

vacuum distillations were then performed to remove methanol, with methylene chloride chases (624 kg and 481 kg, respectively) before the second and third distillations. The residual methanol level was 1.07%. The batch was cooled to 0 to 6 °C and stirred for 1 hour. The batch was filtered, washed with 3 x 59.7 kg (1.1 parts each) of pre-cooled (-13 to -7 °C) methylene chloride and dried at no more than 60 °C to a loss on drying of <2.5%. The material was milled to give 31.7 kg of Tigecycline as a first crop. A second crop consisting of residual product in the crystallizer provided an additional 2.5 kg. Both crops represent a 64% yield from crude Tigecycline.

[0236] While the invention has been described by discussion of embodiments of the invention and non-limiting examples thereof, one of ordinary skill in the art may, upon reading the specification and claims, envision other embodiments and variations which are also within the intended scope of the invention and therefore the scope of the invention shall only be construed and defined by the scope of the appended claims.

WHAT IS CLAIMED IS:

1. A method of preparing at least one compound of formula 1,

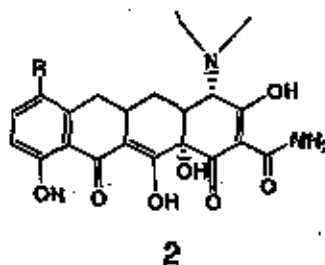


or a pharmaceutically acceptable salt thereof,

wherein  $R_1$  and  $R_2$  are each independently chosen from hydrogen, straight and branched chain ( $C_1-C_8$ )alkyl, and cycloalkyl, or  $R_1$  and  $R_2$ , together with N, form a heterocycle;  $R$  is  $-NR_3R_4$ , where  $R_3$  and  $R_4$  are each independently chosen from hydrogen, and straight and branched chain ( $C_1-C_4$ )alkyl; and  $n$  ranges from 1-4,

comprising:

- (a) reacting at least one nitrating agent with at least one compound of formula 2,



or a salt thereof, to produce a reaction mixture comprising an intermediate;  
and

- (b) further reacting the intermediate to form the at least one compound of formula 1,

wherein the intermediate is not isolated from the reaction mixture.

2. The method according to claim 1, wherein  $R_1$  is hydrogen,  $R_2$  is t-butyl,  $R_3$  is methyl,  $R_4$  is methyl, and  $n$  is 1.

3. The method according to claim 2, wherein the at least one compound of formula 1 is tigecycline or tigecycline HCl.

4. The method according to one of claims 1 to 3, wherein the at least one nitrating agent is chosen from nitrate salts and nitric acid.

5. The method according to claim 4, wherein the at least one nitrating agent is chosen from nitric acid.

6. The method according to claim 5, wherein the nitric acid has a concentration of at least 80%.

7. The method according to any one of claims 1 to 6, wherein the at least one nitrating agent is present in a molar excess relative to the at least one compound of formula 2.

8. The method according to claim 7, wherein the molar excess is at least 1.05 equivalents.

9. The method according to any one of claims 1 to 8, wherein the reacting in (a) is in the presence of an acid.

10. The method according to claim 9, wherein the acid is sulfuric acid.

11. The method according to any one of claims 1 to 10, wherein the reacting in (a) is at a temperature ranging from 5 to 15°C.

12. The method according to any one of claims 1 to 11, wherein the at least one compound of formula 2 is chosen from a salt.

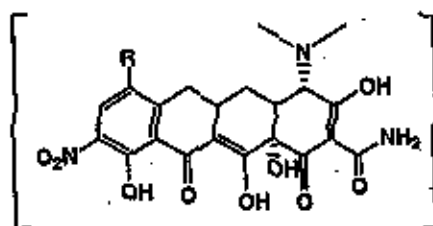
13. The method according to claim 12, wherein the salt of the at least one compound of formula 2 is chosen from hydrochloride, hydrobromide, hydroiodide, phosphoric, nitric, sulfuric, acetic, benzoic, citric, cystein, fumaric, glycolic, maleic, succinic, tartaric, sulfate, and chlorobenzenesulfonate salts.

14. The method according to claim 12, wherein the salt of the at least one compound of formula 2 is chosen from alkylsulfonic and arylsulfonic salts.

15. The method according to any one of claims 1 to 14, wherein the intermediate is a salt.

16. The method according to claim 15, wherein the intermediate is a sulfate salt.

17. The method according to any one of claims 1 to 16, wherein the intermediate is at least one compound of formula 3,



3

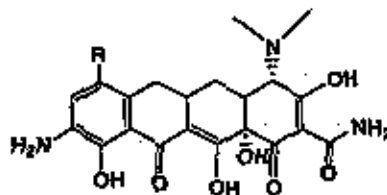
or a salt thereof.

18. The method according to claim 17, wherein the at least one compound of formula 3 is present in an amount of at least 80% relative to the total amount of organic components, as determined by high performance liquid chromatography.

19. The method according to claim 17, wherein the reaction mixture includes the C<sub>4</sub>-epimer of formula 3 in an amount less than 10%, as determined by high performance liquid chromatography.

20. The method according to any one of claims 1 to 19, wherein the further reacting in (b) comprises *reducing the intermediate*.

21. The method according to claim 20, wherein the reducing forms at least one compound of formula 4,



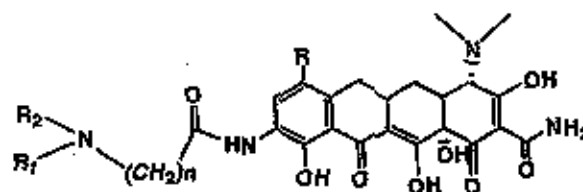
4

or a salt thereof.

22. The method according to claim 20, further comprising acylating the reduced intermediate.

23. The method of any one of claims 1 to 22, wherein the reacting in (a) comprises providing the at least one compound of formula 2 in an amount of at least 1 gram.

24. A method of preparing at least one compound of formula 1,



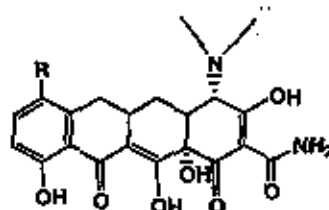
1

or a pharmaceutically acceptable salt thereof,

wherein  $R_1$  is hydrogen,  $R_2$  is t-butyl,  $R$  is  $-NR_3R_4$  where  $R_3$  is methyl and  $R_4$  is methyl, and  $n$  is 1,

comprising:

(a) reacting at least one nitrating agent with at least one compound of formula 2,



2

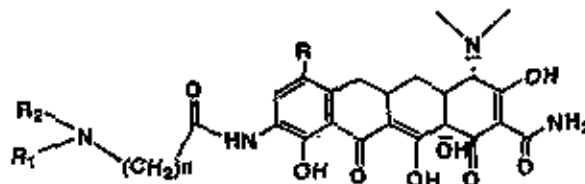
or a salt thereof, to produce a reaction mixture comprising an intermediate; and

(b) further reacting the intermediate to form the at least one compound of formula 1,

wherein the intermediate is not isolated from the reaction mixture.

25. The method according to claim 24, wherein the at least one compound of formula 1 is tigecycline or tigecycline HCl.

26. A method of preparing at least one compound of formula 1,



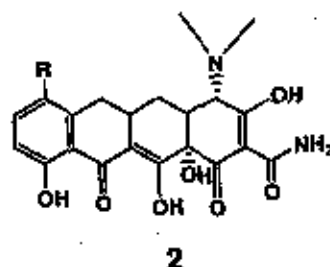
1

or a pharmaceutically acceptable salt thereof,

wherein  $R_1$  and  $R_2$  are each independently chosen from hydrogen, straight and branched chain ( $C_1$ - $C_6$ )alkyl, and cycloalkyl, or  $R_1$  and  $R_2$ , together with N, form a heterocycle;  $R$  is  $-NR_3R_4$ , where  $R_3$  and  $R_4$  are each independently chosen from hydrogen, and straight and branched chain ( $C_1$ - $C_4$ )alkyl; and  $n$  ranges from 1-4,

comprising:

- (a) reacting at least one nitrating agent with at least one compound of formula 2,



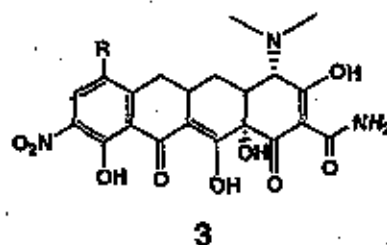
or a salt thereof, to produce a slurry; and

- (b) further reacting the slurry to form the at least one compound of formula 1.

27. The method according to claim 26, wherein  $R_1$  is hydrogen,  $R_2$  is *t*-butyl,  $R$  is  $-NR_3R_4$  where  $R_3$  is methyl and  $R_4$  is methyl, and  $n$  is 1.

28. The method according to claim 26, wherein the at least one compound of formula 1 is tigecycline or tigecycline HCl.

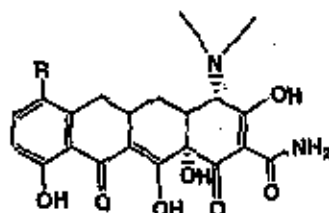
29. A method of preparing at least one compound of formula 3 or a salt thereof,



wherein  $R$  is  $-NR_3R_4$ , where  $R_3$  and  $R_4$  are each independently chosen from hydrogen, and straight and branched chain ( $C_1$ - $C_4$ )alkyl,

comprising:

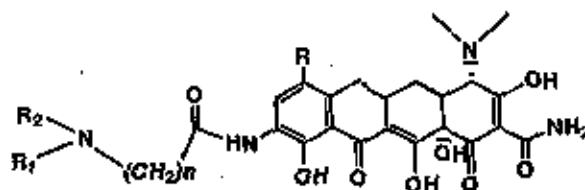
reacting at least one nitrating agent with at least one compound of formula 2 or a salt thereof,



2

wherein the reacting is performed at a temperature ranging from 5 to 15°C.

30. A method of preparing least one compound of formula 1,



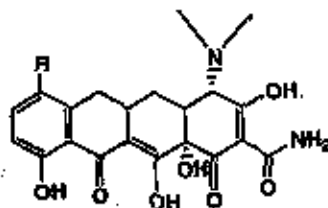
1

or a pharmaceutically acceptable salt thereof,

wherein  $R_1$  and  $R_2$  are each independently chosen from hydrogen, straight and branched chain ( $C_1$ - $C_6$ )alkyl, and cycloalkyl, or  $R_1$  and  $R_2$ , together with N, form a heterocycle; R is  $-NR_3R_4$ , where  $R_3$  and  $R_4$  are each independently chosen from hydrogen, and straight and branched chain ( $C_1$ - $C_4$ )alkyl; and n ranges from 1-4,

comprising:

(a) reacting at least one nitrating agent with at least one compound of formula 2 or a salt thereof to produce a reaction mixture comprising an intermediate; and



2

(b) further reacting the intermediate to form the at least one compound of formula 1

wherein the reacting in (a) is performed at a temperature ranging from 5 to 15°C.

31. The method according to claim 30, wherein  $R_1$  is hydrogen,  $R_2$  is t-butyl,  $R_3$  is methyl,  $R_4$  is methyl, and  $n$  is 1.

32. A compound or a salt thereof prepared by the method according to any one of claims 1 to 31.

33. The compound according to claim 32, wherein  $R_1$  is hydrogen,  $R_2$  is t-butyl,  $R_3$  is methyl,  $R_4$  is methyl, and  $n$  is 1.

34. The compound according to claim 33, wherein the at least one compound of formula 1 is tigecycline or tigecycline HCl.

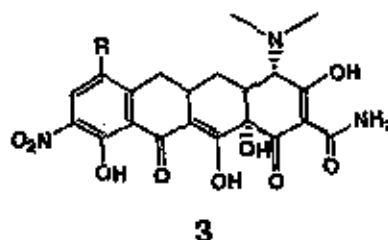
35. A composition comprising a compound or a salt thereof prepared by the method according to any one of claims 1 to 31.

36. The composition according to claim 35, wherein  $R_1$  is hydrogen,  $R_2$  is t-butyl,  $R_3$  is methyl,  $R_4$  is methyl, and  $n$  is 1.

37. The composition according to claim 36, wherein the at least one compound of formula 1 is tigecycline or tigecycline HCl.

38. The composition according to claim 35, further comprising at least one pharmaceutically acceptable carrier.

39. A composition comprising:  
at least one compound of formula 3,

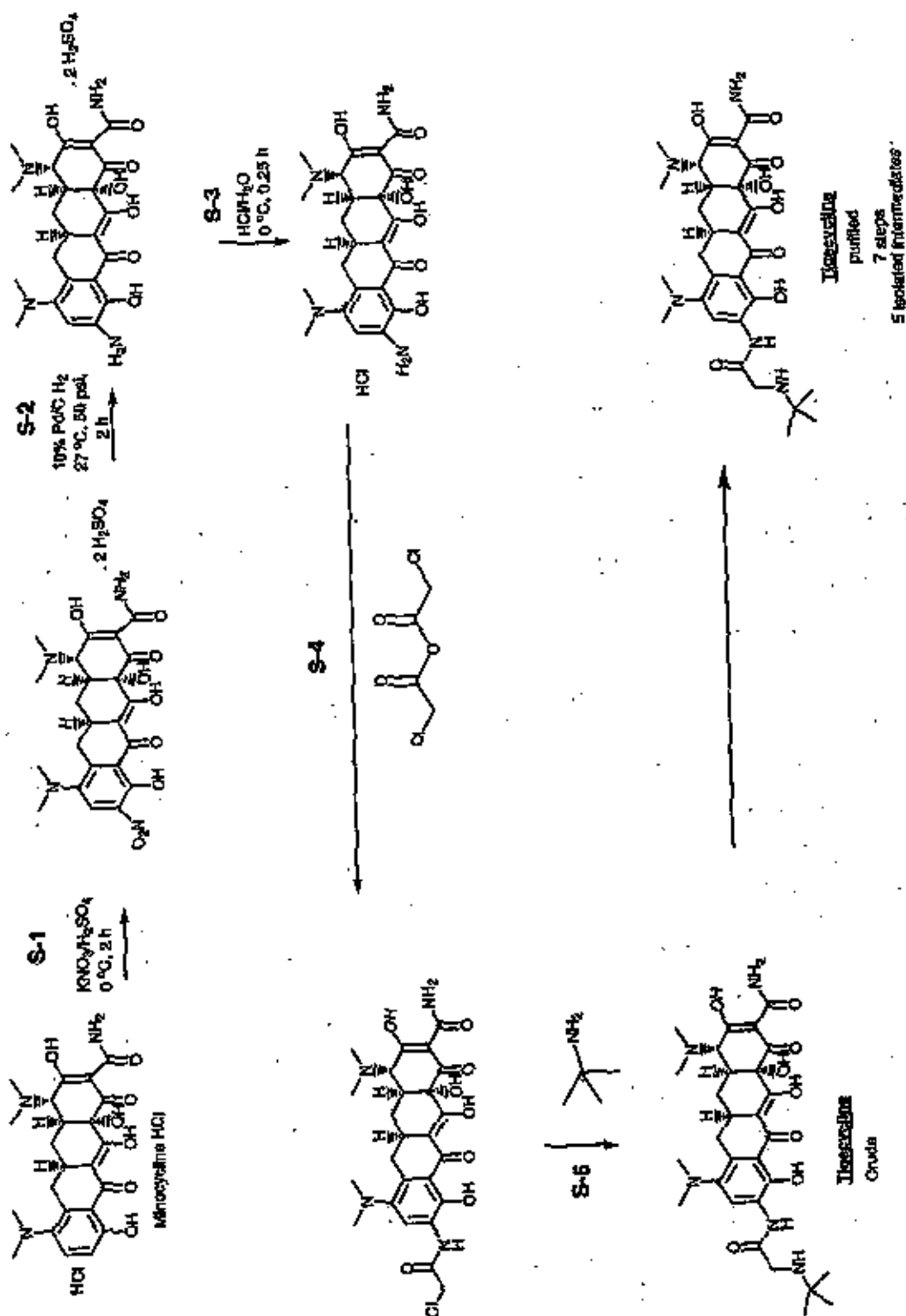


or a salt thereof,

wherein  $R$  is  $-NR_3R_4$ , where  $R_3$  and  $R_4$  are each independently chosen from hydrogen, and straight and branched chain ( $C_1$ - $C_4$ )alkyl,

wherein a  $C_4$ -epimer of formula 3 is present in an amount less than 10%, as determined by high performance liquid chromatography.

40. The composition according to claim 39, wherein  $R_1$  is hydrogen,  $R_2$  is t-butyl,  $R$  is  $-NR_3R_4$  where  $R_3$  is methyl and  $R_4$  is methyl, and  $n$  is 1.



**Fig. 1**

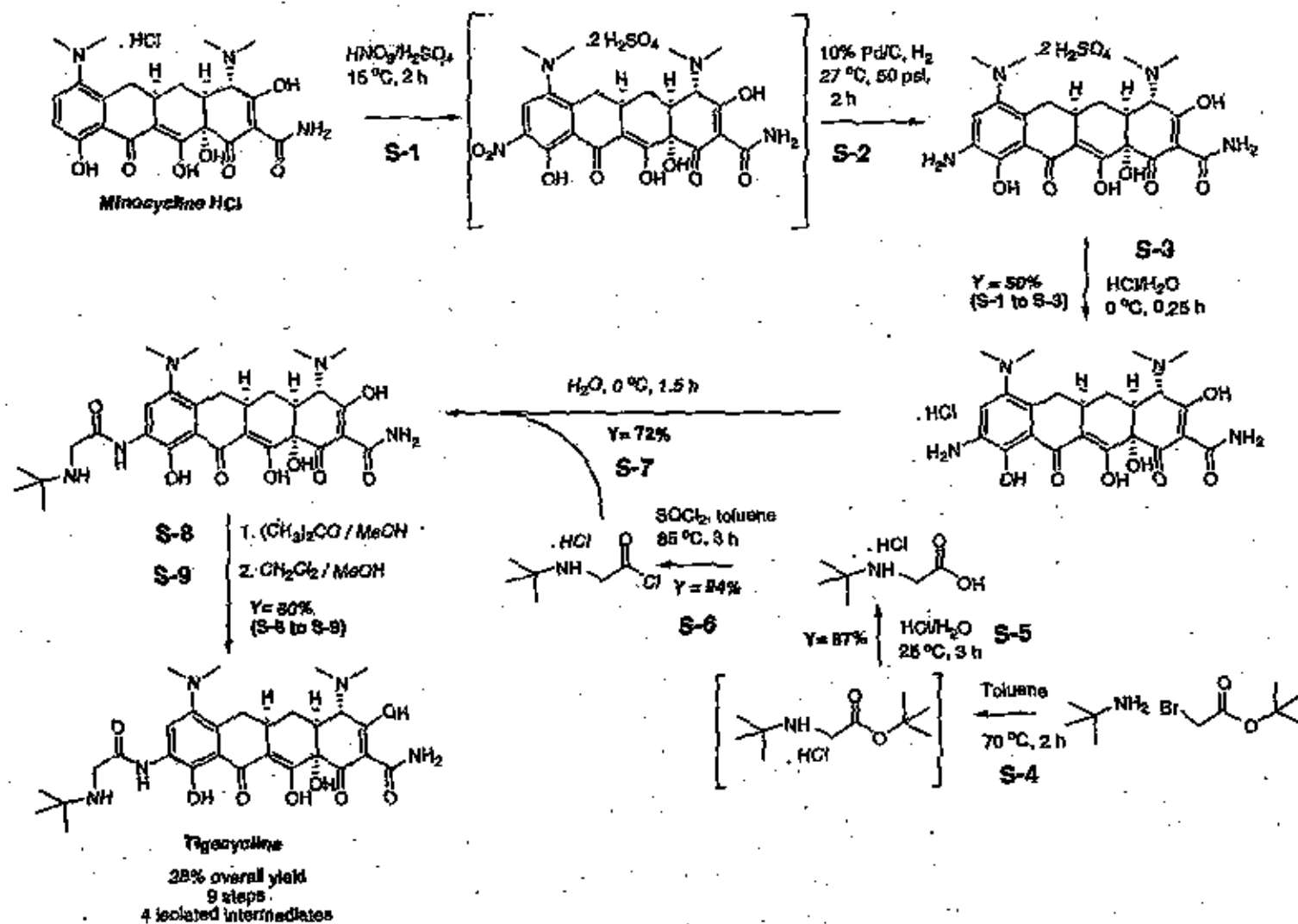


Fig. 2

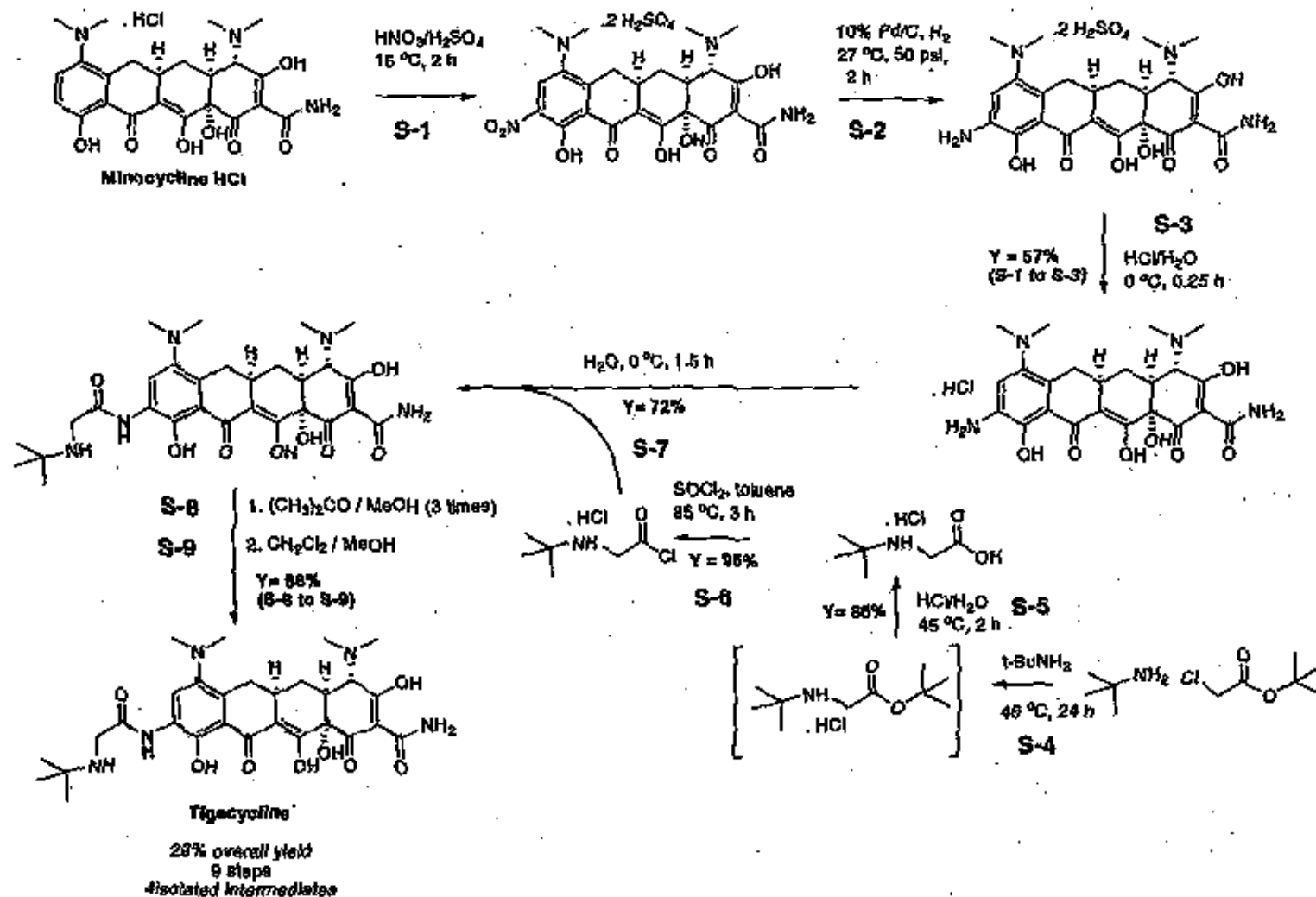
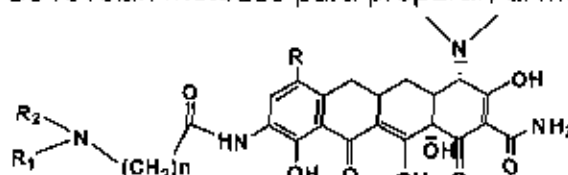


Fig. 3

### TIGECICLINA Y MÉTODOS PARA PREPARAR 9-NITROMINOCICLINA

La presente solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud Provisional de EE.UU. N 60/685291, presentada el 27 de mayo de 2005, cuyo contenido está incorporado aquí a modo de referencia.

Se revelan métodos para preparar, al menos, un compuesto de fórmula 1,

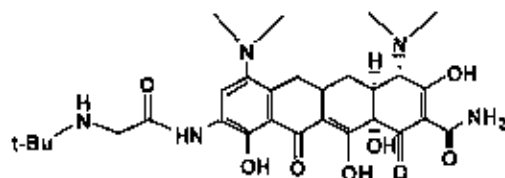


1

o una de sus sales aceptables para uso farmacéutico,

donde  $R_1$  y  $R_2$  se seleccionan, cada uno en forma independiente, de hidrógeno, alquilo ( $C_1$ - $C_8$ ) de cadena lineal y ramificada y cicloalquilo, o  $R_1$  y  $R_2$ , junto con N, forman un heterociclo; R es  $-NR_3R_4$ , donde  $R_3$  y  $R_4$  se seleccionan, cada uno en forma independiente, de hidrógeno, alquilo ( $C_1$ - $C_4$ ) de cadena lineal o ramificada; y n oscila entre 1-4.

En una realización,  $R_1$  es hidrógeno,  $R_2$  es t-butilo, R es  $-NR_3R_4$  donde  $R_3$  es metilo y  $R_4$  es metilo y n es 1, por ejemplo, tigeciclina. Tigeciclina, (9-(t-butilglicilamido)-minociclina, TBA-MINO), (4S,4aS,5aR,12aS)-9-[2-(ter-butilamino)acetamido]-4,7-bis(dimetilamino)-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-octahidro-3,10,12,12a-tetrahidroxi-1,11-dioxo-2-naftacencarboxamida, donde  $R_1$  es hidrógeno,  $R_2$  es t-butilo,  $R_3$  es metilo,  $R_4$  es metilo, y n es 1. La Tigeciclina es un antibiótico de glicilciclina y un análogo de la tetraciclina semisintética minociclina. La tigeciclina es un 9-t-butilglicilamido derivado de la minociclina, según se observa en la estructura a continuación:



**Tigeciclina**

La tigeciclina se creó en respuesta a la amenaza mundial de la creciente resistencia a los antibióticos. La tigeciclina tiene una actividad antibacteriana de amplio espectro tanto in vitro como in vivo. Los antibióticos con glicilciclina, como los de tetraciclina, actúan inhibiendo la conversión de las proteínas en las bacterias.

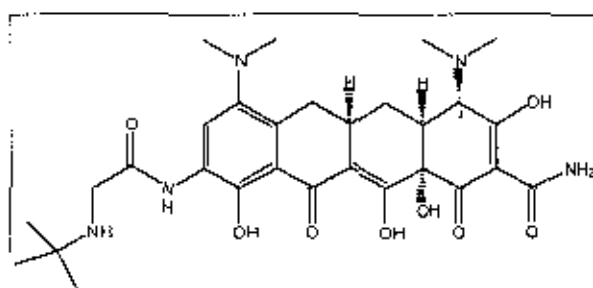
La tigeciclina es un antibiótico conocido de la familia de la tetraciclina y un análogo químico de la minociclina. Se puede usar como tratamiento contra las bacterias resistentes a los fármacos y se demostró que funciona en aquellos casos donde otros antibióticos no funcionan. Por ejemplo, es activa contra el *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina, *Streptococcus pneumoniae* resistente a la penicilina, enterococos resistentes a la vancomicina (D.J. Beidenbach et. al., Diagnostic Microbiology y Infectious Disease 40:173-177 (2001); H.W. Boucher et. al., Antimicrobial Agents & Chemotherapy 44:2225-2229 (2000); P.A. Bradford Clin. Microbiol. Newslett. 26:163-168 (2004); D. Milatovic et. al., Antimicrob. Agents Chemother. 47:400-404 (2003); R. Patel et. al., Diagnostic Microbiology y Infectious Disease 38:177-179 (2000); P.J. Petersen et. al., Antimicrob. Agents Chemother. 46:2595-2601 (2002); y P.J. Petersen et. al., Antimicrob. Agents Chemother. 43:738-744(1999), y contra organismos que presentan dos formas principales de resistencia a la tetraciclina: eflujo y protección ribosómica (C. Betriu et. al., Antimicrob. Agents Chemother. 48:323-325 (2004); T. Hirata et. al. Antimicrob. Agents Chemother. 48:2179-2184 (2004); y P.J. Petersen et. al., Antimicrob. Agents Chemother. 43:738-744(1999).

La tigeciclina se puede usar para el tratamiento de muchas infecciones bacterianas, tales como infecciones intra-abdominales (cIAI), infecciones de la estructura cutánea y de piel complicada (cSSSI), neumonía contraída en la comunidad (CAP) y neumonía contraída en el hospital (HAP), provocadas, tal vez, por patógenos gram-negativos y gram-positivos, anaerobios, y cepas susceptibles

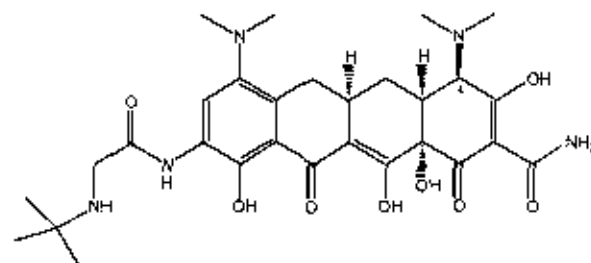
a la meticilina y resistentes a la meticilina del género *Staphylococcus aureus* (MSSA y MRSA). Además, la tigeciclina se puede usar para tratar o controlar infecciones bacterianas en animales de sangre caliente causadas por bacterias que presenten determinantes resistentes a TetM y TetK. También, la tigeciclina se puede usar para tratar infecciones óseas y articulares, neutropenia relacionada con catéteres e infecciones ginecológicas, o para tratar otros patógenos resistentes, tales como bacterias VRE, ESBL, entéricas, micobacterias de crecimiento rápido y similares.

La tigeciclina tiene algunas desventajas ya que puede disminuir por la epimerización. La epimerización es una conocida ruta de degradación de las tetraciclinas en general, a pesar de que la tasa de degradación puede variar según la tetraciclina. A comparación, la tasa de la epimerización de la tigeciclina puede ser rápida, incluso, por ejemplo, en condiciones acídicas leves y/o a temperaturas moderadamente altas. En la bibliografía de la tetraciclina, se informan varios métodos usados por científicos para tratar de minimizar la formación de epímeros de tetraciclinas. En algunos métodos, la formación de sales metálicas de calcio, magnesio, zinc o aluminio con tetraciclinas limitan la formación de epímeros cuando se realiza en soluciones no acuosas con niveles de pH básicos. (Gordon, P.N, Stephens Jr, C.R., Noseworthy, M. M., Teare, F.W., . Patente de Reino Unido N° 901.107). En otros métodos, (Tobkes, Patente de EE.UU. N° 4.038.315) la formación de un complejo metálico se lleva a cabo en un pH acídicos y se prepara, en consecuencia, una forma de sólido estable del fármaco.

*La tigeciclina difiere estructuralmente de su epímero en solo un sentido.*



FÓRMULA I



FÓRMULA II

En la tigeciclina, el grupo N-dimetilo en el carbono 4 es *cis* al hidrógeno adyacente tal como se muestra en la fórmula 1, mientras que el epímero (es decir, el epímero C<sub>4</sub>-), fórmula II, son mutuamente *trans* en la manera indicada. A pesar de que se cree que el epímero de tigeciclina no es tóxico, es posible que en ciertas condiciones carezca de la eficacia antibacteriana de la tigeciclina y que, por lo tanto, sea un producto de degradación indeseable. Además, la cantidad de epimerización se puede incrementar cuando se sintetiza tigeciclina a gran escala.

Otros métodos para reducir la formación de epímeros incluyen mantener los niveles de pH por sobre 6,0 durante el proceso; evitar el contacto con conjugados de ácidos débiles tales como formatos, acetatos, fosfatos o boronatos y evitar el contacto con la humedad, por ejemplo, con soluciones acuosas. Con respecto a la protección contra la humedad, Noseworthy y Spiegel (Patente estadounidense N° 3.026.248), y Nash y Haeger, (Patente estadounidense N° 3.219.529) sugirieron formular análogos de tetraciclinas en vehículos no acuosos para mejorar la estabilidad del fármaco. Sin embargo, la mayor parte de los vehículos incluidos en estas revelaciones son más apropiados para uso tópico que parenteral. Se sabe, también, que la epimerización de la tetraciclina depende de la temperatura, de modo que la producción y el almacenamiento de las tetraciclinas a bajas temperaturas también pueden reducir la velocidad de formación de epímeros ((Yuen, P.H., Sokoloski, T.D., J. Pharm. Sci. 66: 1648-1650, 1977; Pawelczyk, E., Matlak, B, Pol. J. Pharmacol. Pharm. 34: 409-421,

1982). Se han probado varios de estos métodos con la tigeciclina, pero, aparentemente, ninguna ha podido reducir la formación de epímeros y la degradación oxidativa, mientras que no se incorporen degradantes adicionales. Se descubrió que el complejamiento con metales, por ejemplo, no tiene un gran efecto sobre la formación de epímeros o degradación, generalmente con pH básico.

Si bien el uso de buffers de fosfato, acetato y citrato mejora la estabilidad del estado de la solución, parecerían acelerar la degradación de la tigeciclina en el estado liofilizado. No obstante, incluso sin la presencia de un buffer, la epimerización es un problema mayor con la tigeciclina que con otras tetraciclinas, tales como la minociclina.

Además del epímero de C4, otras impurezas incluyen productos derivados de oxidación. Algunos de estos productos derivados surgen de la oxidación del anillo D de la molécula, que es un aminofenol. Los compuestos de fórmula 3 (véase Esquema 1 a continuación) se pueden oxidar fácilmente en las posiciones C-11 y C-12a. El aislamiento de los compuestos de fórmula 3 por medio de precipitación con un no solvente presenta el problema de que los productos derivados de la oxidación y las sales metálicas se coprecipitan con el producto, lo cual da lugar a grados muy bajos de pureza. La oxidación y degradación del núcleo de los compuestos de fórmula 3 pueden ser más pronunciadas en condiciones de reacción básicas y más también en operaciones a gran escala debido a que los tiempos de proceso son, en general, mayores y los compuestos están en contacto con la base durante un tiempo mayor.

Además, los productos de degradación se pueden obtener durante cada uno de los diferentes pasos de un esquema y la tarea de separar el compuesto deseado de los productos de degradación puede resultar tediosa. Por ejemplo, no se pueden usar técnicas de purificación convencionales, tales como,

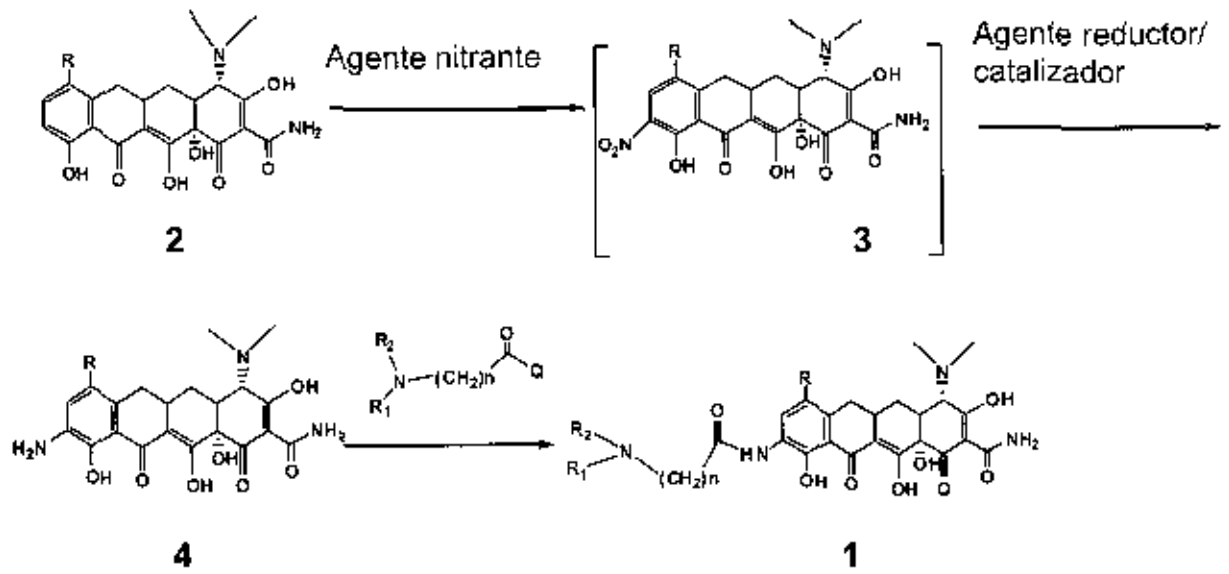
126  
30/12/89

cromatografía sobre gel de sílice o HPLC preparativa para la purificación sencilla de estos compuestos debido a sus propiedades quelantes. A pesar de que algunas tetraciclinas fueron purificadas por medio de cromatografía de partición usando columnas hechas de tierra de diatomeas impregnadas con fases estacionarias amortiguadas (con buffer) que contenían agentes secuestrantes como EDTA, dichas técnicas pueden acarrear una resolución, reproducción y capacidad muy bajas. Dichas desventajas puede dificultar la síntesis a gran escala. También se ha usado la HPLC para purificación, pero una adecuada resolución de los varios componentes sobre las columnas de HPLC requiere de la presencia de agente apareador de iones en la fase móvil. Separar el producto final de los agentes secuestrantes y apareadores de iones en la fase móvil puede resultar difícil.

Si bien en una pequeña escala, los compuestos impuros obtenidos por medio de precipitación se pueden purificar por medio de HPLC de fase inversa preparativa, dicha purificación puede ser ineficiente y costosa cuando se trabaja con kilogramos de material.

De esta manera, sigue existiendo una necesidad de obtener el al menos un compuesto de fórmula 1 en una forma más purificada que la que se obtuvo anteriormente. También, sigue existiendo una necesidad de contar con nuevas síntesis para minimizar el uso de cromatografía a fines de purificación.

En la presente, se revelan métodos para producir tetraciclinas, tales como tigeciclinas, según se ilustra en forma general en el Esquema 1 a continuación:



### Esquema I

$R_1$  y  $R_2$  se seleccionan, cada uno en forma independiente, de hidrógeno, alquilo ( $C_1$ - $C_6$ ) de cadena lineal y ramificada y cicloalquilo, o  $R_1$  y  $R_2$ , junto con N forman un heterociclo; y R es  $-NR_3R_4$ , donde  $R_3$  y  $R_4$  se seleccionan, cada uno en forma independiente, de hidrógeno y alquilo ( $C_1$ - $C_4$ ) de cadena lineal y ramificada; y n varía entre 1-4.

El compuesto de fórmula 2 es también conocido como una minociclina o un derivado de ésta. La reacción del compuesto de fórmula 2 con al menos un agente nitrante proporciona un sustituyente  $-NO_2$  que forma un compuesto de fórmula 3. El sustituyente  $-NO_2$  de la fórmula 3 se puede reducir a un amino, por medio de hidrogenación, por ejemplo, para formar el compuesto de fórmula 4. Finalmente, la acilación del compuesto de fórmula 4 genera el compuesto de fórmula 1.

En la presente, se revelan métodos para realizar reacciones para producir el compuesto de fórmula 1, por ejemplo, nitración, reducción y acilación. También, se revelan métodos para purificar el compuesto de fórmula 1.

Los métodos revelados pueden formar el producto deseado mientras que reducen la cantidad de, al menos, una impureza presente en el producto final, tal

como la formación de epímeros, la presencia de reactivos de partida y productos derivados de oxidación. Tal reducción de impurezas se puede lograr durante al menos una fase de la síntesis, por ejemplo, durante cualquiera de las siguientes: nitración, reducción y acilación. Los métodos revelados aquí también facilitan síntesis a gran escala con purezas adecuadas de los productos finales.

### FIGURAS

La Figura 1 ilustra un esquema ejemplificativo para preparar tigeciclina.

La Figura 2 muestra un esquema ejemplificativo para preparar tigeciclina.

La Figura 3 muestra un esquema ejemplificativo para preparar tigeciclina.

### DEFINICIONES

Cabe notar que, como se usa aquí en la presente memoria descriptiva y las reivindicaciones anexas, las formas singulares "un", "una", "la" y "el" incluyen los referentes en plural a menos que se el contenido indique claramente lo contrario. Así, por ejemplo, la referencia a una composición que contiene "un compuesto" incluye una mezcla de dos o más compuestos. También, se debería destacar que el término "o" se usa, generalmente, en el sentido que incluye "y/o", a menos que el contenido indique claramente lo contrario.

La "tigeciclina" como se usa aquí incluye tigeciclina en forma de base libre y formas de sales, tales como cualquier sal aceptable para uso farmacéutico, enantiómeros y epímeros. La tigeciclina, tal su uso en la presente, se puede formular de acuerdo con métodos conocidos en el arte.

El término "compuesto", según se usa en la presente, hace referencia a un compuesto neutral (por ejemplo, una base libre) y sus sales (tales como sales aceptables para uso farmacéutico). El compuesto puede existir en una forma anhidra o como un hidrato o como un solvato. El compuesto puede estar presente en forma de estereoisómeros (por ejemplo, enantiómeros y

diastereómeros) y se puede aislar en forma de enantiómeros, mezclas racémicas, diastereómeros y sus mezclas). El compuesto en forma sólida puede existir en varias formas cristalinas y amorfas.

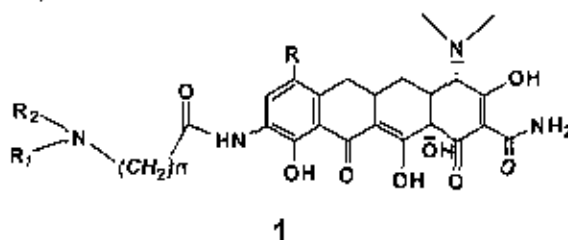
"Aceptable para uso farmacéutico", según se usa aquí, hace referencia a aquellos compuestos, materiales, composiciones y/o formas de dosificación que están dentro del alcance del criterio médico firme, adecuados para usar en contacto con tejidos de pacientes sin toxicidad excesiva, irritación, respuesta alérgica u otro problema o complicación acorde con una proporción razonable de riesgo/beneficio.

"Cicloalquilo", según se usa aquí, hace referencia a un sistema anular carbocíclicos saturado que tiene 3 a 6 miembros anulares.

"Heterociclo", según se usa aquí, hace referencia a un grupo heterocíclico monocíclico que contiene al menos un nitrógeno como miembro y que tiene 3 a 6 miembros anulares en cada anillo, donde cada anillo es saturado y no sustituido de otro modo.

### NITRACIÓN

Una realización revela un método para preparar al menos un compuesto de fórmula 1,



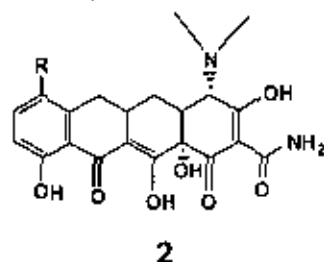
o una de sus sales aceptables para uso farmacéutico.

donde  $R_1$  y  $R_2$  se seleccionan, cada uno en forma independiente, de hidrógeno, alquilo ( $C_1$ - $C_6$ ) de cadena lineal y ramificada y cicloalquilo, o  $R_1$  y  $R_2$ , junto con N, forman un heterociclo; R es  $-NR_3R_4$ , donde  $R_3$  y  $R_4$  se seleccionan,

cada uno en forma independiente, de hidrógeno, alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>) lineal o ramificado; y n oscila entre 1-4.

Una realización revela una reacción de nitración donde el producto de la nitración no se aísla. De esta forma, en una realización, el método comprende:

hacer reaccionar al menos un agente nitrante con al menos un compuesto de fórmula 2,



o una de sus sales, para producir una mezcla de reacción que comprenda un intermediario y

hacer reaccionar, además, el intermediario para formar el al menos un compuesto de fórmula 1.

*En una realización, el intermediario no se aísla de la mezcla de reacción.*

El al menos un compuesto de fórmula 2 se puede proporcionar en forma de base libre o sal. En una realización, el al menos un compuesto de fórmula 2 es una sal. Según se usa en la presente, las "sales" se pueden preparar in situ o en forma separada haciendo reaccionar una base libre con un ácido adecuado. Algunos ejemplos de sales incluyen, sin limitarse a ellas, sales clorhídricas, bromhídricas, yodhidrato, fosfóricas, nítricas, sulfúricas, acéticas, benzoicas, cítricas, de cisteína, fumáricas, glicólicas, maleicas, succínicas, tartáricas, de sulfatos y clorobencensulfonato. En otra realización, la sal se puede seleccionar de sales alquilsulfónicas y arilsulfónicas. En una realización, el al menos un compuesto de fórmula 2 se provee como un sal clorhídrica o una sal sulfato.

Según se usa aquí, el "agente nitrante" hace referencia a un reactivo que se puede adherir un sustituyente -NO<sub>2</sub> a un compuesto, o transformar un

sustituyente existente en un sustituyente  $-\text{NO}_2$ . Algunos reactivos ejemplificativos incluyen ácidos nítricos y sales de nitratos, tales como sales de metales alcalinos, por ejemplo,  $\text{KNO}_3$ . Donde el agente nitrante es un ácido nítrico, el ácido nítrico puede tener una concentración de, al menos, 80%, tal como una concentración de 85%, 88%, 90%, 95%, 99%, o incluso 100%.

El agente nitrante puede reaccionar con el al menos un compuesto de fórmula 2 en cualquier solvente considerado adecuado por un experto en la materia. En una realización, la reacción se realiza en presencia de un ácido sulfúrico y/o sales de sulfatos. En una realización, el ácido sulfúrico usado es ácido sulfúrico concentrado, por ejemplo, una concentración de al menos 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, o al menos 95%.

En una realización, se proporciona el al menos un agente nitrante en un exceso molar relacionado con el al menos un compuesto de fórmula 2. Un experto en el arte puede determinar los excesos molares adecuados, éstos pueden incluir, sin limitarse a ello, valores tales como al menos 1,05 g, un exceso molar en el rango de equivalentes de 1,05 y 1,75, tal como un exceso molar que oscile entre 1,05 y 1,5, o 1,05 y 1,25 ó 1,05 y 1,1. En otra realización, el exceso molar es de equivalentes a 1,05; 1,1; 1,2; 1,3; ó 1,4.

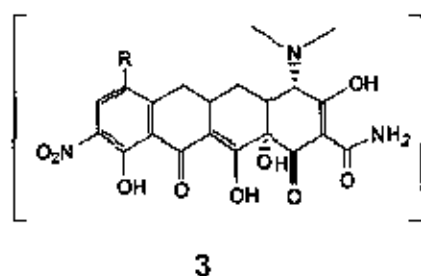
En una realización, el menos un agente nitrante reacciona con el al menos un compuesto de fórmula 2 agregando el al menos un agente nitrantes durante un período de tiempo. Un experto en el arte puede calcular un período de tiempo para incorporar la totalidad del agente nitrante a fin de optimizar las condiciones de reacción. Por ejemplo, el agregado de un reactivo de nitración se puede controlar por medio de, por ejemplo, HPLC, para corroborar la cantidad del al menos un agente nitrante usado. En una realización, la cantidad total del al menos un agente nitrante se agrega durante un período de tiempo de al menos 1 hora, tal como un periodo de tiempo de al menos 2 horas, al menos 3 horas, al

menos 5 horas, al menos 10 horas, al menos 24 horas, o un período de tiempo que varíe entre 1 hora y 1 semana, que varíe entre 1 hora y 24 horas, o 1 hora y 12 horas.

El al menos un agente nitrante se puede agregar en forma continua.

En una realización, el agente nitrante puede reaccionar con el al menos un compuesto de fórmula 2 en un rango de temperatura de 0 a 25°C, de modo que la temperatura varíe entre 5 y 15°C, 5 y 10°C, o 10 y 15°C.

Un "intermediario" según se usa aquí, hace referencia a un compuesto formado como un producto intermediario entre el material de partida y el producto final. En una realización, el intermediario es un producto de la nitración del al menos un compuesto de fórmula 2. Por ejemplo, el intermediario puede ser, al menos, un compuesto de fórmula 3 o una de sus sales.



El intermediario puede existir como base libre o como sal, como cualquier sal revelada en la presente. En una realización, el intermediario es una sal sulfato.

En una realización, el intermediario no se aísla de la mezcla de reacción. La "mezcla de reacción", según se usa aquí, hace referencia a una solución o suspensión que comprende al menos un producto de una reacción química entre reactivos y, también, productos derivados, por ejemplo, impurezas (que incluyen compuestos con estereoquímicas indeseadas), solventes y cualquier restos de reactivos, tales como material de partida. En una realización, el intermediario es el producto de la nitración y está presente en la mezcla de reacción, que también puede contener reactivos de partida (tales como el agente nitrante y/o al menos

un compuesto de fórmula 2), productos derivados (tales como el epímero de C<sub>4</sub>) de fórmula 2 o 3. En una realización, la mezcla de reacción es una suspensión, donde una suspensión puede ser una composición que comprenda al menos un sólido y al menos un líquido (tal como agua, ácido o un solvente), por ejemplo, una suspensión o una dispersión de sólidos.

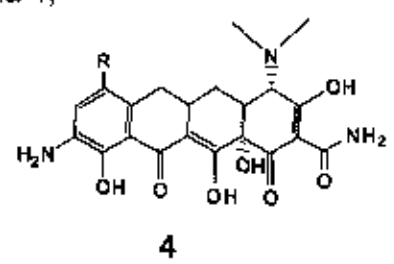
En una realización, la reacción de nitración produce el intermediario mientras se genera una cantidad pequeña del epímero de C<sub>4</sub> correspondiente. Por ejemplo, donde el intermediario es al menos un compuesto de fórmula 3, la nitración provoca la formación de un epímero de C<sub>4</sub> de fórmula 3 en una cantidad menor a 10%, según determinado por la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). En otra realización, el epímero de C<sub>4</sub> está presente en una cantidad *menor a 5%, menor a 3%, menor a 2%, menor a 1% o menor a 0,5%.*

Los parámetros de HPLC para cada paso, por ejemplo, nitración, reducción y acilación se proporcionan en la sección de Ejemplos.

En una realización, la nitración se realiza de tal manera que la cantidad de material de partida, por ejemplo, el al menos un compuesto de fórmula 2, es bajo. En una realización, el menos un compuesto de fórmula 2 está presente en el producto de nitración en una cantidad menor a 10%, según determinado por HPLC, o menor a 5%, menor a 3%, menor a 2%, menor a 1% o menor a 0,5%.

En una realización, la nitración se puede realizar a gran escala. En una realización, "gran escala" se refiere al uso de al menos un gramo de compuesto de acuerdo con la fórmula 2, tal como el uso de al menos 2 gramos, de al menos 5 gramos, de al menos 10 gramos, de al menos 25 gramos, de al menos 50 gramos, de al menos 100 gramos, de al menos 500 gramos, de al menos 1 kilogramo, de al menos 5 kilogramos, de al menos 10 kilogramos, de al menos 25 kilogramos, de al menos 50 kilogramos o de al menos 100 kilogramos.

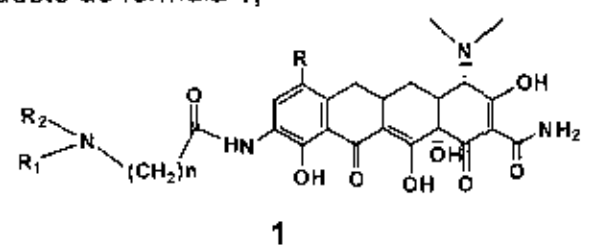
En una realización, la reducción forma el al menos un compuesto de fórmula 4,



o una de sus sales,

En una realización, la próxima reacción en b) comprende reducir el intermediario. En otra realización, el método comprende además acilar el intermediario reducido.

Otra realización revelada es un método para preparar al menos un compuesto de fórmula 1,

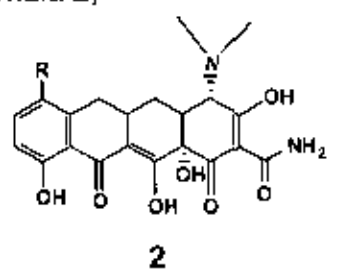


o una de sus sales aceptables para uso farmacéutico.

donde R<sub>1</sub> es hidrógeno, R<sub>2</sub> es t-butilo, R es -NR<sub>3</sub>R<sub>4</sub> donde R<sub>3</sub> es metilo y R<sub>4</sub> es metilo y n es 1, 2,

que comprende:

hacer reaccionar al menos un agente nitrante con al menos un compuesto de fórmula 2,



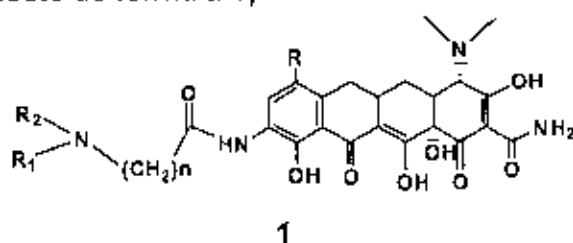
o una de sus sales, para producir una mezcla de reacción que comprenda un intermediario y

hacer reaccionar, además, el intermediario para formar el al menos un compuesto de fórmula 1.

En una realización, el intermediario no se aísla de la mezcla de reacción.

En una realización, el al menos un compuesto de fórmula 1 es tigeciclina.

Otra realización revelada es un método para preparar al menos un compuesto de fórmula 1,

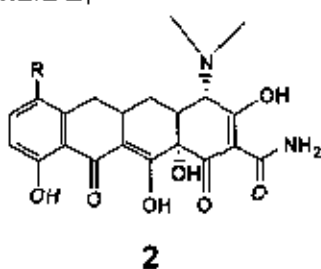


o una de sus sales aceptables para uso farmacéutico.

donde  $R_1$  y  $R_2$  se seleccionan, cada uno en forma independiente, de hidrógeno, alquilo ( $C_1$ - $C_6$ ) de cadena lineal y ramificada y cicloalquilo, o  $R_1$  y  $R_2$ , junto con N, forman un heterociclo; R es  $-NR_3R_4$ , donde  $R_3$  y  $R_4$  se seleccionan, cada uno en forma independiente, de hidrógeno, alquilo ( $C_1$ - $C_4$ ) lineal o ramificado; y n oscila entre 1-4,

que comprende:

hacer reaccionar al menos un agente nitrante con al menos un compuesto de fórmula 2,

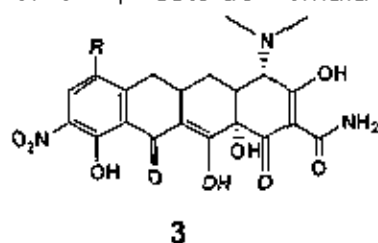


o una de sus sales para formar una suspensión y

hacer reaccionar, además, la suspensión para formar un compuesto de fórmula 1.

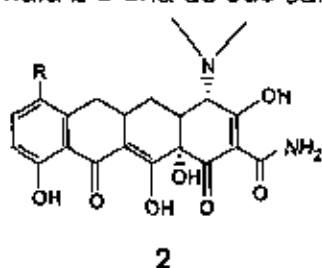
donde  $R_1$  es hidrógeno,  $R_2$  es t-butilo, R es  $-NR_3R_4$  donde  $R_3$  es metilo y  $R_4$  es metilo y n es 1. En otra realización, el al menos un compuesto de fórmula 1 es tigeciclina.

Otra realización revelada en la presente es un método para preparar al menos un compuesto de fórmula 3 o una de sus sales,



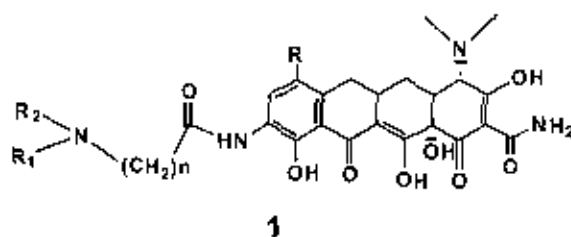
donde R es  $-NR_3R_4$ , donde  $R_3$  y  $R_4$  se seleccionan, cada uno en forma independiente de hidrógeno y alquilo ( $C_1$ - $C_4$ ) de cadena lineal y ramificada, que comprende:

hacer reaccionar al menos un agente nitrante con al menos un compuesto de fórmula 2 o una de sus sales,



donde la reacción se lleva a cabo en un rango de temperatura de 5 a 15°C.

Otra realización revelada es un método para preparar al menos un compuesto de fórmula 1,

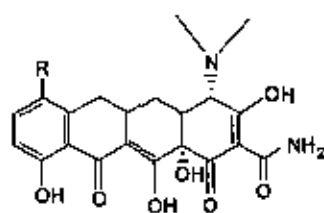


o una de sus sales aceptables para uso farmacéutico.

donde  $R_1$  y  $R_2$  se seleccionan, cada uno en forma independiente, de hidrógeno, alquilo ( $C_1-C_6$ ) de cadena lineal y ramificada y cicloalquilo, o  $R_1$  y  $R_2$ , junto con N, forman un heterociclo; R es  $-NR_3R_4$ , donde  $R_3$  y  $R_4$  se seleccionan, cada uno en forma independiente, de hidrógeno, alquilo ( $C_1-C_4$ ) lineal o ramificado; y n oscila entre 1-4,

que comprende:

hacer reaccionar al menos un agente nitrante con al menos un compuesto de fórmula 2 o una de sus sales para preparar una mezcla de reacción que comprenda un intermediario y



2

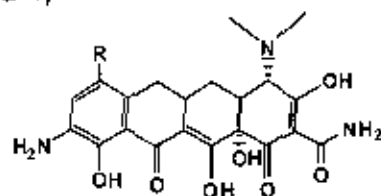
hacer reaccionar, además, el intermediario para formar el al menos un compuesto de fórmula 1

donde la reacción en a) se lleva a cabo en un rango de temperatura de 5 a 15°C.

En una realización,  $R_1$  es hidrógeno,  $R_2$  es tbutilo,  $R_3$  es metilo,  $R_4$  es metilo y n es 1.

## REDUCCIÓN

Una realización revela un método para preparar al menos un compuesto de fórmula 4,



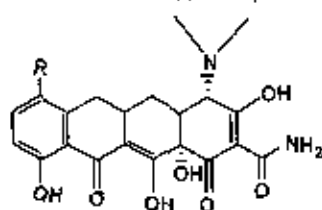
4

o una de sus sales,

donde  $R = -NR_3R_4$ , donde  $R_3$  y  $R_4$  se seleccionan, cada uno en forma independiente, y alquilo ( $C_1$ - $C_4$ ) de cadena lineal y ramificada,

que comprende:

combinar, al menos, un agente reductor con una mezcla de reacción, como por ejemplo una mezcla de reacción, que comprenda un intermediario preparado a partir de una reacción entre, al menos, un agente nitrante y, al menos, un compuesto de fórmula 2,



2

o una de sus sales,

En una realización, el método describe un proceso de "un solo recipiente" donde los pasos de nitración y reducción se llevan a cabo sin aislar los productos de la nitración de la mezcla de nitración.

En una realización,  $R_1$  es hidrógeno,  $R_2$  es tbutilo,  $R_3$  es metilo,  $R_4$  es metilo y  $n$  es 1.

"Agente reductor" significa, en la presente, un agente químico que agrega hidrógeno a un compuesto. En una realización, un agente reductor es hidrógeno. La reducción se puede realizar bajo una atmósfera de hidrógeno a una presión adecuada según lo determine un experto en el arte. En una realización, el hidrógeno se proporciona en un rango de presión de 6,9 a 517 kPa (1 a 75 psi), tal como un rango de presión de 6,9 a 344 kPa (1 a 50 psi) o un rango de presión de 6,9 a 276 kPa (1 a 40 psi).

En otra realización, el agente reductor se proporciona en presencia de, al menos, un catalizador. Algunos catalizadores de ejemplo incluyen, sin limitarse a ello, óxidos de metales de tierra rara, catalizadores que contienen metales del

*Grupo VIII y sales del catalizador que contiene metales del Grupo VIII. Un ejemplo de un catalizador que contiene un metal del grupo VIII es paladio, por ejemplo, paladio sobre carbono.*

*Cuando el catalizador es paladio sobre carbono, en una realización, el catalizador está presente en una cantidad que oscila entre 0,1 partes a 1 parte, con respecto a la cantidad de la fórmula 2 presente antes de la reacción con el al menos un agente nitrante.*

*En una realización, el intermediario es, al menos, un compuesto de fórmula 3. En una realización, en el compuesto de fórmula 3,  $R_1$  es hidrógeno,  $R_2$  es t-butilo,  $R_3$  es metilo,  $R_4$  es metilo y  $n$  es 1.*

*Un experto en el arte puede determinar un solvente adecuado para la reacción de reducción. En una realización, antes de realizar la combinación, es decir, antes de la reducción, la mezcla de reacción se combina con un solvente que comprende al menos un alcohol ( $C_1-C_8$ ). El al menos un alcohol ( $C_1-C_8$ ) se puede seleccionar, por ejemplo, de metanol y etanol.*

*Un experto en el arte puede determinar una temperatura adecuada para la reacción de reducción. En una realización, la combinación, por ejemplo, la reducción, se realiza a un rango de temperatura entre  $0^{\circ}C$  y  $50^{\circ}C$ , por ejemplo entre  $20^{\circ}C$  y  $40^{\circ}C$ , o entre  $26^{\circ}C$  y  $28^{\circ}C$ .*

*En una realización, después de realizar la combinación, es decir, después de la reducción, la mezcla de reacción resultante se agrega a (o se combina con) un sistema de solvente que comprende un alcohol ( $C_1-C_8$ ) de cadena ramificada y un hidrocarburo ( $C_1-C_8$ ). En una realización, el alcohol de cadena ramificada ( $C_1-C_8$ ) es isopropanol. En una realización, el hidrocarburo ( $C_1-C_8$ ) se selecciona de hexano, heptano y octano.*

En una realización, después de la combinación, es decir, después de la *reducción*, la *mezcla de reacción resultante* se agrega al sistema de solvente en un rango de temperatura de 0°C a 50°C, por ejemplo, de 0°C a 10°C.

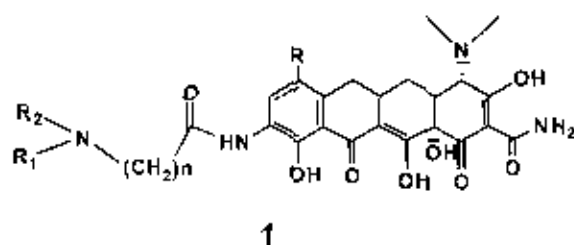
En una realización, el método comprende además aislar el al menos un *compuesto de fórmula 4 en forma de un sólido o de una composición sólida*. En una realización, el al menos un compuesto de fórmula 4 se precipita o se aísla como un sal, como por ejemplo, cualquier sal descrita en la presente.

En una realización, la *composición sólida* comprende un epímero de C4- de fórmula 4 en una cantidad menor a 10% según determinado por cromatografía líquida de alta resolución. En otra realización, el epímero de C4- está presente en una cantidad menor a 5%, menor a 3%, menor a 2%, menor a 1% o menor a 0,5%.

En una realización, la *composición sólida* comprende el al menos un *compuesto de fórmula 2 en una cantidad menor a 2%*, como por ejemplo una cantidad menor a 1%, o menor a 0,5%, según determinado por la cromatografía líquida de alta resolución.

En una realización, la *reducción* se puede realizar a gran escala. En una realización, "gran escala" se refiere al uso de al menos un gramo de compuesto de acuerdo con la fórmula 2, tal como el uso de al menos 2 gramos, de al menos 5 gramos, de al menos 10 gramos, de al menos 25 gramos, de al menos 50 gramos, de al menos 100 gramos, de al menos 500 gramos, de al menos 1 kilogramo, de al menos 5 kilogramos, de al menos 10 kilogramos, de al menos 25 kilogramos, de al menos 50 kilogramos o de al menos 100 kilogramos.

Otra realización revelada es un método para preparar al menos un compuesto de fórmula 1,

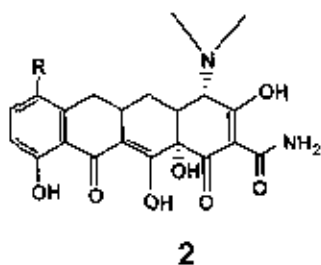


o una de sus sales aceptables para uso farmacéutico.

donde  $R_1$  y  $R_2$  se seleccionan, cada uno en forma independiente, de hidrógeno, alquilo ( $C_1$ - $C_6$ ) de cadena lineal y ramificada y cicloalquilo, o  $R_1$  y  $R_2$ , junto con N, forman un heterociclo; R es  $-NR_3R_4$ , donde  $R_3$  y  $R_4$  se seleccionan, cada uno en forma independiente, de hidrógeno, alquilo ( $C_1$ - $C_4$ ) lineal o ramificado; y n oscila entre 1-4,

que comprende:

combinar, al menos, un agente reductor con una mezcla de reacción, como por ejemplo una mezcla de reacción, que comprenda un intermediario preparado a partir de una reacción entre, al menos, un agente nitrante y, al menos, un compuesto de fórmula 2,

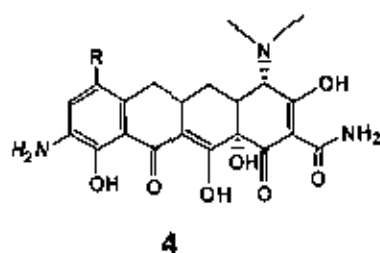


o una de sus sales para formar un segundo intermediario y

hacer reaccionar, también, el segundo intermediario en la mezcla de reacción para preparar el al menos un compuesto de fórmula 1.

En una realización,  $R_1$  es hidrógeno,  $R_2$  es tbutilo,  $R_3$  es metilo,  $R_4$  es metilo y n es 1.

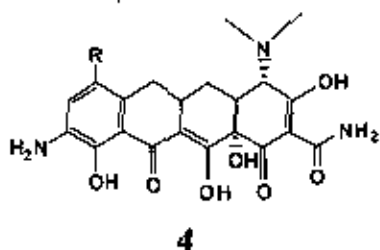
En una realización, el intermediario es al menos un compuesto de fórmula 3 o una de sus sales, y el segundo intermediario es al menos un compuesto de fórmula 4,



o una de sus sales,

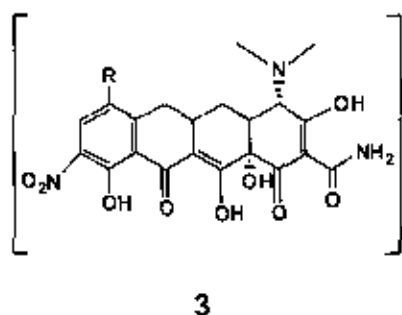
En una realización, la próxima reacción en b) comprende acilar el segundo intermediario. En una realización, antes de la acilación, el segundo intermediario se puede precipitar o aislar en forma de sal.

Otra realización revelada en la presente es un método para preparar al menos un compuesto de fórmula 4 o una de sus sales,



donde  $R = -NR_3R_4$ , donde  $R_3$  y  $R_4$  se seleccionan, cada uno en forma independiente, de hidrógeno, alquilo ( $C_1$ - $C_4$ ) de cadena lineal y ramificada, que comprende:

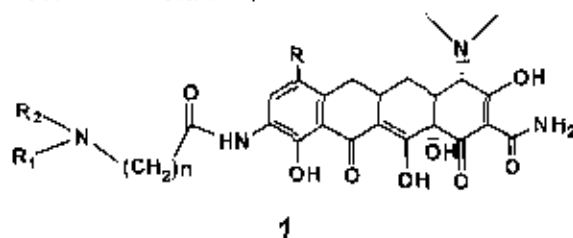
reducir un intermediario de fórmula 3 o una de sus sales,



En una realización, el intermediario de fórmula 3 está presente en una mezcla de reacción en suspensión.

En una realización, el paso de reducción comprende combinar al menos un agente reductor con la mezcla de reacción.

Otra realización revelada es un método para preparar al menos un compuesto de fórmula 1,

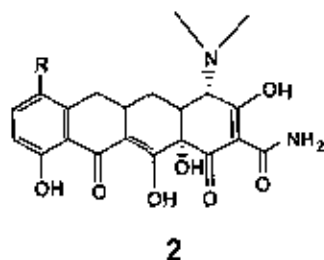


o una de sus sales aceptables para uso farmacéutico.

donde  $R_1$  y  $R_2$  se seleccionan, cada uno en forma independiente, de hidrógeno, alquilo ( $C_1$ - $C_6$ ) de cadena lineal y ramificada y cicloalquilo, o  $R_1$  y  $R_2$ , junto con N, forman un heterociclo;  $R$  es  $-NR_3R_4$ , donde  $R_3$  y  $R_4$  se seleccionan, cada uno en forma independiente, de hidrógeno, alquilo ( $C_1$ - $C_4$ ) lineal o ramificado; y  $n$  oscila entre 1-4,

que comprende:

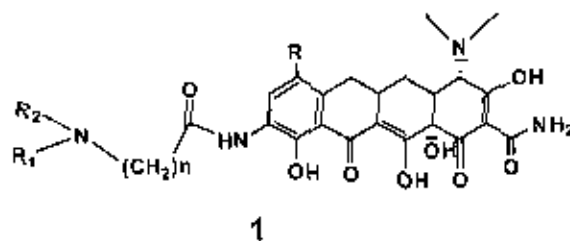
hacer reaccionar el menos un agente nitrante con al menos un compuesto de fórmula 2 o una de sus sales para preparar una mezcla de reacción,



sin aislar los sólidos de la mezcla de reacción o sin precipitarlos, combinar al menos un agente reductor con la mezcla de reacción para preparar un intermediario y

preparar el al menos un compuesto de fórmula 1 a partir del intermediario.

Otra realización revelada es un método para preparar al menos un compuesto de fórmula 1,

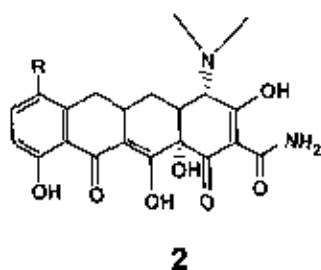


o una de sus sales aceptables para uso farmacéutico.

donde  $R_1$  y  $R_2$  se seleccionan, cada uno en forma independiente, de hidrógeno, alquilo ( $C_1$ - $C_6$ ) de cadena lineal y ramificada y cicloalquilo, o  $R_1$  y  $R_2$ , junto con N, forman un heterociclo; R es  $-NR_3R_4$ , donde  $R_3$  y  $R_4$  se seleccionan, cada uno en forma independiente, de hidrógeno, alquilo ( $C_1$ - $C_4$ ) lineal o ramificado; y n oscila entre 1-4,

que comprende:

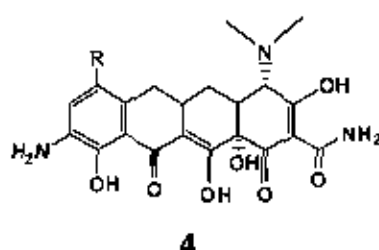
combinar al menos un catalizador que contenga un metal del grupo VIII en presencia de hidrógeno con una mezcla de reacción, como por ejemplo, una mezcla de reacción en suspensión, preparada a partir de una reacción de al menos un agente nitrante con al menos un compuesto de fórmula 2 o una de sus sales.



En una realización, el al menos un catalizador que contenga un metal del grupo VIII está presente en una cantidad que oscila entre 0,1 partes a 1 parte, con respecto a la cantidad de al menos un compuesto de fórmula 2, presente antes de la reacción con el al menos un agente nitrante.

Otra realización revelada en la presente es una composición que comprende:

al menos un compuesto de fórmula 4,



o una de sus sales,

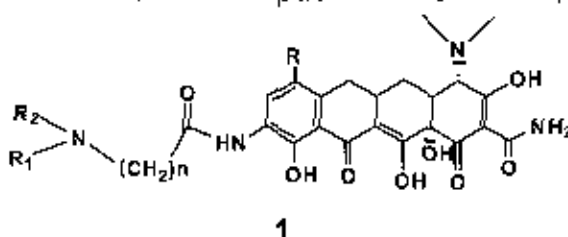
donde R es  $-NR_3R_4$ , donde  $R_3$  y  $R_4$  se seleccionan, cada uno en forma independiente de hidrógeno y alquilo ( $C_1$ - $C_4$ ) de cadena lineal y ramificada,

donde un epímero de C4 de fórmula 4 está presente en una cantidad menor a 10%, según determinada por cromatografía líquida de alta resolución.

En una realización,  $R_1$  es hidrógeno,  $R_2$  es *t*-butilo,  $R_3$  es metilo,  $R_4$  es metilo y n es 1.

### ACILACIÓN

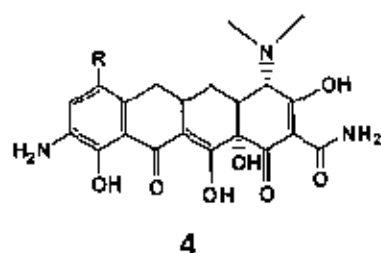
Una realización de la presente invención proporciona un método para preparar al menos un compuesto de fórmula 1,



o una de sus sales aceptables para uso farmacéutico.

donde  $R_1$  y  $R_2$  se seleccionan, cada uno en forma independiente, de hidrógeno, alquilo ( $C_1$ - $C_6$ ) de cadena lineal y ramificada, tal como cicloalquilo ( $C_3$ - $C_6$ ), o  $R_1$  y  $R_2$ , junto con N, forman un heterociclo, tal como un anillo de 5 miembros; R es  $-NR_3R_4$ , donde  $R_3$  y  $R_4$  se seleccionan, cada uno en forma independiente, de hidrógeno, alquilo ( $C_1$ - $C_4$ ) lineal o ramificado; y n oscila entre 1-4,

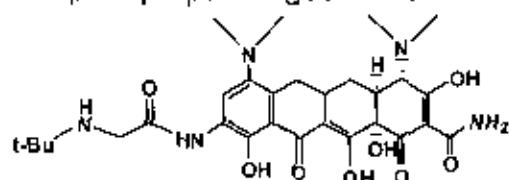
que comprende reaccionar al menos un compuesto de fórmula 4;



o una de sus sales,

con al menos un compuesto de aminoacilo en un medio de reacción. En otra realización, el medio de reacción se puede seleccionar de un medio acuoso y al menos un solvente básico sin una base reactiva.

En una realización, el método para preparar un compuesto de fórmula 1 es un método para preparar tigeciclina:



### Tigeciclina

o una de sus sales aceptables para uso farmacéutico.

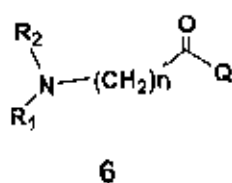
En una realización, la variable n es  $R_1$  es hidrógeno,  $R_2$  es t-butilo,  $R_3$  y  $R_4$  son, cada uno, metilo. En una realización, la variable n es 1,  $R_1$  y  $R_2$ , en conjunto con N, forman un grupo pirrolidinilo y  $R_3$  y  $R_4$  son, cada uno, metilo. La sal del al menos un compuesto de Fórmula 4 puede ser una sal halogenada, tal como, una sal clorhídrica.

El medio de reacción puede ser un solvente seleccionado de un solvente aprótico polar o una mezcla de solventes. En una realización, el solvente aprótico polar se selecciona de acetonitrilo, 1,2-dimetoxietano, dimetilacetamida, dimetilformamida, hexametilfosforamida, N,N'-dimetiletilenurea, N,N'-dimetilpropilenurea, cloruro de metileno, N-metilpirrolidinona, tetrahidrofurano y sus mezclas. En otra realización, el solvente aprótico polar se selecciona de acetonitrilo, dimetilformamida, N,N'-dimetiletilenurea, N-metilpirrolidinona,

tetrahidrofurano y sus mezclas. El al menos un solvente básico puede ser una mezcla de acetonitrilo y N,N'-dimetilpropilenurea. En otra realización, el al menos un solvente básico puede ser una mezcla de agua y N,N'-dimetilpropilenurea. Y en otra realización, el al menos un solvente básico es N,N'-dimetilpropilenurea.

El medio de reacción puede ser un medio acuoso. En otra realización, el al menos un solvente básico en ausencia de una base es agua. En otra realización, el medio de reacción puede ser al menos un solvente básico sin una base reactiva. Un solvente básico es un solvente que puede aceptar, parcial o totalmente, un protón. Un base reactiva hace referencia a una base que se agrega al comienzo de la reacción, en forma simultánea o consecutiva, con el al menos un compuesto de Fórmula 4 y el al menos un compuesto de aminoácido que puede aceptar, parcial o totalmente, un protón. Una base reactiva también hace referencia a una base que se agrega durante la reacción.

El al menos un compuesto de aminoácido se puede seleccionar de haluros de aminoácido, anhídridos de aminoácido y anhídrido de aminoácido mezclados. En una realización, el compuesto de aminoácido es al menos un haluro de aminoácido de Fórmula 6:



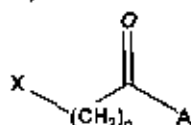
o una de sus sales,

donde  $\text{R}_1$  y  $\text{R}_2$  se seleccionan, cada uno en forma independiente, de hidrógeno, alquilo ( $\text{C}_1\text{-C}_8$ ) de cadena lineal y ramificada y cicloalquilo, o  $\text{R}_1$  y  $\text{R}_2$ , junto con N, forman un heterociclo; n oscila entre 1-4; y donde Q es un halógeno seleccionado de fluoruro, bromuro, cloruro y yoduro.

En otra realización, Q es cloruro. La sal del compuesto de Fórmula 6 se puede seleccionar de una sal halogenada. Las sales halogenadas son cualquier sal formada a partir de la interacción con un anión halógeno, tal como una sal clorhídrica, una sal bromhídrica y una sal yodhídrica. En una realización, la sal halogenada es una sal clorhídrica.

El al menos un haluro de aminoácido de Fórmula 6 se puede obtener por un método que comprende:

A) hacer reaccionar al menos un compuesto de fórmula 7:



7

o una de sus sales,

con al menos una amina,  $\text{R}_1\text{R}_2\text{NH}$ , para preparar al menos un ácido carboxílico,

donde  $\text{R}_1$  y  $\text{R}_2$  se seleccionan, cada uno en forma independiente, de hidrógeno, alquilo ( $\text{C}_1\text{-C}_6$ ) de cadena lineal y ramificada y cicloalquilo, o  $\text{R}_1$  y  $\text{R}_2$ , junto con N, forman un heterociclo; X es un halógeno seleccionado de bromuro, cloruro, fluoruro y yoduro, A es  $-\text{OR}_6$ , donde  $\text{R}_6$  se selecciona de alquilo ( $\text{C}_1\text{-C}_6$ ) de cadena lineal o ramificado y alquilarilo, tal como arilalquilo ( $\text{C}_1\text{-C}_6$ ), por ejemplo donde arilo es fenilo; n oscila entre 1-4; y

B) hacer reaccionar el al menos un ácido carboxílico con al menos un agente de cloración y proporcionar al menos un compuesto aminoácido de Fórmula 6 o una de sus sales.

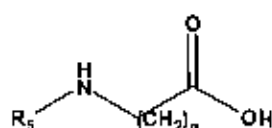
En una realización,  $\text{R}_1$  y  $\text{R}_6$  pueden ser, cada uno, t-butilo. En otra realización,  $\text{R}_1$  y  $\text{R}_2$ , junto con N, pueden formar un heterociclo, tal como pirrolidina, y  $\text{R}_6$  puede ser arilalquilo, tal como bencilo. En otra realización, n es uno. En otra realización, X es bromuro.

En otra realización, el al menos un éster de fórmula 7 es una sal clorhídrica. Un exceso de amina  $R_1R_2NH$  comparado con el éster de Fórmula 7 puede estar presente en la reacción para preparar al menos un ácido carboxílico. En una realización, el al menos un agente de cloración puede ser cloruro de tionilo. En otra realización, la reacción del al menos un ácido carboxílico con al menos un agente de cloración incluye el agregado de una cantidad catalítica de dimetilformamida. Un exceso de agente de cloración del al menos un ácido carboxílico puede estar presente en la reacción para proporcionar el al menos un compuesto de aminoacilo de Fórmula 6. Cuando  $R_6$  es arilalquilo, el arilalquilo del al menos un compuesto de Fórmula 7 se puede segmentar por medio de hidrogenación después de la reacción con la al menos una amina para proporcionar el al menos un ácido carboxílico.

La reacción del al menos un ácido carboxílico con un agente de cloración se puede realizar a una temperatura en el rango de  $55^{\circ}C$  y  $85^{\circ}C$ , como por ejemplo,  $80^{\circ}C$  y  $85^{\circ}C$  y, también,  $55^{\circ}C$ . En una realización, una cantidad adicional de agente de cloración se puede agregar a la reacción para completarla, como por ejemplo, para lograr el nivel de ácido carboxílico menor a 4%. Después de la reacción del al menos un ácido carboxílico con el al menos un agente de cloración, se puede filtrar la suspensión resultante para eliminar sales, tales como sales clorhídricas de *t*-butilamina. El haluro de aminoacilo de Fórmula 6 se puede aislar como una sal de HCl o tratar con un ácido inorgánico, tal como ácido clorhídrico, para preparar una sal de haluro de aminoacilo.

En otra realización, el al menos un haluro de aminoacilo de Fórmula 6 se puede obtener por un método que comprende:

reaccionar al menos un ácido carboxílico de fórmula 8:



8

o una de sus sales,

donde  $\text{R}_5$  se selecciona de alquilo ( $\text{C}_1\text{-C}_6$ ) lineal o ramificado, y  $n$  oscila entre 1 y 4, y

con al menos un agente de cloración para proporcionar un haluro de aminoacilo de Fórmula 6 o una de sus sales.

En otra realización, el al menos un ácido carboxílico de Fórmula 8 es una sal halogenada, tal como, una sal clorhídrica. El tiempo para hacer reaccionar el al menos un compuesto de Fórmula 8 con al menos un agente de cloración puede variar entre 1 a 50 horas, como por ejemplo entre 2 y 45 horas y también entre 1 y 3 horas. El al menos un ácido carboxílico de Fórmula 8 puede tener un tamaño de partícula menor a 150 micrones, como por ejemplo menor a 110 micrones y, también, variar entre 50 y 100 micrones. Un compuesto de Fórmula 8 que tiene determinado tamaño de partículas se puede obtener moliendo el compuesto.

Hacer reaccionar al menos un compuesto de Fórmula 4 con el al menos un compuesto de aminoacilo se puede llevar a cabo en un rango de temperatura de  $0^\circ\text{C}$  a  $30^\circ\text{C}$ , como por ejemplo de  $20^\circ\text{C}$  a  $25^\circ\text{C}$ , de  $10^\circ\text{C}$  a  $17^\circ\text{C}$ , de  $0^\circ\text{C}$  a  $6^\circ\text{C}$  y, también, de  $2^\circ\text{C}$  a  $8^\circ\text{C}$ . El tiempo de reacción puede estar en el rango de 1 hora a 24 horas, como por ejemplo, de 0,5 horas a 4 horas y, también, de 2 horas a 8 horas. En la reacción, se puede usar un exceso de compuesto de aminoacilo respecto de la cantidad de un compuesto de Fórmula 4. En una realización, el exceso puede ser de 3 equivalentes del compuesto de aminoacilo por cada 1 equivalente del al menos un compuesto de Fórmula 4. En otra realización, la proporción del medio acuoso y el al menos un compuesto de Fórmula 4 puede ser de 6 a 1 p/p o 5 a 1 en volumen. En una realización, el compuesto de aminoacilo

se incorpora en o se combina con la solución del al menos un compuesto de Fórmula 4 en un medio acuoso.

En una realización, donde el medio de reacción es un medio acuoso, el pH del medio acuoso se puede ajustar al pH en el rango de 4 y 9, como por ejemplo 5 y 7,5; 6,3 y 6,7; 7,0 y 7,5 y también hasta 7,2. Se puede incorporar agua antes de ajustar el pH. Ajustar el pH puede implicar el agregado de una base, que incluya, sin limitarse a ellos, hidróxido de amonio. La concentración de hidróxido de amonio puede variar entre 25% y 30%. En otra realización, un ácido, tal como un ácido clorhídrico, se puede usar para ajustar el pH. El medio de reacción durante el ajuste del pH puede estar en un rango de temperatura de -5°C y 25°C, como por ejemplo 5°C y 8°C y, también, 0°C y 5°C.

Después del ajuste del pH, al menos un solvente orgánico o mezcla de solventes se puede agregar al medio acuoso. En una realización, la al menos una mezcla orgánica de solventes puede comprenden metanol y cloruro de metileno. La concentración de metanol puede estar en el rango de 5% y 30%, lo cual incluye, sin limitarse a ello, el rango de 20% y 30%. En otra realización, el al menos un solvente orgánico o mezcla de solventes comprende tetrahidrofurano. La temperatura de la mezcla puede variar entre 15°C y 25°C.

En una realización, el medio acuoso se puede extraer con una mezcla de al menos un solvente polar prótico y al menos un solvente aprótico polar. En una realización, el al menos un solvente aprótico polar comprende cloruro de metileno y el al menos un solvente polar prótico comprende metanol. En otra realización, el medio acuoso se extrae con al menos un solvente aprótico polar, tal como cloruro de metileno. La extracción se puede llevar a cabo en un rango de temperatura de -5°C y 25°C, también entre 0°C y 5°C. En otra realización, el pH del medio acuoso se ajusta al rango de 7,0 y 7,5, como por ejemplo 7,2, después

de la extracción. El proceso de extracción se puede repetir, por ejemplo, hasta un máximo de 10 veces.

En una realización, los extractos orgánicos combinados se pueden tratar con un agente secante, tal como, sulfato de sodio. Los extractos orgánicos *también se pueden tratar con carbón vegetal*, tal como Norti CA-1. Los sólidos se eliminan por filtración y así se obtiene una solución. En una realización, la solución se puede concentrar a fin de proporcionar el compuesto de Fórmula 1.

*El compuesto de Fórmula 1 obtenido por reacción se puede cristalizar en al menos un solvente orgánico o mezcla de solventes. En una realización, la al menos una mezcla orgánica de solventes comprende metanol y cloruro de metileno. La cristalización puede ocurrir, por ejemplo, en un rango de temperatura de -15°C y 155°C, como por ejemplo 0°C y 15°C y, también, 2°C y 5°C.*

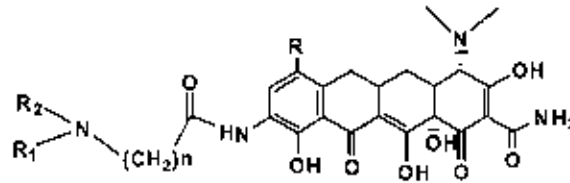
*En otra realización, después de la extracción, la mezcla orgánica resultantes de al menos un solvente polar prótico y al menos un solvente aprótico polar se puede concentrar a fin de proporcionar una suspensión y se puede filtrar para proporcionar al menos un compuesto de Fórmula 1. La concentración y filtración puede, por ejemplo, ocurrir a 0°C y 5°C.*

Un método para preparar un compuesto de Fórmula 1 se puede realizar usando más de 5 gramos de amina de Fórmula 4, como por ejemplo más de 10 gramos, más de 50 gramos, más de 100 gramos, más de 500 gramos, más de 1 kilogramo y, también, más 10 kilogramos.

Una realización revela un compuesto preparado por medio de cualquiera de los métodos descritos aquí, incluso -sin limitarse a ello- un compuesto de Fórmula 1, un compuesto de Fórmula 4, un compuesto de Fórmula 6, un compuesto de Fórmula 7, un compuesto de Fórmula 8 y sus sales. Otra realización incluye una composición que comprende un compuesto preparado por

medio de cualquiera de los métodos descritos en la presente. La composición puede comprender, además, un vehículo aceptable para uso farmacéutico.

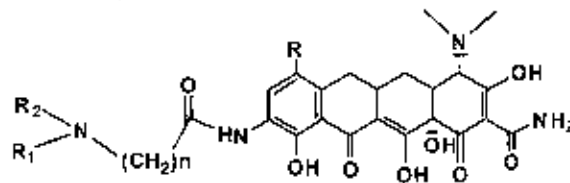
En una realización, la composición puede comprender el al menos un compuesto de fórmula 1:



Fórmula 1

o una de sus sales aceptables para uso farmacéutico.

donde n es 1, R1 y R2, junto con N, forman un grupo t-butilo, y R3 y R4 son, cada uno, metilo. En una realización, la composición puede comprender al menos un compuesto de fórmula 1:



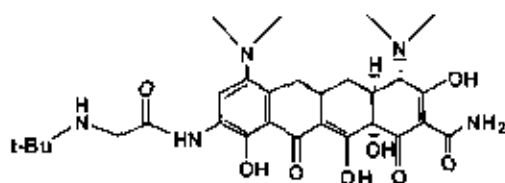
Fórmula 1

o una de sus sales aceptables para uso farmacéutico,

donde R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> se seleccionan, cada uno en forma independiente, de hidrógeno, alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) de cadena lineal y ramificada y cicloalquilo, o R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub>, junto con N, forman un heterociclo; R es -NR<sub>3</sub>R<sub>4</sub>, donde R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> se seleccionan, cada uno en forma independiente, de hidrógeno, alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>) lineal o ramificado; y n oscila entre 1-4, y

es menor del 0,5% del epímero de C4 del al menos un compuesto de Fórmula 1 o una sal aceptable para uso farmacéutico.

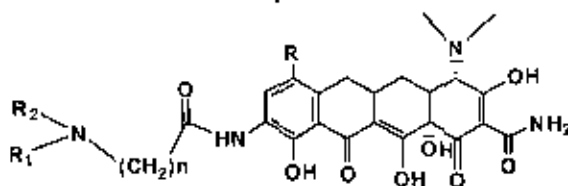
En otra realización, la composición puede comprender Tigeciclina:

**Tigeciclina**

o una de sus sales aceptables para uso farmacéutico, y  
menor a 0,5% del epímero de C4 de Tigeciclina o una de sus sales  
aceptables para uso farmacéutico.

En una realización, el compuesto de Fórmula 1 preparado por cualquiera  
de los métodos descritos en la presente contiene menos de 10% de impurezas,  
según lo determinado por la cromatografía líquida de alta resolución, como por  
ejemplo menos de 5% de impurezas, menos de 2% de impurezas y, también,  
*menos de 1-1,4% de impurezas*. En otra realización, el compuesto de Fórmula 1  
contiene un epímero de C<sub>4</sub> en una cantidad menor a 1%, según lo determinado  
por la cromatografía líquida de alta resolución, como por ejemplo menor a 0,5%  
del epímero de C<sub>4</sub> y, también, menor a 0,2% del epímero de C<sub>4</sub>. En una  
realización, el compuesto de fórmula 1 contiene menos del 1% de minociclina  
según lo determinado por la cromatografía líquida de alto rendimiento, como por  
ejemplo 0,6% de minociclina. En otra realización, el compuesto de Fórmula 1  
contiene menos de 5% de diclorometano, como por ejemplo menos del 2-3% de  
diclorometano.

Una realización de la presente invención proporciona un método para  
preparar al menos un compuesto de fórmula 1:

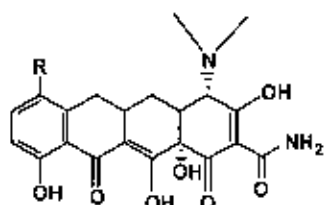
**Fórmula 1**

o una de sus sales aceptables para uso farmacéutico,

donde  $R_1$  y  $R_2$  se seleccionan, cada uno en forma independiente, de hidrógeno, alquilo ( $C_1$ - $C_8$ ) de cadena lineal y ramificada y cicloalquilo, o  $R_1$  y  $R_2$ , junto con N, forman un heterociclo; R es  $-NR_3R_4$ , donde  $R_3$  y  $R_4$  se seleccionan, cada uno en forma independiente, de hidrógeno, alquilo ( $C_1$ - $C_4$ ) lineal y ramificado; y n oscila entre 1-4,

que comprende:

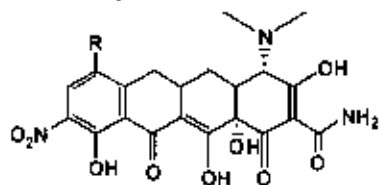
hacer reaccionar al menos un agente nitrante con al menos un compuesto de fórmula 2:



**Fórmula 2**

o una de sus sales,

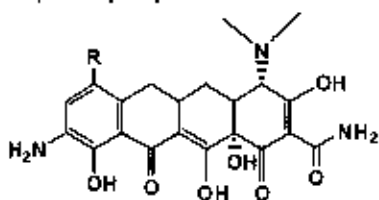
para preparar una suspensión de mezcla de reacción que comprenda al menos un compuesto de Fórmula 3:



**Fórmula 3**

o una de sus sales,

combinar al menos un agente reductor con la suspensión de mezcla de reacción para preparar al menos un compuesto de Fórmula 4,



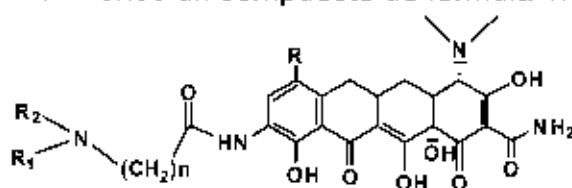
**Fórmula 4**

o una de sus sales, y

hacer reaccionar el al menos un compuesto de Fórmula 4 con al menos un compuesto de aminoacilo en un medio de reacción seleccionado de un medio acuoso, y al menos un solvente básico sin una base reactiva.

El compuesto de fórmula 1 preparado por medio de dicho método puede ser tigeclina.

Otra realización de la presente invención proporciona un método para preparar al menos un compuesto de fórmula 1:



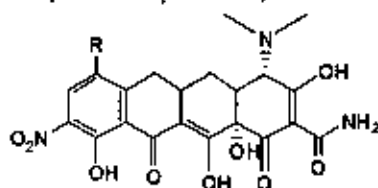
**Fórmula 1**

o una de sus sales aceptables para uso farmacéutico,

donde  $R_1$  y  $R_2$  se seleccionan, cada uno en forma independiente, de hidrógeno, alquilo ( $C_1$ - $C_6$ ) de cadena lineal y ramificada y cicloalquilo, o  $R_1$  y  $R_2$ , junto con N, forman un heterociclo; R es  $-NR_3R_4$ , donde  $R_3$  y  $R_4$  se seleccionan, cada uno en forma independiente, de hidrógeno, alquilo ( $C_1$ - $C_4$ ) lineal y ramificado; y n oscila entre 1-4,

que comprende:

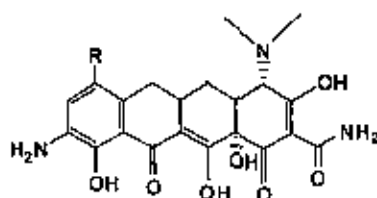
combinar al menos un agente reductor con la suspensión de mezcla de reacción que comprenda, al menos, un compuesto de Fórmula 3:



**Fórmula 3**

o una de sus sales,

para prepara al menos un compuesto de Fórmula 4:



**Fórmula 4**

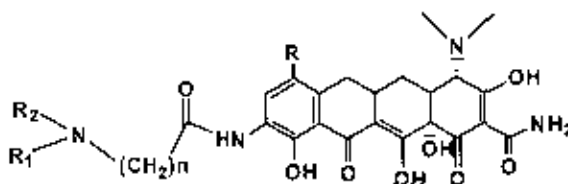
o una de sus sales, y

hacer reaccionar el al menos un compuesto de Fórmula 4 con al menos un compuesto de aminoácido en un medio de reacción seleccionado de un medio acuoso, y al menos un solvente básico sin una base reactiva.

En otra realización, el compuesto de fórmula 1 preparado por medio de dicho método puede ser tigeciclina.

## PURIFICACIÓN

Una realización de la presente invención proporciona un método para purificar al menos un compuesto de Fórmula 1:



**Fórmula 1**

o una de sus sales aceptables para uso farmacéutico,

donde  $R_1$  y  $R_2$  se seleccionan, cada uno en forma independiente, de hidrógeno, alquilo ( $C_1$ - $C_6$ ) de cadena lineal y ramificada y cicloalquilo, o  $R_1$  y  $R_2$ , junto con N, forman un heterociclo; R es  $-NR_3R_4$ , donde  $R_3$  y  $R_4$  se seleccionan, cada uno en forma independiente, de hidrógeno, alquilo ( $C_1$ - $C_4$ ) lineal y ramificado; y n oscila entre 1-4,

que comprende:

combinar el al menos un compuesto de Fórmula 1 con al menos un solvente aprótico polar y, al menos, un solvente prótico para proporcionar una primera mezcla,

mezclar la primera mezcla durante al menos un periodo de tiempo de 15 minutos a 2 horas, por ejemplo, en un rango de temperatura de 0°C y 40°C, y obtener al menos un compuesto de Fórmula 1.

Según se usa en la presente, el término "obtener" hace referencia a un compuesto con un nivel de pureza útil, por ejemplo, sin limitarse a ello, niveles de pureza mayores a 90%, 95%, 96%, 97%, 98% y 99%. El nivel de pureza se puede determinar por medio de cromatografía líquida de alta presión.

En una realización, el método para purificar al menos un compuesto de Fórmula 1 incluye los pasos de:

combinar el al menos un compuesto de Fórmula 1 con al menos un solvente aprótico polar y, al menos, un solvente prótico para proporcionar una primera mezcla,

mezclar la primera mezcla durante un periodo de tiempo en un rango de temperatura de 30°C y 40°C,

enfriar la primera mezcla a un rango de temperatura de 15°C y 25°C y dejarla reposar sin mezclar durante un segundo periodo de tiempo,

enfriar la primera mezcla a un rango de temperatura de 0°C y 6°C y dejarla reposar sin mezclar durante un segundo periodo de tiempo, y

obtener al menos un compuesto de Fórmula 1.

En una realización, el método puede incluir al menos un compuesto de Fórmula 1, donde  $n$  es 1,  $R_1$  es hidrógeno,  $R_2$  es *t*-butilo y  $R_3$  y  $R_4$  son, cada uno, metilo. Otra realización incluye al menos un compuesto de Fórmula 1, donde  $n$  es 1,  $R_1$  y  $R_2$ , en conjunto con  $N$ , forman un grupo pirrolidinilo y  $R_3$  y  $R_4$  son, cada uno, metilo. El al menos un compuesto de Fórmula 1 que se combina con el al menos un solvente aprótico polar y el al menos un solvente polar prótico puede estar en forma de sólido, lechada, suspensión y una solución.

En una realización, el al menos un solvente aprótico se puede seleccionar de acetona, 1,2-dicloroetano, acetato de metilo, metil etil cetona, metil isobutil cetona, cloruro de metileno y acetato de etilo. En otra realización, el al menos un solvente aprótico polar se puede seleccionar de acetona y cloruro de metileno. En otra realización, el al menos un solvente polar prótico se puede seleccionar de metanol, etanol, isopropanol y tbutanol. Y en otra realización, el al menos un solvente aprótico polar puede ser metanol.

La combinación del al menos un solvente aprótico polar y el al menos un solvente polar prótico puede incluir acetona y metanol. Otra realización proporciona una combinación del al menos un solvente aprótico polar, cloruro de metileno, y el al menos un solvente polar prótico, metanol. Y en otra realización, la combinación del al menos un solvente aprótico polar y el al menos un solvente polar prótico puede incluir puede incluir acetato de metilo y metanol. El compuesto de Fórmula 1 puede, por ejemplo, estar combinado con volúmenes iguales del al menos un solvente aprótico polar y el al menos un solvente polar prótico.

En una realización, la primera mezcla se puede mezclar, por ejemplo, durante un primer periodo de tiempo en el rango de 30 minutos y 2 horas, donde la temperatura puede variar entre 15°C y 25°C, luego durante un segundo periodo de tiempo que varíe entre 30 minutos y 2 horas, donde las temperaturas pueden variar entre 0°C y 2°C. En una realización, el primer periodo de tiempo y el segundo periodo de tiempo son de una hora. En una realización, el método puede comprender mezclar la primera mezcla durante al menos un periodo de tiempo que oscile entre 30 minutos y 2 horas a un rango de temperatura de 15°C y 25°C, luego filtrar la primera mezcla y obtener, de este modo, un sólido. El método puede comprender combinar el sólido con al menos un solvente aprótico polar y, al menos, un solvente polar prótico, por ejemplo en volúmenes iguales,

durante un primer período de tiempo que varíe entre 30 minutos y 2 horas a un rango de temperatura de 15°C y 25°C y luego filtrarlo a fin de obtener un segundo sólido. En otra realización, estos pasos de combinado y filtrado se pueden repetir entre 2 y 15 veces.

El método para purificar un compuesto de Fórmula 1 puede comprender además obtener un sólido de la primera mezcla y combinar el sólido con al menos un solvente polar prótico y al menos un solvente aprótico polar, y así obtener una segunda mezcla. La segunda mezcla puede, por ejemplo, comprender metanol y cloruro de metileno en una relación en volumen en el rango de metanol: cloruro de metileno de 1:5 a 1:15. En una realización, la segunda mezcla se puede mezclar en un rango de temperatura que oscile entre 30°C y 36°C y luego se puede filtrar para obtener una solución. En otra realización, la concentración del solvente polar prótico de la solución se puede reducir a un nivel por debajo del 5%, y la solución se puede mezclar, por ejemplo, a un rango de temperatura de 0°C y 6°C, durante un período de tiempo, por ejemplo, que varíe entre 30 minutos y 2 horas antes del filtrado.

En una realización, se puede mezclar la primera mezcla durante un período de tiempo que oscile entre 10 y 20 minutos, por ejemplo, 15 minutos. En una realización, enfriar la primera mezcla a un rango de temperatura de 15°C y 25°C y dejarla reposar sin mezclar pueden suceder durante un segundo período de tiempo que oscile entre 30 minutos y 3 horas, por ejemplo entre 1 hora y 2 horas. La primera mezcla se puede enfriar, también, en un rango de temperatura de 0°C a 6°C y se puede dejar reposar sin mezclado durante un tercer período de tiempo que oscile entre 30 minutos y 2 horas, por ejemplo, 1 hora.

La obtención del compuesto de Fórmula 1 puede incluir filtrar cualquier mezcla descrita aquí a través de un filtro seleccionado de filtros reductores de pirógenos y filtros clarificadores.

Como se revela en la presente, el mezclado puede llevarse a cabo utilizando un dispositivo mecánico de mezclado, por ejemplo un mezclador o agitador. El mezclado también puede efectuarse por solubilidad del compuesto de Fórmula 1 en el sistema de solventes. El aumento de la temperatura puede aumentar la solubilidad.

En una realización, cuando al menos un compuesto de Fórmula 1 va a combinarse con al menos un solvente aprótico polar y al menos un solvente polar prótico, el al menos un compuesto de Fórmula 1 puede utilizarse en forma de sal *aceptable para uso farmacéutico* del mismo. Cuando al menos un compuesto de Fórmula 1 se obtiene como producto del método de la invención, el al menos un compuesto de Fórmula 1 puede recuperarse en forma de sal *aceptable para uso farmacéutico* del mismo.

En otra realización, cuando un compuesto de Fórmula 1 se obtiene por el método de acuerdo con la invención, el compuesto puede convertirse en una sal *aceptable para uso farmacéutico* del mismo por agregado de un ácido.

En una realización, el al menos un compuesto de Fórmula 1 puede ser [4S-(4a,12aa)]-4,7-bis(dimetilamino)-9-[[[t-butilamino)acetil]amino]-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-octahidro-3,10,12,12a-tetrahidroxi-1,11-dioxo-2-naftacen-carboxamida, como sales aceptables para uso farmacéutico, por ejemplo, sal de HCl. En una realización, el al menos un compuesto de Fórmula 1 puede ser [4S-(4a,12aa)]-4,7-Bis(dimetilamino)-9-[[[pirrolidinil)acetil]amino]-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-octahidro-3,10,12,12a-tetrahidroxi-1,11-dioxo-2-naftacen-carboxamida, como sales aceptables para uso farmacéutico, por ejemplo, sal de HCl.

Un método para purificar al menos un compuesto de Fórmula 1 puede ser un método para purificar tigeciclina, que comprende:

combinar tigeciclina con al menos un solvente aprótico polar y al menos un solvente prótico y, así, proporcionar una primera mezcla,

mezclar la primera mezcla durante al menos un periodo de tiempo de, por ejemplo, 15 minutos a 2 horas y en un rango de temperatura de 0°C y 40°C, y obtener la tigeciclina.

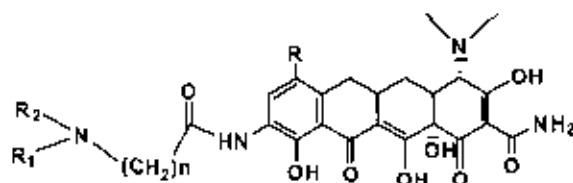
La tigeciclina que se combina con el al menos un solvente aprótico polar y el al menos un solvente polar prótico puede estar en forma de sólido, lechada, suspensión y una solución. En una realización, la tigeciclina obtenida a partir del metanol puede contener menor de 1% del epímero de C4 de tigeciclina o una sal farmacéuticamente aceptable, según lo determinado por la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

El al menos un compuesto de Fórmula 1 obtenido por el método puede contener menos de 3,0% de impurezas, según lo determinado por HPLC, por ejemplo menos de 1,0% de impurezas, por ejemplo menos de 0,7% de impurezas. En otra realización, el al menos un compuesto de Fórmula 1 puede contener menos de 2% del epímero de C4 del compuesto de Fórmula 1 o una de sus sales aceptables para uso farmacéutico, según lo determinado por HPLC, como por ejemplo menor al 1% del epímero de C4, por ejemplo menor al 0,5% del epímero de C4.

El método 1 se puede realizar usando más de 5 gramos de amina de Fórmula 1, como por ejemplo *más de 10 gramos, más de 50 gramos, más de 100 gramos, más de 500 gramos, más de 1 kilogramo y, también, más 10 kilogramos.*

Una realización revela un compuesto preparado por cualquiera de los métodos descritos en la presente, incluso -sin limitarse a ello- un compuesto de Fórmula 1 y tigeciclina. Otra realización incluye una composición que comprende un compuesto preparado por medio de cualquiera de los métodos descritos en la presente. La composición puede comprender, además, un vehículo aceptable para uso farmacéutico.

En una realización, la composición puede comprender el al menos un compuesto de fórmula 1:

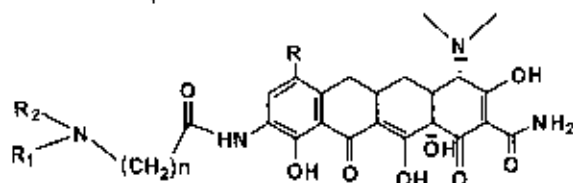


**Fórmula 1**

o una de sus sales aceptables para uso farmacéutico,

donde n es 1, R<sub>1</sub> es hidrógeno, R<sub>2</sub> es t-butilo, R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> son, cada uno, metilo.

Una realización de la presente invención incluye un método para preparar al menos un compuesto de fórmula 1:



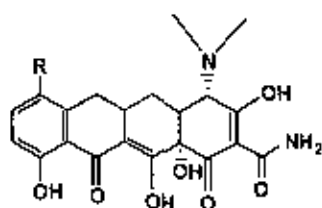
**Fórmula 1**

o una de sus sales aceptables para uso farmacéutico,

donde R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> se seleccionan, cada uno en forma independiente, de hidrógeno, alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) de cadena lineal y ramificada y cicloalquilo, o R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub>, junto con N, forman un heterociclo; R es -NR<sub>3</sub>R<sub>4</sub>, donde R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> se seleccionan, cada uno en forma independiente, de hidrógeno, alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>) lineal y ramificado; y n oscila entre 1-4,

que comprende:

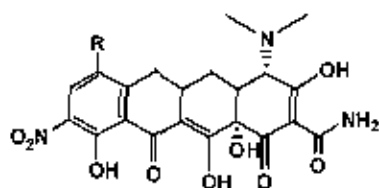
hacer reaccionar al menos un agente nitrante con al menos un compuesto de fórmula 2:



**Fórmula 2**

o una de sus sales,

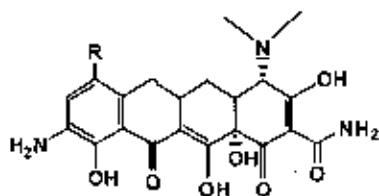
para preparar una mezcla de reacción, tal como, una suspensión de mezcla de reacción, que comprenda un intermediario, como por ejemplo al menos un compuesto de Fórmula 3:



**Fórmula 3**

o una de sus sales,

combinar al menos un agente reductor con la suspensión de mezcla de reacción para preparar un segundo intermediario, como por ejemplo al menos un compuesto de Fórmula 4,



**Fórmula 4**

o una de sus sales,

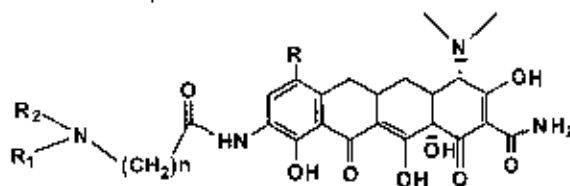
hacer reaccionar el segundo intermediario con al menos un compuesto de aminoacilo en un medio de reacción para obtener al menos un compuesto de fórmula 1. En una realización, el medio de reacción se selecciona de un medio acuoso, y al menos un solvente básico sin una base reactiva. Entre los pasos adicionales se incluye, por ejemplo, al menos uno de los siguientes:

combinar el al menos un compuesto de Fórmula 1 con al menos un solvente aprótico polar y, al menos, un solvente prótico para proporcionar una primera mezcla,

mezclar la primera mezcla durante al menos un período de tiempo de 15 minutos a 2 horas, por ejemplo, en un rango de temperatura de 0°C y 40°C, y

obtener al menos un compuesto de Fórmula 1. En una realización, cualquiera de los intermediarios de los métodos revelados se puede obtener por aislamiento o precipitación. En otra realización, dos o más pasos de los métodos revelados son procedimientos de "un recipiente".

Otra realización de la presente invención incluye un método para preparar al menos un compuesto de fórmula 1:



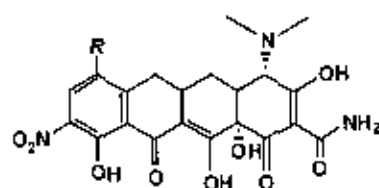
**Fórmula 1**

*o una de sus sales aceptables para uso farmacéutico,*

donde  $R_1$  y  $R_2$  se seleccionan, cada uno en forma independiente, de hidrógeno, alquilo ( $C_1$ - $C_6$ ) de cadena lineal y ramificada y cicloalquilo, o  $R_1$  y  $R_2$ , junto con N, forman un heterociclo; R es  $-NR_3R_4$ , donde  $R_3$  y  $R_4$  se seleccionan, cada uno en forma independiente, de hidrógeno, alquilo ( $C_1$ - $C_4$ ) lineal y ramificado; y  $n$  oscila entre 1-4,

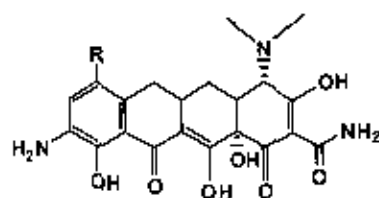
que comprende:

combinar al menos un agente reductor con una mezcla de reacción, como por ejemplo un suspensión de mezcla de reacción, que comprenda, al menos, un compuesto de Fórmula 3:



**Fórmula 3**

o una de sus sales, para preparar al menos un intermediario, tal como un compuesto de Fórmula 4,



**Fórmula 4**

o una de sus sales,

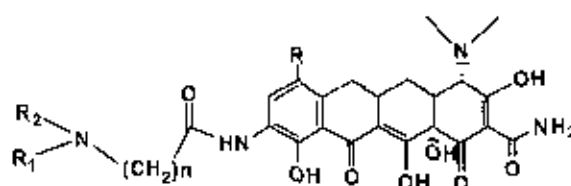
hacer reaccionar el intermediario con al menos un compuesto de aminoacilo en un medio de reacción seleccionado de un medio acuoso para obtener el compuesto de Fórmula 1. En una realización, el medio de reacción se puede seleccionar de al menos un solvente básico sin una base reactiva. Entre los pasos adicionales se incluye, por ejemplo, al menos uno de los siguientes:

combinar el al menos un compuesto de Fórmula 1 con al menos un solvente aprótico polar y, al menos, un solvente prótico para proporcionar una primera mezcla,

mezclar la primera mezcla durante al menos un período de tiempo de 15 minutos a 2 horas, por ejemplo, en un rango de temperatura de 0°C y 40°C, y

obtener al menos un compuesto de Fórmula 1.

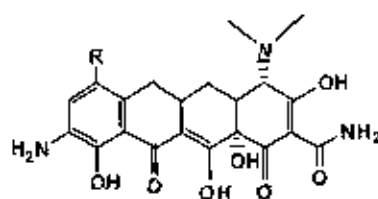
Otra realización de la presente invención incluye un método para preparar al menos un compuesto de fórmula 1:

**Fórmula 1**

o una de sus sales aceptables para uso farmacéutico,

donde  $R_1$  y  $R_2$  se seleccionan, cada uno en forma independiente, de hidrógeno, alquilo ( $C_1$ - $C_6$ ) de cadena lineal y ramificada y cicloalquilo, o  $R_1$  y  $R_2$ , junto con N, forman un heterociclo; R es  $-NR_3R_4$ , donde  $R_3$  y  $R_4$  se seleccionan, cada uno en forma independiente, de hidrógeno, alquilo ( $C_1$ - $C_4$ ) lineal y ramificado; y n oscila entre 1-4, que comprende:

reaccionar al menos un compuesto de fórmula 4:

**Fórmula 4**

o una de sus sales,

con al menos un compuesto de aminoacilo en un medio de reacción, por ejemplo, seleccionado de un medio acuoso, y al menos un solvente básico sin una base reactiva. Entre los pasos adicionales se puede incluir al menos uno de los siguientes:

combinar el al menos un compuesto de Fórmula 1 con al menos un solvente aprótico polar y, al menos, un solvente prótico para proporcionar una primera mezcla,

mezclar la primera mezcla durante al menos un período de tiempo de 15 minutos a 2 horas, por ejemplo, en un rango de temperatura de  $0^{\circ}\text{C}$  y  $40^{\circ}\text{C}$ , y

obtener al menos un compuesto de Fórmula 1.

Cualquiera de estos métodos revelados para preparar un compuesto de Fórmula 1 puede ser un método para preparar un compuesto de Fórmula 1, donde  $n$  es 1,  $R_1$  es hidrógeno,  $R_2$  es t-butilo y  $R_3$  y  $R_4$  son, cada uno, metilo.

### COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS

La frase "composición farmacéutica" según se usa en la presente es una composición medicinal. La composición farmacéutica puede contener al menos un vehículo aceptable para uso farmacéutico.

La frase "excipiente aceptable para uso farmacéutico" tal como se usa en la presente hace referencia a vehículos farmacéuticos adecuados para la administración de los compuestos de la invención, que incluyen vehículos que los expertos en la materia consideran adecuados para el modo particular de administración. Por ejemplo, algunas soluciones o suspensiones usadas para aplicación parenteral, intradérmica, subcutánea o tópica pueden incluir un diluyente estéril (por ejemplo, agua para inyección, solución salina, aceite fijo o similares); un aceite vegetal (por ejemplo, aceite de sésamo, aceite de coco, aceite de maní, aceite de semilla de algodón y similares); un vehículo graso sintético (por ejemplo, oleato de etilo, polietilenglicol, glicerina, propilenglicol y similares, que incluyen otros solventes sintéticos); agentes antimicrobianos (por ejemplo, alcohol bencílico, metil parabenos y similares); antioxidantes (por ejemplo, ácido ascórbico, bisulfito de sodio y similares); agentes quelantes (por ejemplo, ácido etilendiaminetetracético (EDTA) y similares); bufferes (por ejemplo, acetatos, citratos, fosfato y similares); y/o agentes para el ajuste de la tonicidad (por ejemplo, cloruro de sodio, dextrosa y similares) o sus mezclas. A modo de otro ejemplo, cuando la administración es intravenosa, los vehículos adecuados incluyen solución salina fisiológica, solución salina protegida con fosfato (PBS) y solución con agentes espesantes y solubilizantes tales como glucosa, polietilenglicol, polipropilenglicol y similares y sus mezclas.

A modo de ejemplo no limitante, la tigeciclina se puede combinar opcionalmente, con uno o más excipientes aceptables para uso farmacéutico y se pueden administrar oralmente en forma de comprimido, cápsula, polvos dispersables, gránulos o suspensiones que contengan, por ejemplo, de 0,05% a 5% del agente de suspensión, jarabes que contengan, por ejemplo de 10% a 50% de azúcar y elixires que contengan, por ejemplo, de 20% a 50% de etanol y similares, o en forma parenteral por medio de soluciones inyectables estériles o suspensiones que contengan de 0,05% a 5% de agente de suspensión en un medio isotónico. Tales preparaciones farmacéuticas pueden contener, por ejemplo, de 25% a 90% del ingrediente activo en combinación con el vehículo, más usualmente entre 5% aproximadamente y 60% en peso. Otras formulaciones se revelan en las patentes de EE.UU. N° 5.494.903 y 5.529.990, incorporadas a la presente a modo de referencia.

Los términos "sal aceptable para uso farmacéutico" se refieren a sales con adición de ácidos o sales con adición de base de los compuestos de la presente invención. Una sal aceptable para uso farmacéutico es cualquier sal que retenga la actividad del compuesto madre y que no imparta ningún efecto nocivo o indeseable al sujeto a quien se le administra el compuesto y en el contexto en el que se administra. Las sales aceptables para uso farmacéutico incluyen complejos de metal y sales de ácidos inorgánicos y orgánicos. Las sales aceptables para uso farmacéutico incluyen sales metálicas tales como sales de aluminio, calcio, hierro, magnesio, manganeso y sales complejas. Algunas sales aceptables para uso farmacéutico incluyen sales de ácido acético, aspártico, alquilsulfónico, arilsulfónico, acetilico, bencensulfónico, benzoico, bicarbónico, bisulfúrico, bitartárico, butírico, de edetato de calcio, camsílico, carbónico, clorobenzoico, cilexetilico, cítrico, edético, edisílico, estólico, esílico, esítico, fórmico, fumárico, glucéptico, glucónico, glutámico, glicólico glicolilarsanílico,

hexámico, hexilresorcinoico, hidrabámico, bromhídrico, clorhídrico, yodhídrico, hidroxinaftoico, isetiónico, láctico, lactobiónico, maleico, málico, malónico, mandélico, metansulfónico, metilnitríco, metilsulfúrico, mícico, mucónico, napsílico, nítrico, oxálico, p-nitrometansulfónico, pamoico, pantoténico, fosfórico, monohidrógeno fosfórico, dihidrógeno fosfórico, ftálico, poligalactourónico, propiónico, salicílico, esteárico, succínico, sulfámico, sulfanílico, sulfónico, sulfúrico, estannoso, tartárico, teóclico, toluensulfónico y similares. Las sales aceptables para uso farmacéutico pueden derivan de aminoácido, por ejemplo, cisteína, sin limitarse a ella. Se pueden hallar otras sales aceptables, por ejemplo, en Stahl et al., *Pharmaceutical Sals: Properties, Selection, y Use*, Wiley-VCH; 1ª edición (15 de junio de 2002).

A excepción de los ejemplos y de los casos en los que se indique lo contrario, todos los números usados en la memoria y reivindicaciones deben interpretarse como modificados por el término "aproximadamente". De esta manera, a menos que se indique lo contrario, los parámetros numéricos indicados en la presente memoria descriptiva y en las reivindicaciones anexas son aproximaciones que pueden variar según las propiedades deseadas que se pretenden lograr por medio de la presente invención. Por último, y sin intenciones de limitar la aplicación de la doctrina de los equivalentes al alcance de las reivindicaciones, cada parámetro numérico debería interpretarse considerando el número de dígitos significativos y las técnicas de redondeo habitual.

A pesar de que los rangos y parámetros numéricos que constituyen el amplio alcance de la revelación son aproximaciones, los valores numéricos expresados en los ejemplos específicos son lo más precisos posible. Sin embargo, todo valor numérico contiene inherentemente ciertos errores que provienen, esencialmente, de la desviación estándar de las respectivas mediciones de las pruebas.

Los siguientes ejemplos tienen por objetivo ilustrar la invención de una manera no limitante.

**EJEMPLOS**

**NITRACIÓN**

La minociclina se preparó de acuerdo con el método descrito en la patente de EE.UU. Nº 3.226.436.

Los análisis por HPLC se realizaron en las siguientes condiciones:

|                 |                                                                                                                                                                                                                                                |
|-----------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Columna:        | Inertsil ODS3 5 $\mu$ m, 25 x 0,46 cm                                                                                                                                                                                                          |
| Fase móvil:     | 80% A + 20% B, donde<br>A = 90% (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,05 M + 5 ml de trietilamina/l fosfato + H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> a pH 6)/10% de acetonitrilo ajustado a pH 3,0 con H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub><br>B = Acetonitrilo |
| Caudal de flujo | 1,0 ml/min                                                                                                                                                                                                                                     |
| Detección       | 250 nm                                                                                                                                                                                                                                         |

**Ejemplo Comparativo 1: Preparación de 9-nitrominociclina**

Este ejemplo describe la nitración de minociclina donde el producto de la nitración se aisló.

Se incorporaron 13,44 gramos de p-clorobencensulfonato de minociclina (es decir, p-clorobencensulfonato de [4S-(4alfa,12aalfa)]-4,7-bis(dimetilamino)-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-octahidro-3,10,12,12a-tetrahidroxi-1,11-dioxo-2-naftacenecarboxamida), lentamente y agitando, a 50 ml de ácido sulfúrico concentrado. La solución se enfrió a 0-15°C. Se agregó ácido nítrico (90%, 0,6 ml) lentamente y se agitó la solución a 0-15°C durante 1-2 horas hasta que la reacción se completó, según lo determinado por HPLC. La solución que contenía el sulfato de 9-nitrominociclina intermedio (es decir, sulfato de 4S-(4alfa,12aalfa)-9-nitro]-4,7-bis(dimetilamino)-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-octahidro-3,10,12,12a-

tetrahidroxi-1,11-dioxo-2-naftacenecarboxamida) se transfirió agitando a 300 g de hielo y agua durante 20 minutos. El pH del templado se ajustó a 5,0-5,5 con 28% de hidróxido de amonio acuoso mientras se mantuvo la temperatura en 0-8°C. Se filtró el precipitado y se lavó con agua (2 x 10 ml). El sólido se secó al vacío bajo un flujo de nitrógeno y se obtuvo 9 g de sulfato de 9-nitrominociclina bruto.

El análisis (área %) por HPLC mostró una pureza de 90% con un contenido de epímero de C4 de 1,5%. MS(FAB): m/z 503 (M+H), 502 (M+). El producto se aisló por precipitación en su punto isoelectrico a partir de una solución acuosa. El rendimiento molar del sulfato bruto fue de 45%.

La Tabla 1 muestra los datos de otros procesos de nitración:

**Tabla 1**

| Nitrominociclina | Impurezas | Mínociclina (µg/mg) | Rendimiento molar (%) |
|------------------|-----------|---------------------|-----------------------|
|                  |           |                     |                       |
| A                | 43,15     | 3,62                | 38                    |
| B                | 27,88     | 5,5                 | 34                    |

Se observa que el aislamiento de 9-nitrominociclina proporcionó una gran cantidad de impurezas.

#### Ejemplo Comparativo 2: Preparación de 9-nitrominociclina

Este ejemplo describe la nitración de minociclina donde se aisló el producto de la nitración.

Se equipó un balón de vidrio de bocas múltiples de 2 l con un agitador mecánico, una termocupla, un tubo para agregado de líquidos, una línea de nitrógeno y una salida de gases a un separador cáustico al 30% (en peso). El

balón se cargó con ácido sulfúrico 66°Be (1,507 g, 819 ml, 15 moles). La solución se enfrió a 0-2°C. Se le agregó HCl de minociclina (clorhidrato de minociclina) (92,7% de potencia, 311 g, 0,58 moles) al ácido sulfúrico durante 0,7 horas a 0-14°C, agitando mientras tanto. Después del agregado, la mezcla se agregó a 0°C durante 0,5 horas y se obtuvo una solución amarilla. Se agregó ácido nítrico (95,9% de contenido de nitrato, 48 g, 32 ml, 0,73 moles, 1,25 equivalentes de mol) durante 3 horas mientras se mantenía la mezcla a 0-2°C. La mezcla se agitó a 0°C durante 0,3 horas (solución de color rojo oscuro/negro). El análisis (área %) por HPLC mostró: 0% de minociclina, 75,6% de 9-nitrominociclina, 8,2% de impureza individual mayor (LSI); tiempo relativo de retención para la minociclina (RRT) = 2,08.

Se equipó un balón de vidrio de bocas múltiples de 22 l con un agitador mecánico, termopar y un condensador con protección de nitrógeno. El balón se cargó con 6,704 g (8,540 ml) de isopropanol (IPA) y 1,026 g (1,500 ml) de heptanos. La solución se enfrió a 0-5°C. La mezcla de reacción de 9-nitrominociclina se transfirió al balón de 22 l durante 2 horas a 0-39°C y se obtuvo una suspensión amarilla. La temperatura de la suspensión se mantuvo a 34-39°C durante 2 horas y luego se enfrió a 20-34°C y se agitó a 20-34°C durante 14,6 horas.

Se preparó una solución de isopropanol 3,028 g (3,857 ml) y heptanos 660 g (965 ml) y se la mantuvo a 20-25°C (IPA:heptanos 4:1 en volumen). La suspensión se filtró sobre un embudo Büchner de 30 cm de diámetro con papel de filtro Whatman N° 1 al vacío y con protección de nitrógeno. La torta húmeda resultante se transfirió a un balón Erlenmeyer de vidrio de 4 l equipado con un agitador mecánico y protección de nitrógeno. La torta se suspendió agregándole 1,608 ml de la solución preparada de IPA/heptanos durante 0,5 horas a 23-26°C.

La suspensión se filtró nuevamente, tal como se escribió arriba. La torta húmeda se volvió a suspender dos veces más como se indicó anteriormente (un total de 3 suspensiones). Después de la última filtración, la torta se mantuvo al vacío bajo protección de nitrógeno durante 0,2 horas. El producto se secó a 40°C bajo un vacío de 23-11 mmHg durante 48 horas hasta una pérdida del valor de de secado (PVS, 80°C, 1 hora, > 49 mmHG de vacío) de 1,54. El peso del sulfato de 9-nitrominociclina obtenido fue de 380,10 g, la Concentración por HPLC fue de 76,3% (como sal disulfato), el total de impurezas fue de 34,6%, la impureza individual mayor (LSI) fue de 9,46% (RRT= 0,94). El rendimiento del HCl de minociclina fue de 86%. El rendimiento corregido a la concentración del producto y el material de partida: = 71%

Se observa que el aislamiento del compuesto de 9-nitrominociclina proporcionó un producto con gran porcentaje de impurezas.

### Ejemplo 1

La tabla 2 a continuación muestra los experimentos de nitración realizados usando el procedimiento revelado en el Ejemplo Comparativo 2, donde se modificaron las siguientes variables: tiempo de adición de ácido nítrico; temperatura de reacción, equivalentes molares del ácido nítrico (con respecto al HCl de minociclina) y velocidad de agitación. De acuerdo con los métodos revelados en la presente, ninguna de estas reacciones se templó o se sometió a un tratamiento final para aislar el producto. La única herramienta analítica usada fue análisis por HPLC

Tabla 2

| Tiempo de adición de $\text{HNO}_3$ (horas) | Temperatura de reacción ( $^{\circ}\text{C}$ ) <sup>1</sup> | Equivalente molar de $\text{HNO}_3$ | Minociclina (área %) | 9-nitro (área %) | Impurezas totales (área %) | RRT (tiempo de retención de minociclina) 0,44 (área %) | RRT (tiempo de retención de minociclina) 0,51 (área %) | RRT (tiempo de retención de minociclina) 0,57 (área %) | RRT (tiempo de retención de minociclina) 1,23 (área %) |
|---------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|-------------------------------------|----------------------|------------------|----------------------------|--------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|
| 2                                           | 0                                                           | 1,09                                | 7,6                  | 69,7             | 22,7                       | 0,8                                                    | 3,8                                                    | 5,7                                                    | 9,8                                                    |
| 2,25                                        | 0                                                           | 1,2                                 | 5,2                  | 70,3             | 24,5                       | 0,4                                                    | 4,3                                                    | 6,9                                                    | 10,8                                                   |
| 2,5                                         | 0                                                           | 1,3                                 | 2,4                  | 68,2             | 29,4                       | 0,0                                                    | 5,4                                                    | 8,9                                                    | 12,9                                                   |
| 2,75                                        | 0                                                           | 1,43                                | 0,0                  | 65,6             | 34,4                       | 0,0                                                    | 6,7                                                    | 11,2                                                   | 14,0                                                   |
| 2                                           | 0                                                           | 1,36                                | 4,0                  | 55,0             | 41,0                       | 0,3                                                    | 6,5                                                    | 11,1                                                   | 17,0                                                   |
| 2,25                                        | 0                                                           | 1,5                                 | 0,7                  | 50,6             | 48,7                       | 0,0                                                    | 7,2                                                    | 11,3                                                   | 19,0                                                   |
| 2,2                                         | 20                                                          | 1,36                                | 7,5                  | 54,3             | 38,2                       | 2,8                                                    | 8,6                                                    | 15,3                                                   | 5,1                                                    |
| 2,45                                        | 20                                                          | 1,5                                 | 4,0                  | 52,0             | 44,0                       | 2,9                                                    | 10,0                                                   | 17,7                                                   | 5,6                                                    |
| 2,7                                         | 20                                                          | 1,56                                | 2,7                  | 52,0             | 45,3                       | 3,3                                                    | 11,0                                                   | 19,4                                                   | 6,2                                                    |
| 0,25                                        | 0                                                           | 1,36                                | 1,6                  | 56,7             | 41,7                       | 6,3                                                    | 0,0                                                    | 13,9                                                   | 18,4                                                   |
| 0,5                                         | 0                                                           | 1,62                                | 0,8                  | 43,8             | 55,4                       | 5,3                                                    | 0,0                                                    | 24,6                                                   | 23,2                                                   |
| 0,8                                         | 0                                                           | 1,3                                 | 2,1                  | 63,4             | 34,5                       | 3,5                                                    | 0,0                                                    | 9,4                                                    | 18,2                                                   |
| 1                                           | 0                                                           | 1,62                                | 0,7                  | 43,5             | 55,8                       | 5,8                                                    | 0,0                                                    | 21,5                                                   | 23,5                                                   |
| 2,4                                         | 0                                                           | 1,3                                 | 2,2                  | 60,6             | 37,2                       | 5,7                                                    | 0,0                                                    | 12,8                                                   | 15,3                                                   |
| 3                                           | 0                                                           | 1,62                                | 0,4                  | 43,3             | 56,3                       | 9,3                                                    | 0,0                                                    | 23,7                                                   | 19,7                                                   |
| 1,6                                         | 0                                                           | 1,3                                 | 4,6                  | 60,9             | 34,5                       | 3,1                                                    | 0                                                      | 9,5                                                    | 21                                                     |
| 2                                           | 0                                                           | 1,62                                | 0                    | 48,5             | 51,5                       | 5,1                                                    | 0                                                      | 16,1                                                   | 26,8                                                   |
| 2,8                                         | 5                                                           | 1,38                                | 1,8                  | 71,9             | 26,3                       | 3,8                                                    | 0                                                      | 8                                                      | 12,5                                                   |
| 3,1                                         | 5                                                           | 1,58                                | 0                    | 60               | 40                         | 6,1                                                    | 0                                                      | 15,6                                                   | 15,4                                                   |
| 2,4                                         | 5                                                           | 1,07                                | 3,6                  | 74,8             | 21,6                       | 1,9                                                    | 0                                                      | 4,1                                                    | 11,1                                                   |
| 3                                           | 5                                                           | 1,33                                | 0                    | 70               | 30                         | 4,2                                                    | 9,3                                                    | 0                                                      | 14,9                                                   |

<sup>1</sup> Sólo se controló la temperatura de baño en dichas reacciones debido al tamaño del recipiente.

<sup>2</sup> La reacción sucedió a 50% en peso de la concentración de minociclina original.

<sup>3</sup> Se agitó enérgicamente en comparación con el resto de los experimentos.

<sup>4</sup> Se agregó  $\text{HNO}_3$  al 50% en peso en  $\text{H}_2\text{SO}_4$ .

Se observa que, a pesar de las varias condiciones usadas, la cantidad de minociclina estuvo presente en una cantidad menor a 10% y en ciertas condiciones, se la eliminó notablemente.

### **Ejemplo 2**

También se realizaron experimentos que modificaron la reacción de nitración, el templado de la reacción y el tratamiento final de la reacción de nitración. Los experimentos se llevaron a cabo usando el procedimiento detallado en el Ejemplo Comparativo 2, pero con modificaciones en las siguientes variables: tiempo de adición del ácido nítrico, temperatura de reacción, equivalentes molares del ácido nítrico (con respecto al HCl de minociclina), temperatura del templado, composición de la solución de templado, tiempo de adición de la mezcla de reacción para templar la solución y método de lavado de la torta aislada. Los datos se muestran a continuación en la Tabla 3. La única herramienta analítica usada fue análisis por HPLC.

Tabla 3

| Tiempo de adición de HNO <sub>3</sub> (horas) | Tempe-ratura de reacción (°C) <sup>1</sup> | Equiva-lente molar del HNO <sub>3</sub> | Concent. (sol. de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> %) | Impur. totales (%) | LSI (impureza individual mayor) (%) | Compos. de la solución de templado <sup>2</sup> | Tempe-ratura del templado (°C) | Tiempo de adición del templado (horas) | Método de lavado <sup>3</sup> | Rend. (corr., %) <sup>4</sup> |
|-----------------------------------------------|--------------------------------------------|-----------------------------------------|-----------------------------------------------------|--------------------|-------------------------------------|-------------------------------------------------|--------------------------------|----------------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| 4, 6                                          | 5                                          | 1, 67                                   | 62, 7                                               | 40, 1              | 21, 6                               | IPA/hep                                         | 0                              | 0, 1                                   | 1                             | 60                            |
| 4, 6                                          | 5                                          | 1, 67                                   | 61, 0                                               | 39, 7              | 18, 8                               | IPA/hep                                         | 34                             | 0, 1                                   | 1                             | 55                            |
| 5, 1                                          | 5                                          | 1, 75                                   | 55, 8                                               | 36, 2              | 18, 3                               | IPA                                             | 0                              | 0, 2                                   | 1                             | 56                            |
| 5, 1                                          | 5                                          | 1, 75                                   | 56, 0                                               | 38, 9              | 18, 2                               | IPA                                             | 34                             | 0, 2                                   | 1                             | 52                            |
| 3                                             | 5                                          | 1, 63                                   | 75, 4                                               | 29, 5              | 19, 1                               | IPA/hep                                         | 0                              | 1                                      | 1                             | 70                            |
| 3                                             | 5                                          | 1, 63                                   | 74, 8                                               | 27, 8              | 18, 9                               | IPA/hep                                         | 34                             | 1                                      | 1                             | 79                            |
| 3                                             | 5                                          | 1, 51                                   | 83, 6                                               | 22, 2              | 13, 0                               | IPA                                             | 0                              | 1                                      | 1                             | 64                            |
| 3                                             | 5                                          | 1, 51                                   | 84, 8                                               | 22, 4              | 12, 9                               | IPA                                             | 34                             | 1                                      | 1                             | 102                           |
| 3, 5                                          | -5                                         | 1, 38                                   | 84, 3                                               | 7, 7               | 7, 2                                | IPA/hep                                         | 0 <sup>5</sup>                 | 2                                      | 1                             | 96                            |
| 3, 5                                          | -5                                         | 1, 38                                   | 101, 8                                              | 11, 4              | 8, 3                                | IPA/hep                                         | 0 <sup>5</sup>                 | 2                                      | 2                             | 104                           |

<sup>1</sup> Sólo se controló la temperatura de baño en dichas reacciones debido al tamaño del recipiente.

<sup>2</sup> Cuando se usó IPA como templado, se agregaron luego los heptanos para obtener la composición de la mezcla de templado original.

<sup>3</sup> Método de lavado 1: la torta húmeda se lavó sobre le filtro con 4:1 IPA: heptanos (vol.). Método de lavado 2: la torta húmeda se suspendió tres veces con IPA:heptanos 4:1 (vol.). El método de lavado N° 2 usó un 20% de solución de lavado que el método N° 1.

<sup>4</sup> El rendimiento se corrigió por la concentración del producto y el material de partida.

<sup>5</sup> Se comenzó el templado a 0°C, luego se calentó de inmediato a 34°C y se mantuvo a 34°C durante el resto del templado.

En los datos de la Tabla 3 se observa que el rendimiento fue de, al menos, 50%.

### Ejemplo 3

Este Ejemplo describe los resultados de la variación de la cantidad de ácido nítrico (en equivalentes), necesitada para el paso de nitración. El ácido nítrico se tituló a 89,5% y la cantidad usada se corrigió en consecuencia.

Se realizaron tres ensayos. En el ensayo 1 se usó un equivalente de 1,25 de ácido nítrico, en el ensayo 2, un equivalente de 1,09 y en el Ensayo 3 se usó un equivalente de 1,00 de ácido nítrico.

El análisis de finalización por HPLC del Ensayo 1 no mostró restos de minociclina, mientras que el análisis del Ensayo 2 mostró un 2,5% de material de partida sin reaccionar. Ambas reacciones se hidrogenaron y luego se convirtieron sal clorhídrica de aminominociclina usando el procedimiento SLP.

El producto hidrogenado 1 (del Ensayo 1) mostró un contenido de minociclina de 0,37%; Concentración = 83,0%, total de impurezas= 3,20%, impurezas individuales= 0,52%, contenido de epímeros = 1,1%.

El producto hidrogenado 2 (del Ensayo 2) mostró un contenido de minociclina de 1,6%; Concentración = 84,2%, total de impurezas= 4,00%, impurezas individuales= 0,35%, contenido de epímeros = 1,0%.

Ensayo 3: Concentración = 83,0%; total de impurezas = 5,0%; Impurezas individuales = 2,7%; contenido de epímeros = 1,1%.

## REDUCCIÓN

Los análisis por HPLC se realizaron en las siguientes condiciones:

|                 |                                                                                                                                                                                                                                                   |
|-----------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Columna:        | Inertsil ODS3 5 µm, 25 x 0,46 cm                                                                                                                                                                                                                  |
| Fase móvil:     | 80% A + 20% B, donde<br>A = 90% (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,05 M + 5 ml de trietilamina/l de fosfato + H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> a pH 6)/10% de acetonitrilo ajustado a pH 6,0 con H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub><br>B = Acetonitrilo |
| Caudal de flujo | 1,0 ml/min                                                                                                                                                                                                                                        |
| Detección       | 250 nm                                                                                                                                                                                                                                            |

### Ejemplo 1

Este Ejemplo describe una reacción de hidrogenación donde el intermediario de a 9-nitrominociclina no se aisló.

Se agregaron 10,1 gramos de p-clorobencensulfonato de minociclina, lentamente y agitando, a 27 ml de ácido sulfúrico concentrado. La solución se enfrió a 0-2°C. Se agregó ácido nítrico (90%, 0,6 ml) lentamente y se agitó la solución a 0-2°C durante 1-2 horas hasta que la reacción se completó, según lo determinado por HPLC. Una vez completa la nitración, la solución que contenía el sulfato de 9-nitrominociclina intermedio se transfirió agitando a 150 ml de isopropanol y 1200 ml de metanol, mientras se mantenía la temperatura por debajo de los 10-15°C. La solución se hidrogenó a 26-28°C a 40 psi durante 3 horas en presencia de 10% de paladio sobre carbono como catalizador, que tenía una humedad de 50%. Después de la hidrogenación, el catalizador se filtró y la solución se vertió lentamente en 150 ml de isopropanol, agitando a 0-5°C. El sólido (3,4 g) se obtuvo mediante filtración. El análisis por HPLC mostró una pureza bruta de 90 % (área %). El epímero de C<sub>4</sub> estuvo presente en una cantidad de 0,9%. MS(FAB): m/z 473 (M+H), 472 (M+).

### Ejemplo 2

Este Ejemplo describe una reacción de hidrogenación donde el intermediario de a 9-nitrominociclina no se aisló.

Se agregaron 84,3 gramos de p-clorobencensulfonato de minociclina, lentamente y agitando, a 368 gramos de ácido sulfúrico concentrado. La solución se enfrió a 10-15°C. Lentamente, se le agregó ácido nítrico (6 ml, fumante). La solución se agitó a 10-15°C durante 1 a 2 horas, hasta que se completó la reacción según lo determinado por HPLC. Una vez completa la nitración, la solución que contenía el sulfato de 9-nitrominociclina intermedio se transfirió agitando a 0,3 kg de metanol, mientras se mantenía la temperatura por debajo de los 10-15°C. La solución se hidrogenó a 26-28°C a 50 psi durante 2-3 horas en presencia de 10% de paladio sobre carbono como catalizador, que tenía una humedad de 50%. Después de la hidrogenación, el catalizador se filtró y la

solución se vertió lentamente en 0,65 kg de isopropanol y 0,3 kg de n-heptano agitando a 0-5°C. El sólido se obtuvo mediante filtración.

El sólido húmedo se disolvió en 100 gramos de agua a 0-5°C. La mezcla se agitó y la fase orgánica se separó y desechó. Se le agregó a la fase acuosa 14,4 gramos de HCl concentrado. El pH de la solución se ajustó a  $4,0 \pm 0,2$  con hidróxido de amonio. Se agregaron 100 mg de sulfito de sodio y la solución se sembró con 100 mg de 9-aminociclina. La mezcla se agitó durante 4 horas a 0-5°C y el producto se filtró y se secó para proporcionar 28,5 gramos de. La pureza según HPLC (área %) fue de 96,5%, con 0,9% de epímero de C4. MS(FAB): m/z 473 (M+H), 472 (M+). Rendimiento :54,2%.

#### Ejemplo Comparativo 1

Este Ejemplo describe una reacción de hidrogenación donde se aisló el intermediario de a 9-nitrominociclina.

Se colocaron 52,0 kg de HCl de minociclina (sal clorhídrica de minociclina) en 4,8 partes de ácido sulfúrico a 66° Be a un temperatura de 15°C en un recipiente de 300 galones y se agitó para eliminar el HCl. Después de 3 horas y 20 minutos, se colocaron 7,48 kg de ácido nítrico, 100% fumante (95,9% de contenido de nitrato, 1,26 equivalentes).

El análisis por HPLC indicó un resto de minociclina >1%. De esta forma, 0,31 kg de ácido nítrico, fumante 100% (95,5 contenido de nitrato, 0,05 equivalentes) se agregaron a la mezcla. El análisis por HPLC siguió indicando un resto de minociclina >1%. De esta forma, 0,74 kg de ácido nítrico, fumante 100% (95,5 contenido de nitrato, 0,12 equivalentes) se agregaron a la mezcla. Nuevamente, HPLC mostró un resto de minociclina >1%, por lo tanto, se volvieron a agregar 1,11 kg de ácido nítrico, fumante 100% (95,5 % contenido de nitrato, 0,19 equivalentes), después lo cual el resto de minociclina fue <1%.

La mezcla de reacción de nitración se transfirió a una solución de 21,5 partes de IPA/3,3 partes de heptano (1120 kg IPA/171 kg de heptano) a 0-36°C. Se filtró la suspensión (tiempo de filtración prolongado), se lavó con IPA/heptano 4:1 y se secó a no más de 40°C para obtener una pérdida durante el secado (LOD) de no más de 6%, lo cual proporcionó 70,9 kg de sal sulfato (rendimiento bruto de 97%) para usar en una reacción de reacción.

### Ejemplo 3

Este Ejemplo describe una reacción de hidrogenación donde el intermediario 9-nitrominociclina no se aisló.

Se colocaron 25,0 kg de HCl de minociclina (94,4% de potencia) en 7,3 partes de ácido sulfúrico (183 kg) a 66° Be a una temperatura de 5 a 15°C en un recipiente de 100 galones y se agitó para eliminar el HCl. Se agregaron 2,5015 kg de ácido nítrico, 85% (86,% de contenido de nitrato, 1,25 equivalentes) al recipiente, después de 78 minutos a 9-15°C.

El análisis por HPLC indicó un resto de minociclina >1%. Otros 0,261 kg de ácido nítrico, 85% (86,6% de contenido de nitrato, 0,13 equivalentes) se agregaron a la mezcla. Dado que HPLC volvió a indicar un resto de minociclina >1%, se agregaron otros 0,261 kg de ácido nítrico, 85% (86,6% de contenido de nitrato, 0,13 equivalentes) a la mezcla. Dado que HPLC volvió a indicar un resto de minociclina >1%, se agregaron otros 0,174 kg de ácido nítrico, 85% (86,6% de contenido de nitrato, 0,09 equivalentes) a la mezcla, después de lo cual se vio que la reacción llegó a una meseta con 1,7% del material de partida de minociclina.

La mezcla de nitración se colocó en 4,2 partes de metanol a -20-10°C. El lote templado se ajustó a 410°C y se usó de esta manera en la reacción de reducción.

### **Ejemplo Comparativo 2**

Este Ejemplo describe una reacción de hidrogenación donde se aisló el intermediario de a 9-nitrominociclina.

Se colocaron 104 kg de HCl de minociclina (sal clorhídrica de minociclina) (potencia de 90,3%) en 4,8 partes de ácido sulfúrico (502 kg) a 66°Be a una temperatura de 0-10°C en un recipiente de 300 galones y se agitó para eliminar el HCl. Se colocaron 15,2 kg de ácido nítrico fumante (100,4%, 1,25 equivalentes) durante 3 horas a 0-6°C, 100 rpm. Dado que HPLC mostró un resto de minociclina >1%, se volvieron a agregar 0,69 kg de ácido nítrico (100,4% contenido de nitrato, 0,06 equivalentes), después lo cual el resto de minociclina fue <1%. La mezcla de nitración se colocó en una solución de 21,5 partes de IPA/ 3,3 partes de heptano a 0-36°C.

La suspensión se filtró (tiempo de filtración prolongado), se lavó con IPA/heptano 4:1 y se secó a no más de 40°C para obtener una pérdida durante el secado (LOD) de no más de 6%, lo cual proporcionó 140 kg de sal sulfato (95%, rendimiento bruto) para usar en la reacción de reducción.

### **Ejemplo 4**

Este Ejemplo describe una reacción de hidrogenación donde el intermediario de a 9-nitrominociclina no se aisló.

Se colocaron 104 kg de HCl de minociclina (sal clorhídrica de minociclina) (potencia de 90%) en 7,3 partes de ácido sulfúrico (763 kg) a 66°Be a una temperatura de 5-15°C y se agitó para eliminar el HCl. Se colocaron 14,9 kg de ácido nítrico fumante (100%, 1,25 equivalentes) durante 1 hora a 5-15°C, 120 rpm. Dado que HPLC mostró un resto de minociclina >1%, se volvieron a agregar 0,69 kg de ácido nítrico fumante (100%, 0,06 equivalentes), después lo cual el resto de minociclina fue <1%.

La mezcla de nitración se colocó en 4,2 partes (440 kg) de metanol a -10 a 20°C. El lote templado se ajustó a 4 a 10°C y se usó de esta manera en la reacción de reducción.

### Ejemplo Comparativo 3

Este Ejemplo describe una reacción de hidrogenación donde se aisló el intermediario de a 9-nitrominociclina. Las proporciones de solventes/reactivos están relacionadas con la carga inicial de minociclina anterior a la reacción de nitración.

La mezcla de reacción de sulfato de 9-nitrominociclina del Ejemplo Comparativo 4 se templó a 2240 kg (21,5 partes) de isopropanol y 342 kg (3,3 partes) de heptano, durante 1 hora, mientras se mantenía la temperatura a 0 a 36°C. La suspensión resultante se agitó a 30 a 36°C durante 2 horas, luego se enfrió y se agitó a 19 a 25°C durante 1 hora. La mitad de la suspensión se filtró, se lavó con 3 x 205 kg de IPA/ heptano (4:1) v/v y se secó a no más de 40°C para obtener una pérdida durante el secado (LOD) de no más de 6%. El filtrado y el secado duraron 16 días (durante 7 días de los cuales, la torta húmeda se dejó bajo nitrógeno durante un cierre de planta programado) y se obtuvieron 58 kg de sal sulfato. La otra mitad de la suspensión se agitó en un tambor y se enfrió a la espera de la disponibilidad del filtro. Se refrigeró durante 12 días, luego se cargó nuevamente en el recipiente y se agitó en un rango de temperatura de 0 a 6°C durante 2 días, luego se ajustó a 19 a 25°C, se filtró con 3 x 205 kg de IPA/ heptano (4:1) v/v y se secó a no más de 40°C con una pérdida durante el secado (LOD) de no más de 6%. La filtración y el secado duraron 6 días y se obtuvieron 82 kg de la sal sulfato.

Ambos sublotes de sulfato de 9-nitrominociclina se disolvieron en 672 kg (6,5 partes de metanol y 8,4 kg (0,08 partes) de agua para inyección, USP a 19-25°C y se redujo a sulfato de 9-aminominociclina usando 70 psig de gas de

hidrógeno y 2,74 kg (0,026 partes de paladio sobre carbono, humedad de 10%) (porcentaje en peso). La reacción de hidrogenación duró 10,5 horas y no dejó rastros detectables de material de partida.

La mezcla de reacción de sulfato de 9-aminominociclina se filtró para eliminar el catalizador y se templó en una solución de 1660 kg (16 partes) de IPA/ 710 (6,8 partes) de heptano a 0 a 27°C durante una hora. La mezcla resultante se ajustó a 19-25°C y se agitó durante 1 hora.

La suspensión de sulfato de 9-aminominociclina se filtró con un filtro Nutsche, se lavó con 2 x 162 kg (1,5 partes cada uno) de IPA/ heptano (4:1) v/v y se secó a 40°C para obtener una pérdida durante el secado (LOD) de no más de 4%. La filtración, el lavado y el secado duraron 10 días y se obtuvo 94,0 kg de sulfato de aminominociclina. Después de la filtración, se observaron sólidos en los licores madre. Se filtraron, se lavaron con 113 kg de IPA/ heptanos (4:1) v/v y se secaron a 40°C con una pérdida durante el secado menor a 4%. Se recuperaron 24,1 kg y se conservaron como un lote separado. El rendimiento en bruto total de sulfato de 9-aminominociclina a partir de minociclina fue de 84%.

Los 94,0 kg de la "primera cosecha" del sulfato de 9-aminominociclina seca y 0,084 kg (0,0008 partes) de sulfito de sodio fueron disueltos en 538 kg (5,17 partes) de agua para inyección, USP y se enfriaron a 0-6°C. Se necesitó 0 kg de ácido clorhídrico, 20°Be, para llevar el pH de la solución de sulfato de 9-aminominociclina a 1,1 +/- 0,1 porque el pH inicial fue de 1,16. Se agregaron 48,3 kg (0,46 partes) de ácido clorhídrico, reactivo, a la solución de 9-aminominociclina y así se obtuvo HCl de 9-aminominociclina. Se agregaron 56 kg (0,54 partes) de hidróxido de amonio, 28% y 4,0 kg (0,039 partes) de ácido clorhídrico, reactivo a la solución para obtener un lote con pH de 4,0 +/- 0,2.

A continuación, el lote se agitó durante 90 minutos a 0-6°C, asegurándose que el pH se mantuviera a 4,0 +/- 0,2. El pH final fue de 4,5 unidades de pH. El

lote se filtró sobre con un filtro Nutsche, se lavó con 2 x 33 kg (0,3 partes cada una) de agua para inyección (con un pH llevado a 4,0) preenfriada a 2 a 8°C y a continuación se agregaron 2 x 26,1 kg (0,25 partes de acetona (preenfriada a 2 a 8°C) y se secó a no más de 40°C, con un contenido de humedad resultante de no más de 7,0%. Se aislaron 43,2 kg de HCl de 9-aminominociclina, con un 40% de rendimiento de HCl de minociclina.

El proceso de 24,1 kg de "la segunda cosecha" de sulfato de 9-aminominociclina seca a través del cambio de sal se realizó de la misma manera que el proceso descrito anteriormente en los cuatro párrafos precedentes, usando cantidades proporcionales de reactivos. Se recuperó una cantidad adicional de 9,9 kg de HCl de 9-aminominociclina lo cual representa un incremento adicional de 9,2% en el rendimiento. El rendimiento total del lote de ambas cosechas fue de 53,1%.

#### **Ejemplo 5**

Este Ejemplo describe una reacción de hidrogenación donde el intermediario de a 9-nitrominociclina no se aisló. Las proporciones de solventes/reactivos están relacionadas con la carga inicial de minociclina anterior a la reacción de nitración.

La mezcla de reacción de sulfato de 9-nitrominociclina del Ejemplo 7 se colocó en 440 kg (4,2 partes) de metanol, durante 90 minutos, mientras se mantuvo la temperatura del lote a -20°C a -10°C y la velocidad de agitación a 130 rpm.

El lote templado se ajustó a 4-10°C y se redujo a sulfato de 9-aminominociclina usando 50 psig de gas de hidrógeno y 52 kg (0,5 partes) de paladio sobre carbono, humedad del 10% (en peso). La reacción de hidrogenación duró 5 horas y no dejó rastros detectables de material de partida. La mezcla de reacción de sulfato de 9-aminominociclina se filtró para eliminar el

catalizador y se templó en una solución de 1,241 kg (12 partes) de IPA/ 537 kg (5,2 partes) de heptano a 17 a 23°C durante 30 minutos. La mezcla resultante se enfrió a -18°C a -12°C y se agitó durante 1 hora.

La suspensión resultante de sulfato de 9-aminominociclina se filtró en dos porciones de un filtro Nutsche y se lavó con un total de 3,6 partes de IPA/ heptano (2:1) v/v preenfriadas a 0-6°C y 506kg (4,9 partes) de heptano frío. La filtración y el lavado duraron 99 horas para ambas porciones (filtradas en dos porciones debido a la limitación de tamaño del filtro). Las tortas húmedas de sulfato de 9-aminominociclina se disolvieron en 150 kg (1,4 partes) de agua para inyección, USP a 0-6°C y la capa orgánica superior se separó como desecho.

Se agregaron 25,7 kg (0,3 partes) de ácido clorhídrico a la solución de sulfato de 9-aminominociclina a 0-6°C y así se convirtió en HCl de 9-aminominociclina. Se agregó hidróxido de amonio 28% a la mezcla de reacción a fin de obtener un lote con pH de 4,0 +/- 0,2; esto dio lugar a 49,5 kg (0,48 partes). Se agregaron 0,15 kg de sulfito de sodio (0,0014 partes) a la mezcla de reacción.

Se sembró este lote 5 g de HCl de 9-aminominociclina y se agitó durante 3 horas mientras se mantenía el pH a 4,0 +/- 0,2 usando hidróxido de amonio, 28% (0,05 partes). El lote se filtró sobre con un filtro Nutsche, se lavó con 1 parte de agua para inyección (con un pH llevado a 4,0) preenfriada a 2 a 8°C y a continuación se agregaron 0,2 partes de isopropanol (preenfriado a 2 a 8°C) y se secó a no más de 50°C, con una pérdida durante el secado (LOD) de no más de 10,0% y un contenido de humedad de no más de 8,0%.

Se aislaron 63,1 kg de HCl de 9-aminominociclina, con un 59% de rendimiento de HCl de minociclina.

La Tabla 4 a continuación muestra los Datos Comparativos.

Tabla 4

| Lote                               | Escala<br>(kg de HCl de<br>minociclina) | Concen-<br>tración | Rendimiento<br>corregido de la<br>concentra-<br>ción | Total de<br>impurezas | Impureza<br>individual<br>mayor | Epímero | Tiempo del<br>ciclo <sup>1</sup> |
|------------------------------------|-----------------------------------------|--------------------|------------------------------------------------------|-----------------------|---------------------------------|---------|----------------------------------|
| (Ejemplo 3)                        | 30 kg                                   | 84,1%              | 40,3%                                                | 4,49%                 | 2,76%                           | 2,76%   | 8 días                           |
| (Ejemplo<br>compara-tivo<br>1)     | 52 kg                                   | 90,4%              | 37,0%                                                | 6,45%                 | 0,84%                           | 1,75%   | 24 días                          |
|                                    | 52 kg                                   | 87,9%              | 27,2%                                                | 9,72%                 | 3,73%                           | 3,88%   | 25 días                          |
| (Ejemplo<br>compara-tivo<br>2 ó 3) | 104 kg                                  | 86,4%              | 48% <sup>2</sup>                                     | 10,79%                | 0,63%                           | 3,18%   | 33 días <sup>3</sup>             |
|                                    |                                         | 87,8%              |                                                      | 9,31%                 | 0,57%                           | 2,46%   |                                  |
| (Ejemplo 4 o<br>5)                 | 104 kg                                  | 87,7%              | 57%                                                  | 3,5%                  | 1,2%                            | 0,72%   | 14 días                          |

<sup>1</sup> ciclo de tiempo desde HCl de minociclina a HCl de 9-aminociclina.

<sup>2</sup> rendimiento combinado de la 1ª y 2ª cosecha

<sup>3</sup> No se incluye el cierre de la planta de 7 días que ocurrió durante el proceso, si incluye el tiempo para procesar la segunda cosecha.

La tabla 4 indica que la hidrogenación de una mezcla de reacción sin aislamiento da lugar a un producto con una cantidad menor de impurezas y epímero de C<sub>4</sub>.

### ACILACIÓN

Los análisis por HPLC se realizaron en las siguientes condiciones:

|                 |                                                                                                                                                                |
|-----------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Columna:        | Luna C8 5 µm, 15 x 0,46 cm                                                                                                                                     |
| Fase móvil:     | 80% (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,05 M + 10 ml de trietilamina/l de fosfato + H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> a pH 6,2)/20% Acetonitrilo + 0,5 g de NaEDTA |
| Caudal de flujo | 1,0 ml/min                                                                                                                                                     |
| Detección       | 50 nm                                                                                                                                                          |

## Ejemplo 1

### Clorhidrato de N-t-butilglicina

A una mezcla de amina de t-butilo (1,57 l) y tolueno (1,35 l) a 45-50°C se le agrega bromoacetato de t-butilo (420 ml). La mezcla se agitó durante 1 hora a 50-60°C, la temperatura subió a 75°C después de una hora. Después de 2 horas a 75°C, la mezcla se enfrió a  $-12 \pm 3$  °C y se dejó reposar durante 1 hora. El sólido se recogió mediante filtración y el filtrado se concentró por destilación (30-40°C, 25-35 mm Hg) a un volumen de 825 ml. El concentrado resultante se enfrió a 20-25°C y se agregaron 6N de HCl (1,45 kg). Después de 3 horas, las fases se separaron y la fase acuosa se concentró por destilación (30-40°C, 25-35 mmHg) hasta un volumen de 590 ml. Se agregó isopropanol (2,4 l) y la mezcla se concentró por destilación (15-20°C, 10-35 mm Hg) hasta un volumen de 990 ml. La suspensión resultante se enfrió a  $-12 \pm 3$ °C durante 30 minutos y se dejó reposar durante una hora. El sólido se recogió por filtración, se lavó con i-PrOH y se secó ( $45 \pm 3$  °C, 10 mm Hg) durante 24 horas, con lo cual se obtuvo el producto deseado (407,9 g, 86%)

## Ejemplo 2

### Clorhidrato de cloruro de N-t-butilglicina

A una mezcla de clorhidrato de Nt-butilglicina molido (250,0 g), tolueno (1,14 L) y DMF (7,1 g) se le agregó cloruro de tionilo (143 ml) durante 20 min. La mezcla se llevó a 80-85 °C y se calentó agitando durante 3 horas. Después de enfriarla a 20°C, el sólido se recogió por filtración bajo N<sub>2</sub>, se lavó con tolueno y se secó (40°C, 10 mm Hg) durante 16 horas para dar lugar al producto deseado (260,4 g, 93,8%). Pureza por área % de HPLC: 98,12%

## Ejemplo 3

### Tigeciclina

A una mezcla de HCl de 9-aminomincilina (140,0 g) y agua fría (0-4°C) (840 ml) se le agregó clorhidrato de cloruro de ácido de N-t-butilglicina (154,0 g) después de 15 min, agitando. La mezcla se agitó a 0-4 °C durante 1-3 horas. Se le agregó hidróxido de amonio (126 g, 30%) para llevar el pH a 7,2 mientras se mantenía la temperatura a 0-10 °C. Se agregó metanol (930 ml) y CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (840 ml) y la mezcla se agitó a 20-25°C durante 1 hora, mientras el pH se mantuvo a 7,2 por el agregado de hidróxido de aluminio (13,5 g, 30%). Las fases se separaron y los sólidos se combinaron con la capa orgánica. La capa acuosa se extrajo con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1 x 840 ml, 3 x 420 ml) y el pH de la mezcla se ajustó a 7,2 durante cada extracción. A las capas orgánicas combinadas se les agregó metanol (200 ml) y se obtuvo una solución. La solución se lavó con agua (2x140 ml), luego se secó con sulfato de sodio (140 g) y se continuó agitando durante 30 minutos. La mezcla se filtró y el filtrado se concentró por destilación (20°C, 15-25 mm Hg) hasta un volumen de 425 ml. A dicha mezcla se le agregó CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1,4 l) y la destilación se repitió dos veces. La suspensión resultante se enfrió a 0-2°C y se agitó durante 1 hora. El sólido se recogió por filtración, se lavó con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> a 0-5°C (2 x 150 ml) y se secó (65-70°C, 10 mm Hg) durante 24 horas, con lo cual se obtuvo el producto deseado (120,0 g, 75%) Pureza por área % de HPLC: 98,9% y 0,12% de epímero de C-4.

### **Ejemplo 3A**

#### Tigeciclina

A una mezcla de HCl de 9-aminomincilina (100,0 g) y agua fría (0-4°C) (600 ml) se le agregó clorhidrato de cloruro de ácido de N-t-butilglicina (110,0 g) después de 50 min, agitando. La mezcla se agitó bien a 0-4 °C durante 1,5 horas. Se le agregó hidróxido de amonio (112 g, 28%) para llevar el pH a 7,2 mientras se mantenía la temperatura a 0-5°C. Se agregó cloruro de metanol (600 ml), luego metanol (440 ml) y la mezcla se agitó a 0-5°C durante 30 minutos,

mientras el pH se mantenía a 7,2 por el agregado de hidróxido de aluminio (10,0 g, 28%). La mezcla se calentó a 20-25°C durante 15 minutos. Se le agregó metanol (244 ml) y las fases se separaron. La capa acuosa se extrajo con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1 x 600 ml, 3 x 300 ml) y el pH de la mezcla se ajustó a 7,2 durante cada extracción. A las capas orgánicas combinadas se les agregó metanol (144 ml) y se obtuvo una solución. La solución se lavó con agua (2x100 ml), luego se secó con sulfato de sodio (100 g) y se continuó agitando durante 30 minutos. La mezcla se filtró y el filtrado se concentró por destilación (20°C, 80-120 mm Hg) hasta un volumen de 400 ml. A dicha mezcla se le agregó CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1,0 l) y la destilación se repitió dos veces. La suspensión resultante se enfrió a 0-2°C y se agitó durante 1 hora. El sólido se recogió por filtración, se lavó con 0-5 °C CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 x 110 ml) y se secó (65-70°C, 20 mm Hg) durante 18 horas, luego 3-5 mm Hg durante 16 horas) con lo cual se obtuvo el producto deseado (82,4 g, 71,7%) Pureza por área % de HPLC: 98,5% y 0,28% de epímero de C-4.

#### **Ejemplo 4**

##### Clorhidrato de cloruro de N-t-butilglicina

Se disolvió t-butilamina (88 g) en 300 ml de tolueno. La mezcla se calentó a 45-50°C y se agregaron 117,5 g de t-butilbromoacetato durante 1 hora mientras que se mantenía la temperatura a 50-60°C. La mezcla se calentó a 75°C durante 2 horas. La mezcla resultante se enfrió a 12°C a-15°C y se agitó durante 1 hora. Los sólidos se filtraron y se lavaron con tolueno frío. El sólido, bromhidrato de t-butilamina, se desechó. El filtrado se enfrió a 10-12°C y se hizo bullir gas de HCl durante 0,5 horas. La mezcla se agitó durante 3 horas a 10-12°C, luego el producto se recogió por filtración y se lavó con tolueno frío. El producto se secó al vacío a 40-50°C y se obtuvo el clorhidrato de N-t-butilglicina. MS: m/z 187 (M+)

En 35ml de tolueno, se agregó el material preparado como se describió arriba, clorhidrato de Nt-butilglicina (7 gramos). Se agregó cloruro de tionilo

(11,6 ml) y la suspensión se calentó a 75-80°C durante 1 hora. La suspensión se enfrió a 20°C y el sólido se recogió por filtración y se lavó con 2 x 15 ml de tolueno. El sólido resultante se secó al vacío a 40°C y se obtuvo 4,4 g (65% de rendimiento) del producto, que está protegido contra la humedad y que se usó de inmediato en el próximo paso.

### **Ejemplo 5**

#### Tigeciclina

Se agregó por partes 9-Aminominciclina (10,00 g) a 60 ml de agua a 0-5°C. Se le agregó por partes clorhidrato de cloruro de ácido de t-butilglicina (10,98 g), manteniendo la temperatura a 0-5°C. Después de agitar durante 40-60 minutos, se agregó por partes 30% de hidróxido de amonio a la mezcla de reacción mientras se mantenía la temperatura a 0-5°C para ajustar el pH a 7,2. A la solución se le agregó 85ml de metano y luego 60 ml de cloruro de metileno. Después de agitar 15 minutos, las fases se separaron. La fase acuosa se extrajo con cloruro de metileno 4 X 40ml, con el pH ajustado a 7,2 antes de cada extracción. A los orgánicos combinados se les agregaron 10ml de metanol y la solución se secó con sulfato de sodio. Después del filtrado, la solución se concentró y se obtuvo una suspensión (peso neto: 51 g). La suspensión se agitó a 5-10°C durante 1 hora y luego se filtró. El sólido se lavó con 2 X 10 ml de cloruro de metileno, luego se secó y se obtuvo 8,80 g del producto (76,8% de rendimiento). Pureza por área % de HPLC: 98,4% y 0,1% de epímero de C-4. MS(FAB): m/z 586 (M+H); 585 (M<sup>+</sup>).

### **Ejemplo 6**

#### Clorhidrato de cloruro de N-t-butilglicina

Se disolvió t-butilamina (1,5 kg) en 1,35 l de tolueno. La mezcla se calentó a 45-50°C y se agregó 548 g de t-butilbromoacetato durante 1 hora, mientras se mantuvo la temperatura a 50-60°C. La mezcla se calentó a 75°C durante 3 horas.

La mezcla de reacción se enfrió a 12-15°C y se agitó durante 1 hora. Los sólidos se filtraron y se lavaron con tolueno frío. El sólido, bromhidrato de t-butilamina, se desechó. El filtrado se concentró a ~800 ml destilando el solvente. El concentrado se enfrió a 25°C y se agregaron 900 ml de 6N de HCl a la mezcla. Después de agitar durante 3 horas a 20-25°C, las fases se separaron. La fase orgánica se desechó y la fase acuosa se concentró a un volumen de 600 ml. Se agregó isopropanol (2,4l) al concentrado. La suspensión se enfrió a -12/-9°C y se mantuvo así durante 0,5 horas. El producto se recogió por filtración, se lavó con isopropanol frío y luego se agitó al vacío a 40-50°C a fin de obtener el sólido (408 g). La pureza por RMN fue >95%. MS: m/z 187 (M+).

En 1,3 l de tolueno y 7,5 ml de DMF se agregó el material preparado como se describió arriba, clorhidrato de N-t-butilglicina (250 gramos). Se agregó cloruro de tionilo (143 ml) y la suspensión se calentó a 80-80°C durante 3-4 horas. La suspensión se enfrió a 20°C y el sólido se recogió por filtración y se lavó con 2 x 250 ml de tolueno. El sólido se secó al vacío a 40°C y se obtuvieron 260 g del producto (82 % de rendimiento). Pureza por área % de HPLC: 98,2%

### **Ejemplo 7**

#### Tigeciclina

Se agregó HCl de 9-aminomincilina (140,0 g) a 840 ml de agua a 0-4 °C. Se le agregó clorhidrato de cloruro de ácido de t-butilglicina (154 g) durante 15 minutos, mientras se agitaba enérgicamente y se mantenía la temperatura a 0-4°C.

La solución se agitó durante 1-3 horas

El pH de la mezcla se ajustó a 7,2±0,2 con 30% de hidróxido de amonio, mientras se mantuvo la temperatura a 0-10°C. Se agregaron a la solución metanol (930 ml) y 840 ml de cloruro de metileno, que se agitó durante 1 hora a 20-25°C. Las fases se separaron. La fase acuosa se extrajo con 3X600 ml de cloruro de

metileno y las fases orgánicas se combinaron, se secaron y se concentraron a un volumen de 500 ml aproximadamente. La suspensión resultante se enfrió a 0-2°C durante 1 hora. El sólido se filtró y se secó, con lo cual se obtuvo 120 g del producto (75% de rendimiento). Pureza por área % de HPLC: 98%, 0,1% de epímero de C4. MS(FAB): m/z 586 (M+H); 585 (M<sup>+</sup>).

### Ejemplo 8

#### Clorhidrato de ácido pirrolidinilacético

Se disolvió pirrolidina (14,2 g) en 40 ml de metil t-butil éter. La solución se enfrió a 0 a -5°C. Se agregó bromoacetato de bencilo (22,9 g) gota a gota mientras se agitaba. La espesa suspensión blanca se agitó durante 0,5 horas a 0-5°C. El sólido se filtró y se lavó con metil t-butil éter. El filtrado se concentró y se obtuvo 21,3 g de acetato de pirrolidinilbencilo. El éster de bencilo (21,0 g) se disolvió en 200 ml de metanol y se agregó 4,0 g de 10% de paladio sobre carbono como catalizador (50% de humedad). La solución se hidrógeno a 40 psi durante 6 horas. El catalizador se filtró y se lavó con metanol. El filtrado se concentró y se obtuvo 11,8 g de acetato de pirrolidinilbencilo en forma de un aceite incoloro. Se suspendió ácido acético de pirrolidinilo (15,8 g) en 15 ml de metil t-butil éter. Se agregó acetonitrilo (15 ml) y la suspensión se enfrió a 0-5°C. Mientras se agitaba, se agregó HCl etéreo (120 ml, 1,0 M). El precipitado blanco resultante se filtró, se lavó con metil t-butil éter y se secó a fin de obtener 15 g de clorhidrato de ácido acético de pirrodinilo. Pureza según área % GC/MS: 98%. MS: m/z 129 (M<sup>+</sup>).

### Ejemplo 9

[4S-(4a,12aa)]-4,7-Bis(dimetilamino)-9-[pirrolidinil]acetil]aminol-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-octahidro-3,10,12,12a-tetrahidroxi-1,11-dioxo-2-naftacen-carboxamida

Se suspendió ácido pirrolidinilacético (7,7 g) en 7 ml de acetonitrilo. Después de enfriarla a 0-5°C, se agregaron 5,3 ml de cloruro de tionilo,

lentamente y agitando. La suspensión se agitó a 55°C. La solución oscura se mantuvo a 55°C durante 0,5 horas y luego se enfrió a temperatura ambiente a fin de obtener clorhidrato de cloruro de pirrolidinilacetilo. Clorhidrato de 9-aminominociclina (5,0 g), preparado según lo descrito en el Ejemplo 4 anteriormente, se suspendió en 5,0 ml de agua. La suspensión se enfrió a -15°C. A dicha suspensión se agregó gota a gota la solución de clorhidrato de cloruro de pirrolidinilacetilo según se describió anteriormente, y se mantuvo la temperatura por debajo de 22°C. La mezcla de reacción oscura se agitó a 22-25°C durante 3 horas. Se le agregó agua (2 ml) a la mezcla y el pH se ajustó a 6,5±0,2 con 30% de hidróxido de amonio. La solución se extrajo con 6 x 15 ml de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Los extractos orgánicos se agruparon y concentraron a 40°C. Al concentrado se le agregó etanol anhidrido (10 ml) y la suspensión se agitó a 5-7°C durante 1 hora. El sólido se filtró y secó al vacío a 40°C a fin de lograr 3,5 g del producto. Pureza por área % de HPLC: 98,7 %, 0,4% de epímero de C4. MS(FAB): m/z 586 (M+H); 585 (M<sup>+</sup>).

## Ejemplo 10

### Tigeciclina

Se agregó por partes 9-Aminominociclina (4,0 g) a 10 ml de acetonitrilo y 5 ml de DMPU a 10-15°C. Se le agregó por partes clorhidrato de cloruro de ácido de *t*-butilglicina (4,4 g), manteniendo la temperatura a 10-15°C. Después de agitar durante 2 horas, se le agregó a la reacción 10 ml de MeOH y 17ml de agua lentamente, mientras la temperatura se mantenía a 10-17°C. Gota a gota, se incorporó hidróxido de amonio (30%) a la mezcla de reacción y se mantenía la temperatura a 5-8°C para ajustar el pH a 7,2. Luego, se incorporaron 15ml de cloruro de metileno. Después de agitar 15 minutos, las fases se separaron. La fase acuosa se extrajo con 4 X 20ml de cloruro de metileno, con el pH en 7,2 antes de cada extracción. A los orgánicos combinados, se agregaron 700 mg de

Norti CA-1 (carbón vegetal) y 10g de sulfato de sodio, luego la mezcla se filtró. La torta se lavó con 2 x 20 ml de cloruro de metileno. La solución se concentró y la suspensión resultante se agitó a 5-8°C durante 16 horas. Después del filtrado, el sólido se lavó con 2 x 10 ml de cloruro de metileno frío, luego se secó a fin de obtener 2,5 g del producto (50% de rendimiento). Pureza por área % de HPLC: 95,2%, epímero de C4: 0,5%. MS(FAB): m/z 586 (M+H); 585 (M<sup>+</sup>).

### Ejemplos 11-19

#### Tigeciclina

Los ejemplos 11-19 se realizaron según el procedimiento del Ejemplo 10, modificando el solvente según se detalla abajo.

| Ejemplo | Solvente                        | Rendimiento                          | Resultado <sup>1</sup>                           |
|---------|---------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------------------|
| 11      | DMPU                            | 50%                                  | Pureza: 95,2%, epímero de C4: 0,5%, sm: 3,35%    |
| 12      | DMPU-H <sub>2</sub> O (1:1)     | 48%                                  | Pureza: 98,1%, epímero de C4: 0,5%, sm: 0,7%     |
| 13      | DMPU-MeCN                       | 60-72% de rendimiento, 6 g de escala | necesitó un tratamiento final mayor              |
| 14      | THF                             | --                                   | La reacción "no se completó".                    |
| 15      | MeCN                            | --                                   | "reacción incompleta"                            |
| 16      | CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> | --                                   | "reacción incompleta"                            |
| 17      | THF:H <sub>2</sub> O (6:1)      | --                                   | Reacción completa.                               |
| 18      | NMP                             | --                                   | La reacción "funciona pequeña escala", "se bgró" |

| Ejemplo | Solvente         | Rendimiento | Resultado <sup>1</sup>     |
|---------|------------------|-------------|----------------------------|
|         |                  |             | una reacción completa".    |
| 19      | DMF <sup>1</sup> | 58%         | Impureza desconocida: 1,5% |

## Ejemplo 20

### Clorhidrato de cloruro de N-t-butilglicina

A un balón de bocas múltiples de 5 l con un agitador mecánico, termopar, condensador con una línea de nitrógeno a 30% (en peso) de depurador cáustico y un embudo para la adición de ecualización de presión se agregó clorhidrato de N-t-butilglicina molido (436 g, 2,6 moles  $d(0,5) = 103 \mu\text{m}$ ), tolueno (1,958 g, 2,263 ml), y N,N-dimetilformamida (13,6 g, 14,4 ml, 0,19 moles). Luego, se incorporó cloruro de tionilo (405 g, 248 ml, 3,4 moles) a la suspensión blanquizca usando el embudo de adición de 250 ml durante 33 minutos a 20-30°C. La suspensión se calentó a 80°C durante 1 hora, luego se agitó a 80°C durante 3 horas. Después de 3 horas, la reacción se completó por cromatografía de capa fina (<2% del material de partida). La suspensión amarillo-anaranjada se enfrió a 20°C durante 32 minutos, luego se agitó a 15-20°C durante 32 minutos. El sólido se recogió por filtración al vacío sobre un embudo Bücher de 15 cm usando un papel Whatman N° 42. La torta se lavó con tres porciones de tolueno (272 g, 314 ml cada lavado) a 20-25°C. La torta húmeda se secó por succión durante 20 minutos bajo protección de nitrógeno. El producto se secó, luego, en un horno a un vacío de 23 mm Hg y 38°C durante 21,2 horas para proporcionar una pérdida durante el secado de 1,23%. Peso del HCl de cloruro de t-butilaminoacetilo obtenido= 462 g,

<sup>1</sup> La mezcla de reacción se templó con isopropanol-acetato de etilo, luego se dividió entre agua y  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . La fase orgánica se concentró, luego se diluyó con tolueno antes de el aislamiento del producto.

Concentración por GC = 91,0%, Identificación IR = positivo. Rendimiento del HCl de ácido t-butilaminoacético = 96%. El rendimiento corregido a la concentración del producto y el material de partida: = 87%

## Ejemplo 21

### Clorhidrato de cloruro de N-t-butilglicina

A un balón de bocas múltiples de 5 l con un agitador mecánico, termopar, condensador con una línea de nitrógeno a 25% (en peso) de depurador cáustico y un embudo para la adición de ecualización de presión se agregó clorhidrato de N-t-butilglicina molido (450 g, 2,68 moles  $d(0,5) = 664 \mu\text{m}$ ), tolueno (2,863 g, 3,310 ml), y N,N-dimetilformamida (15 g, 15 ml, 0,21 moles). Luego, se incorporó cloruro de tionilo (422 g, 259 ml, 3,54 moles) a la suspensión blancuzca usando el *embudo de adición de 250 ml durante 19 minutos a 19-22°C*. La suspensión se calentó a 79°C durante 7,1 horas, luego se agitó a 79-82°C durante 44 horas. La reacción se verificó después de 3 horas y se descubrió que estaba incompleta por medio de cromatografía de capa fina (TLC). Se agregaron 26 ml (42 g, 0,35 moles) de cloruro de tionilo. Después de un total de 27 horas, la reacción seguía incompleta según TLC y se agregaron 26 ml adicionales de *cloruro de tionilo* (42 g, 0,35 moles). Después de un total de 44 horas, a 79-82°C, la reacción se completó según TLC ( < 4% de HCl de ácido de t-butilaminoacético de partida). La suspensión marrón oscuro se enfrió a 25°C durante 17 minutos, luego se agitó a 21-20°C durante 37 minutos. El sólido se recogió por filtración al vacío sobre un embudo sinterizado de vidrio grueso de 2 l. La torta se lavó con seis porciones de tolueno (282 g, 325 ml cada lavado) a 20-25°C. La torta húmeda se secó por succión durante 16 minutos bajo protección de nitrógeno. El producto se secó, luego, en un horno a un vacío de 23 mm Hg y 38°C durante 26,1 horas para proporcionar una pérdida durante el secado de 0,75%. Peso del HCl de cloruro de t-butilaminoacetilo obtenido= 395 g, Concentración por GC = 89,5%,

Identificación IR = positivo. Rendimiento del HCl de ácido tbutilaminoacético = 79%. El rendimiento corregido a la concentración del producto y el material de partida: = 71%

## Ejemplo 22

### Tigeciclina

Se disolvió HCl de 9-aminominciclina (43,0 kg) en 258 kg (6,0 partes de agua) para inyección a 0 - 6 °C. Se agregó cloruro de ácido de Nt-butilglicina (47,3 kg, 1,1 partes, 3,01 equivalentes) a la solución del lote, mientras se mantenía la temperatura del lote 0 a 6°C. La mezcla de reacción se agitó durante 1 horas y se calculó un contenido de 0,2% de material de partida (no se necesitó un adicional HCl de cloruro de ácido de Nt-butilglicina). La mezcla de reacción GAR-936 se llevó a un pH de 7,2 +/- 0,2 usando 32 kg (0,7 partes) de hidróxido de amonio, 28% y 2kg de ácido clorhídrico reactivo (para volver a ajustar el exceso). El pH inicial era de 0,42 y el pH final de 7,34. Se agregaron cloruro de metileno (342 kg, 8 partes) y 148 kg (3,4 partes) de metanol a la mezcla de reacción a 0-7°C. Dado que el pH era de 7,09, no se necesitó ajustarlo. El lote se calentó a 19 a 25°C. Se agregó metanol (83 kg, 1,9 partes) y la fase orgánica inferior se separó. El producto restante en la fase acuosa se extrajo en la fase orgánica usando 1 x 342 kg (8 partes) y 3 x 172 kg (4 partes) de cloruro de metileno mientras se mantuvo el pH a 7,2 +/- 0,2 con hidróxido de amonio, 28%. Se agregó metanol (49 kg, 1,14 partes) a la solución resultante de cloruro de metileno/metanol, que se lavó con 2 x 43 kg (1 parte) de agua para inyección, antes de que se lavara con 43 kg (1 parte) de sulfato de sodio. Se realizaron tres destilaciones al vacío para eliminar el metanol con agregado de 568 kg (13,21 partes) de cloruro de metileno antes de la segunda y tercera destilación. El nivel residual de metanol en el líquido madre fue de 0,21%. Se filtró el lote, se lavó con 2 x 60 kg (1,4 partes) de cloruro de metileno preenfriado (0 a 6°C). El material

bruto resultante no se secó, pero se aisló en forma de una torta húmeda (72,5 kg, 38,2 kg de peso neto, según se calculó a partir de la pérdida durante el secado), lo cual dio lugar a 77% de rendimiento a HCl de 9-aminominociclina. Resultados analíticos de la torta húmeda: minociclina = 1,26%, impureza individual mayor = 0,37%, epímero de C-4 = 0,50%.

### Ejemplo 23

#### Tigeciclina

Se disolvió HCl de 9-aminominociclina (61,0 kg) en 258 kg (6,0 partes de agua) para inyección a 0 - 6 °C. Se agregó cloruro de ácido de N-t-butilglicina (67,1 kg, 1,1 partes, 3,01 equivalentes) a la solución del lote, mientras se mantenía la temperatura del lote 0 a 6°C. La mezcla de reacción se agitó durante 3,5 horas y se calculó un contenido de 0,13% de material de partida (no se necesitó un adicional HCl de cloruro de ácido de N-t-butilglicina). La mezcla de reacción se llevó a pH 7,2 +/- 0,2, usando 45 kg de hidróxido de amonio, 28%. (0,7 partes) El pH inicial era de 0,82 y el pH final de 7,07. Se agregaron cloruro de metileno (485 kg, 8 partes) y 210 kg (3,4 partes) de metanol a la mezcla de reacción a 0-6°C. Dado que el pH seguía estando dentro del rango (7,04), no se necesitó ajustarlo. El lote se calentó de 19 a 25°C. Se agregó metanol (118 kg, 1,9 partes) y la fase orgánica inferior se separó. El producto restante en la fase acuosa se extrajo en la fase orgánica usando 1 x 485 kg (8 partes) y 3 x 244 kg (4 partes) de cloruro de metileno mientras se mantenía el pH a 7,2 +/- 0,2 con hidróxido de amonio, 28%. Se agregó metanol (70 kg, 1,14 partes) a la solución resultante de cloruro de metileno/metanol, que se lavó con 2 x 61 kg (1 parte) de agua para inyección, antes de que se secara con 61 kg (1 parte) de sulfato de sodio. Se realizaron tres destilaciones al vacío para eliminar el metanol con agregado de 805 kg (13,21 partes) de cloruro de metileno antes de la segunda y tercera destilación. El nivel residual de metanol en el líquido madre fue de

0,05%. Se filtró el lote y se lavó con 2 x 85 kg (1,4 partes) de cloruro de metileno preenfriado (0 a 6°C). El material bruto resultante no se secó, pero se aisló en forma de una torta húmeda (103 kg, 53,4 kg de peso neto, según se calculó a partir de la pérdida durante el secado), lo cual dio lugar a 76% de rendimiento a HCl de 9-aminominociclina.

## **Ejemplo Comparativo 24**

### Monoclorhidrato de tigeciclina

#### *Ejemplo 24A: 9-cloroacetamidominociclina*

Se enfrió cloruro de metileno (1,3 l) a 0-2°C en un balón de base redonda de 3 l equipado con un agitador mecánico, un termómetro y un embudo para agregados de 1 l. Por partes, se agregó agitando clorhidrato de 9-aminominociclina (400 g) recristalizado. Luego, se incorporó trietilamina (428 ml) durante 10 minutos, mientras se mantenía la temperatura entre 0-2°C. La mezcla de reacción se agitó durante 10 minutos y luego se enfrió a -22°C. Se agregó, a continuación, una solución de anhídrido cloroacético (280 g) a cloruro de metileno (540 ml) a tal velocidad que la temperatura no pasó de los 5°C. Se usaron 132 ml de cloruro de metileno adicional para enjuagar el embudo para agregados. Se analizó la mezcla de reacción por HPLC, 15 minutos después del comienzo de la adición de anhídrido. Cuando la cantidad de material de partida presente era menor a 2%, la reacción se templó con 680 ml de 0,05 M de solución de bicarbonato de sodio. La mezcla se agitó durante 15 minutos, luego se transfirió a un embudo separador de 5 l. Se esperó a que las fases se separaran. La fase de cloruro de metileno se separó y se lavó con 680 ml de solución adicional de 0,05 M de bicarbonato de sodio. Dicha solución lavada se agregó gota a gota en 17 l de una mezcla de 10:1 de n-heptano e isopropanol (15,4 l de n-heptano y 1,54 l de isopropanol). La suspensión se agitó durante 5 minutos y luego se dejó asentar durante 10 minutos. El sobrenadante se decantó y el precipitado se filtró a través

de un embudo con fritas de porosidad gruesa. El sólido se lavó con 2 l de 10:1 de n-heptano:isopropanol. El sólido se secó a 40°C al vacío a fin de obtener 550 g del producto en bruto.

*Ejemplo 24B: Tigeciclina*

Se agregó 9-cloroacetamidominociclina bruta (100 g) a temperatura ambiente (25-28°C) lentamente y agitando enérgicamente a 500 ml de t-butilamina en un balón de 1 l de base redonda y con dos bocas, equipado con un agitador y un termómetro. Se agregó yoduro de sodio (10 g) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 7,5 horas. La reacción se controló por medio de HPLC y cuando quedaba menos del 2% de material de partida, se agregó 100 ml de metanol y el solvente se reextrajo en un vaporizador rotativo a 40°C. Al residuo se le agregaron 420 ml de metanol y 680 ml de agua. La solución se enfrió a 0-2°C y se ajustó a pH 7,2, con HCl concentrado (91 ml) a fin de obtener una mezcla de reacción con un volumen de 1300 ml. Se diluyó a 6,5 l con agua y el pH se ajustó a 4,0-4,2 con HCl concentrado (12 ml). Se agregó Amberchrom® (CG161cd) lavado (860 g) a la solución y la mezcla se agitó durante 30 minutos y se ajustó el pH a 4,0-4,2. La resina se filtró y la solución acuosa usada se analizó por HPLC para buscar el producto y se almacenó a 4-8°C. La resina se suspendió en 4,8 l de 20% de metanol en agua (4 l de metanol + 16 l de agua). La suspensión se agitó durante 15 minutos y el pH se ajustó a 4,0-4,2. La resina se filtró y el filtrado se analizó para observar el producto. La extracción de la resina se repitió 3 veces más con 4,8 l de 20% de metanol en agua. Se agruparon todos los extractos de resina y la solución acuosa usada anteriormente y se ajustó el pH a 7,0-7,2 con 30% de hidróxido de amonio. La fase acuosa se extrajo con 6 x 2,8 l de cloruro de metileno, con el pH en 7,0-7,2 entre las extracciones. El extracto de cloruro de metileno agrupado se filtró a través de 250 g de sulfato de sodio anhidrido, se concentró a 500 ml y se enfrió a

0-3°C. Después de que el producto se hubiera cristalizado, la suspensión se agitó durante 1 hora a 0-3°C. Los sólidos se filtraron, se lavaron con 2 x 50 ml de cloruro de metileno frío y se secó a 40°C al vacío a fin de proporcionar 26 g de un sólido.

*Ejemplo 24C: Monoclorhidrato de tigeciclina*

Agitando, se disolvió tigeciclina (49g, 0,084 mol) por partes en 500 ml de agua para inyección. La solución se filtró a través de un embudo poroso medio y se lavó con 420 ml de agua para inyección. La solución se enfrió a 0-2°C y se le agregó 5,6 ml de HCl concentrado gota a gota, mientras se mantenía la temperatura entre 0-2°C. El pH inicial fue de 8,0 y el final de 6. La solución se liofilizó congelando la muestra a -30°C y liofilizando a -15°C. La temperatura de almacenamiento subió a 21°C durante 2 horas. El sólido resultante (49,6 g) se molió y se almacenó a 4-5°C. Análisis elemental: C (teoría 52,92%, experimental 51,75%); H (teoría 6,73%, experimental 6,75%); N (teoría 10,65%, experimental 10,32%); Cl (teoría 5,4%, experimental 5,5%).

## **Ejemplo Comparativo 25**

Monoclorhidrato de tigeciclina

*Ejemplo 25A: 9-cloroacetamidominociclina*

Se enfrió cloruro de metileno (325 ml) a -5 a 0 °C y se agregó por partes clorhidrato de 9-aminominociclina (100 g) durante 10 minutos. Se agregó trietilamina (77,6 g), mientras se mantenía la temperatura a -10 a -5 °C. Se preparó una solución de 97% de anhídrido cloroacético (70 g) en cloruro de metileno (133 ml) agitando a 20-25 °C y se incorporó a la mezcla de reacción de 45 minutos, mientras se mantenía la temperatura de mezcla a -10 a -2°C. El balón que contenía la solución de anhídrido cloroacético se enjuagó con 31 ml de cloruro de metileno y el enjuague aportó a la mezcla. Después de agitar durante 30 minutos, la reacción se observó por HPLC para determinar si la reacción se

completó. Se agregó bicarbonato de sodio acuoso (185 ml, 0,05 M) durante 30 minutos, mientras se mantenía la temperatura de reacción a 0 a 5°C. Después de agitar durante 10 minutos, las capas se separaron y se agregó sulfato de sodio (15 g) a la capa orgánica. La mezcla se agitó durante 15 minutos de 0 a 5°C y se filtró. La torta resultante se enjuagó con cloruro de metileno (2 x 38 ml) y los filtrados combinados se transfirieron en 4,19 l de 10:1 de heptano:isopropanol durante 20 minutos, seguido por un enjuague de 15 ml de cloruro de metileno del balón de filtrado. La mezcla se agitó durante 15 minutos de 20 a 25°C y, luego, se filtró. La torta se enjuagó con 680 ml de 10:1 heptano:isopropanol y se secó durante 24 horas de 37 a 40°C (5-10 mm Hg). Pureza por área % de HPLC: 78,1.

*Ejemplo 25B: Tigeciclina*

Se agregó 9-cloroacetamidominociclina (100 g) agitando enérgicamente a 483 ml de t-butilamina a un rango de temperatura de 0 a 10°C en un balón de 2 l de base redonda y bocas múltiples, equipado con un agitador, un termómetro y un condensador. Se agregó yoduro de sodio (16 g) y la reacción se agitó a 33-38°C durante 4 horas. La mezcla de reacción se observó mediante HPLC para determinar que se hubiera completado, luego se enfrió a 5 a 10°C. Se agregó metanol (300 ml) durante 10 minutos, luego la solución de reacción se concentró por destilación (10-17°C, 68 mm Hg) hasta 350 ml. Se agregó una segunda porción de metanol (600 ml) al concentrado y la mezcla se concentró por destilación a 350 ml. Se agregaron metanol (46 ml) y agua fría (565 ml) mientras se mantenía la temperatura de reacción por debajo de 30°C. La solución se enfrió de 0 a 5°C y el pH se ajustó a 4,0 con 100 ml de HCl 20 %Be. La solución se transfirió a un balón de bocas múltiples de 5 litros con 500 ml de enjuague de agua, luego se diluyó con 1 l de agua. Después de agitar durante 1 hora a 0-5°C, lavó con Amberchrom®(CG161) resina<sup>3</sup> y la suspensión resultante se agitó durante 30 minutos a 20-25°C. La suspensión se filtró y la torta húmeda resultante

se incorporó en 340 ml de solución de agua/metanol 5:1. El filtrado se apartó. Después de agitar durante 30 minutos a 20-25°C, la suspensión se filtró y la torta húmeda resultante se incorporó a una segunda porción de 340 ml de una solución de 5:1 de agua : metanol. El segundo filtrado se apartó. La suspensión se filtró y la torta húmeda resultante se incorporó en una tercera porción de 340 ml de solución de agua/metanol 5:1. Después del filtrado, el tercer filtrado se combinó con el primero y el segundo, y se enfrió a 0-5°C. El pH se ajustó a 7,0 con 11 ml de 28% de hidróxido de amonio. La solución se agitó a 0-5°C durante 16 horas, el pH se ajustó a 7,0 si resultaba necesario, y a 22-25°C durante 1 hora, ajustando pH a 7,0 si resultaba necesario. La solución acuosa se extrajo con cloruro de metileno (5x 980 ml), y el pH se ajustaba a 7,0 en cada extracción. Las fases orgánica combinada se transfirieron a un embudo separador y la capa acuosas se separó. La capa orgánica se combinó con 100 g de sulfato de sodio y se agitó durante una hora a 20-25°C. La suspensión se filtró a través de un papel celite y la torta se enjuagó con 250 ml de cloruro de metileno. El filtrado se concentró por destilación (-5 a 5°C, 150 mm Hg) a 150 ml, luego se enfrió a 0-5°C durante 1 hora. La suspensión resultante se filtró y la torta se lavó con 0-5°C cloruro de metileno (2 x 30 ml). La torta húmeda se agitó en cloruro de metileno (335 ml) y metanol (37 ml) a 26-32°C hasta que se obtuvo la solución. La solución se filtró a través de un celite, que estaba enjuagado con cloruro de metileno (2 x 15 ml) y se concentró por destilación (-5 a 5°C, 150 mm Hg) a 54 ml. El proceso de concentración se repitió dos veces, primero mediante el agregado de 335 ml de cloruro de metileno y la reducción del volumen a 55-70 ml, luego mediante el agregado de 254 ml de cloruro de metileno y la reducción del volumen a 90-105 ml. La suspensión resultante se agitó durante una hora a 0-5°C, luego se filtró y se lavó con cloruro de metileno (2 x 25 ml) a -10°C. El sólido se secó a 35-40°C

durante 16 horas, luego a 45-50°C durante 27 horas. Pureza por área % de HPLC: 97,7 %, 1,23% de epímero de C4.

## PURIFICACIÓN

### Ejemplo 1

#### Tigeciclina

Una mezcla de tigeciclina bruta (110,0 g) y acetato de metilo (1,62l) se mezcló y calentó a 30-35°C y se le agregó metanol (550 ml) durante 15 minutos. Después de mantenerla a 30-35°C, la solución se filtró sobre tierra de infusorios (36 g) y la torta se lavó con acetato de metilo (2 x 106 g). El filtrado se concentró por destilación (20°C, 150 mmHG) a 550 ml. Se le agregó acetato de metilo (1,1 l) y la suspensión resultante se concentró por destilación (20°C, 150 mmHG) a 550 ml. Este paso se repitió, luego el concentrado se enfrió a 0-4°C durante 1 hora. El sólido resultante se recogió por filtración y se lavó a 0-5°C con acetato de metilo (2 x 150 ml). El sólido se secó al vacío (65-70°C, 10 mmHg) durante 100 horas y se obtuvieron 98,0 g (89,1% de rendimiento) del producto deseado. Pureza por área % de HPLC: 98,8% y 0,55% de epímero de C-4.

### Ejemplo 2

#### Tigeciclina

Se agregó en porciones HCl de 9-Aminomincilina(140,0 g) a 840 ml de agua a 0-4°C. Se agregó clorhidrato de cloruro de ácido de tbutilglicina (154 g) durante 15 minutos, agitando enérgicamente y manteniendo la temperatura a 0-4 °C. La solución se agitó durante 1-3 horas. El pH de la mezcla se ajustó a 7,2±0,2 con 30% de hidróxido de amonio, mientras se mantenía a temperatura a 0-10 °C.

Se agregaron metanol (930 ml) y 840 ml de cloruro de metileno a la solución, que se agitó durante 1 hora a 20-25°C. Las fases se separaron.

La fase acuosa se extrajo con 3X600 ml de cloruro de metileno y las fases orgánicas se combinaron, se secaron y se concentraron a un volumen de 500 ml

aproximadamente. La suspensión resultante se enfrió a 0-2°C durante 1 hora. El sólido se filtró y se secó, con lo cual se obtuvo 120 g del producto (75% de rendimiento). Pureza por área % de HPLC: 98%, 0,1% de epímero de C4. MS(FAB): m/z 586 (M+H); 585 (M<sup>+</sup>).

### **Ejemplo 3**

#### Tigeciclina

Se preparó la tigeciclina (15,00g) según el Ejemplo 2 y se la agregó a 113 ml de acetona y 113 ml de metanol. La suspensión se agitó a 20-25°C durante 1 hora, luego se enfrió a 0-2°C. Después de agitar durante 1 hora, la suspensión se filtró y se lavó a fin de obtener 12,55 g del producto (83,7% de rendimiento). La pureza según HPLC (área %) fue >99 %, con 0,4% de epímero C-4.

### **Ejemplo 4**

#### Tigeciclina

Se preparó la tigeciclina (105 g) según el Ejemplo 2 y se la agregó a 800 ml de acetona y 800 ml de metanol. La suspensión se agitó y calentó a 30-35°C durante 15 minutos, luego se enfrió a 20-25°C. Después de mantenerla a 20-25°C durante 1 hora, la suspensión se enfrió a 0-4°C y se mantuvo 1 hora. El sólido se filtró, se lavó y se secó, con lo cual se obtuvieron 83 g del producto (rendimiento de 79%). Pureza por área % de HPLC: >99 %, epímero de C4: 0,4%.

### **Ejemplo 5**

#### Tigeciclina

A un balón de bocas múltiples de 1 litro, equipado con un agitador mecánico y protección de nitrógeno, se le agregaron 94,3 g de tigeciclina bruta húmeda<sup>4</sup>, metanol (305 g, 386 ml) y acetona (291 g, 368 ml). La mezcla de reacción se agitó a 16 – 23°C durante 4 horas. La suspensión se filtró sobre un embudo Büchner de 9 cm con papel Whatman N° 1. La torta húmeda se lavó con metanol (87 g, 110 ml) a 20-25°C. La torta húmeda se secó con succión y

protección de nitrógeno durante 0,1 hora. Se la transfirió (75,3 g) de nuevo al balón de bocas múltiples de 1 litro y se le agregó una solución de metanol (233 g, 295 ml) y acetona (244 g, 309 ml). La suspensión se agitó a 15 – 20 °C durante 5,5 horas. La suspensión se filtró sobre un embudo Büchner de 9 cm con papel Whatman N° 1. La torta húmeda se lavó con metanol (70 g, 88 ml) a 18–24°C. La torta húmeda se secó con succión y protección de nitrógeno durante 0,1 hora. Se la transfirió (59,0 g) de nuevo al balón de bocas múltiples de 1 litro y se le agregó una solución de metanol (247 ml) y acetona (187 g, 236 ml). La suspensión se agitó a 18 – 24°C durante 3 horas. La suspensión se filtró sobre un embudo Büchner de 9 cm con papel Whatman N° 1. La torta húmeda se lavó con metanol (55 g, 70 ml) a 20–25°C. La torta húmeda se secó con succión y protección de nitrógeno durante 0,1 hora. Se tomaron muestras de la para analizarlas por cromatografía líquida de alta presión (HPLC) (total de impurezas = 0,62%, minociclina = 0,17%, epímero de C4 = 0,35%, otras impurezas individuales mayores = 0,05%).

La torta húmeda (48,9 g) se transfirió a un balón de bocas múltiples de 2 litros con un sistema de destilación al vacío. A ella se le agregó una premezcla en forma de solución de metanol (90 g, 114 ml) y diclorometano (1,023 g, 772 ml). La suspensión se agitó a 15 – 20 °C y se obtuvo una solución roja. La solución se destiló a 160 m a 13-17°C con vacío de 330 mmHg durante 0,8 horas y se obtuvo una suspensión anaranjada. A un balón de 2 litros se le agregó diclorometano (818 g, 617 ml) y la suspensión se volvió a destilar a 183 ml a 6–13°C a un vacío de 817 mmHg durante 0,7 horas. Se le incorporó diclorometano (635 g, 479 ml) y la suspensión se volvió a destilar a 183 ml a 6–7°C con un vacío de 817 mmHg durante 0,6 horas. La suspensión anaranjada resultante se enfrió a 0-5°C y se mantuvo a 0-5°C, agitado, 2 horas. La suspensión se filtró sobre un embudo Büchner de 7 cm con papel Whatman N° 1. La torta húmeda se lavó con dos

porciones de 69 g (52 ml) de diclorometano a 0°C. La torta húmeda se secó con succión y protección de nitrógeno durante 5 minutos. Se tomó una muestra de la torta húmeda para analizarla HPLC (total de impurezas = 0,49%, minociclina = 0,12%, epímero de C4 = 0,32%, otras impurezas individuales mayores = 0%). La torta se secó a 25 °C con un vacío < 10 mmHg durante 57,5 horas hasta un nivel de diclorometano de 2,2%, con lo cual se obtuvieron 32,3 g de tigeciclina (34,2% de rendimiento).

Este procedimiento se siguió usando Tigeciclina preparada con HCl de minociclina, obtenida de los proveedores Hovione y Nippon Kayaku. En las Tablas 1 y 2 se comparan las impurezas presentes en la Tigeciclina obtenida a partir del proceso mencionado, usando cada fuente de material de partida de HCl de minociclina. Dichas tablas indican que el proceso proporciona un buen rendimiento de Tigeciclina con un bajo nivel de impurezas.

TABLA 1

| Fuente de HCl de minociclina | Etapas de proceso de la tigeciclina | Total de impurezas finales en tigeciclina (%) | HCl de minociclina recuperado (%) | Total de epímero de C4 final en tigeciclina (%) |
|------------------------------|-------------------------------------|-----------------------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------------------|
| Nippon Kayaku en bruto       | bruto                               | 0,71                                          | 0,33                              | 0,26                                            |
| Nippon Kayaku purificado     | purificado                          | 0,26                                          | 0,13                              | 0,13                                            |
| Interchem bruto              | bruto                               | 0,66                                          | 0,17                              | 0,29                                            |
| Interchem purificado         | purificado                          | 0,38                                          | 0,10                              | 0,15                                            |

| Fuente de HCl de minociclina | Etapas de proceso de la tigeciclina | Total de impurezas finales en tigeciclina (%) | HCl de minociclina recuperado (%) | Total de epímero de C4 final en tigeciclina (%) |
|------------------------------|-------------------------------------|-----------------------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------------------|
| Hovione bruto                | bruto                               | 0,64                                          | 0,18                              | 0,32                                            |
| Hovione purificado           | purificado                          | 0,39                                          | 0,13                              | 0,14                                            |

TABLA 2

| Ensayo                                                 | Nippon Kayaku    | Interchem        | Hovione          |
|--------------------------------------------------------|------------------|------------------|------------------|
| Descripción                                            | Polvo anaranjado | Polvo anaranjado | Polvo anaranjado |
| Rendimiento (g)                                        | 28,5             | 32,3             | 36,4             |
| Concentración (%) <sup>1</sup>                         | 100              | 99,6             | 99,6             |
| Impurezas totales (%) <sup>2</sup>                     | 0,13             | 0,23             | 0,25             |
| LSI (impureza individual mayor) (%) [RRT] <sup>3</sup> | brl <sup>4</sup> | 0,13 [0,64]      | 0,07 [0,67]      |
| Minociclina (%)                                        | 0,13             | 0,10             | 0,13             |
| Epímero (%)                                            | 0,13             | 0,15             | 0,14             |
| Diclorometano (%)                                      | 1,3              | 2,2              | 2,1              |
| Metanol (%)                                            | 0,001            | 0,003            | 0,002            |
| Acetona (%)                                            | 0,001            | brl <sup>5</sup> | brl              |
| Heptano (%)                                            | 0,001            | brl <sup>6</sup> | brl              |
| Alcohol isopropílico (%)                               | 0,002            | brl <sup>7</sup> | brl              |
| Tolueno (ppm)                                          | brl <sup>8</sup> | brl              | brl              |

| N,N-Dimetil-<br>formamida (ppm)                                 | brl <sup>9</sup> | brl      | brl      |
|-----------------------------------------------------------------|------------------|----------|----------|
| Agua (KF, %)                                                    | 1,32             | 0,72     | 0,51     |
| Residuo por ignición<br>(%)                                     | 0,039            | 0,005    | 0,014    |
| IR                                                              | Positivo         | Positivo | Positivo |
| Rotación específica <sup>1</sup><br>(°)                         | -219,4           | -213,4   | -218,7   |
| Cristalinidad                                                   | Correcto         | Correcto | Correcto |
| Rendimiento (%)                                                 | 21               | 26       | 24       |
| Rendimiento<br>(corregido, %) <sup>10</sup>                     | 24               | 30       | 27       |
| Rendimiento a partir<br>de Mino (%)                             | 10               | 12       | 13       |
| Rendimiento a partir<br>de Mino (corregido,<br>%) <sup>10</sup> | 11               | 13       | 14       |

1. Sobre una base anhidra, libre de solvente. 2. Sin incluir el epímero. 3. Impureza individual mayor (LSI) sin incluir el epímero de C4 y la minociclina. Tiempo de retención relativo (RRT) con respecto a GAR-936 4. brl: inferior al límite de reporte, 0,05% para HPLC. 5. brl de 0,0005%. 6. brl de 0,0003%. 7. brl de 0,0030% (muestra única). 8. brl de 2 ppm. 9. brl de 63 ppm. 10. Rendimiento corregido a la concentración del producto y el material de partida.

## Ejemplo 6

### Tigeciclina

Se suspendió una torta húmeda de tigeciclina bruta (72,5 kg , 38,2 kg de peso seco<sup>5</sup>) se agitó y suspendió en 191 kg (5 partes) de acetona y 191 kg (5

partes) de metanol. La suspensión se calentó de 30 a 36°C, se enfrió inmediatamente de 19 a 25°C y se mantuvo a 19-25°C durante dos horas. La suspensión se enfrió de 0 a 6°C y se mantuvo a 6°C durante 1 hora. Después del filtrado y el lavado con 2 x 34 kg (0,9 partes) de acetona/metano (1:1), la torta húmeda se evaluó por su contenido de minociclina (0,23%), 9-aminominociclina (0%) y por su impureza individual mayor diferente al epímero de C4 (0,09%). El contenido de epímero de C4 fue de 1,12%. Según los datos analíticos, no se realizó una nueva suspensión. A la torta húmeda se le agregaron 440 kg (11,5 partes) de cloruro de metileno y 39,3 kg (1,0 partes) de metanol y la mezcla se calentó a 30 a 36°C para disolverse. La solución del lote se filtró a través de filtros de pirógeno reductores y clarificantes de 0,2 micrones. Se realizaron tres destilaciones al vacío para eliminar el metanol con agregado de cloruro de metileno (440 kg y 339 kg, respectivamente) antes de la segunda y tercera destilación. El nivel de metanol residual fue de 0,3%. El lote se enfrió a 0°C a 6°C y se agitó durante 1 hora. El lote se filtró, se lavó con 2 x 42,1 kg (1,1 partes) de cloruro de metileno preenfriado (-13 a -7°C) y se secó a no más de 60°C hasta una pérdida durante el secado <2,5%. El material se molió y se obtuvieron 22,3 kg de tigeciclina (58% de rendimiento). Pureza por área % de HPLC: 98,2%, epímero de C4: 1,55%, Minociclina 0,1%, 9-aminominociclina 0%, impureza individual mayor = 0,08%.

### **Ejemplo 7**

#### Tigeciclina

Se suspendió una torta húmeda de tigeciclina bruta (103,5 kg, 53,4 kg peso seco<sup>6</sup>) se agitó y suspendió en 191 kg (5,1 partes) de acetona y 191 kg (5,1 partes) de metanol. La suspensión se calentó de 30 a 36°C, se enfrió inmediatamente de 19 a 25°C y se mantuvo a 19-25°C durante dos horas. La suspensión se enfrió de 0 a 6°C y se mantuvo de 0 a 6°C durante 1 hora.

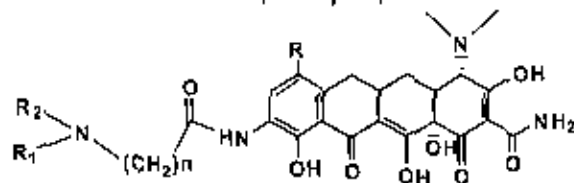
Después del filtrado y el lavado con 2 x 34 kg (0,9 partes) de acetona/metanol (1:1), la torta húmeda se evaluó por su contenido de minociclina (0,12%), 9-aminominociclina (0%) y por su impureza individual mayor diferente al epímero de C4 (0,13%). El contenido de epímero de C4 fue de 0,37%. Según los datos analíticos, no se realizó una nueva suspensión. A la torta húmeda se le agregaron 440 kg (11,7 partes) de cloruro de metileno y 55,7 kg (1,0 partes) de metanol y la mezcla se calentó a 30 a 36°C para disolverse. La solución del lote se filtró a través de filtros de pirógeno reductores y clarificantes de 0,2 micrones. Se realizaron tres destilaciones al vacío para eliminar el metanol con agregado de cloruro de metileno (624 kg y 481 kg, respectivamente) antes de la segunda y tercera destilación. El nivel de metanol residual fue de 1,07%. El lote se enfrió de 0°C a 6°C y se agitó durante 1 hora. El lote se filtró, se lavó con 3 x 59,7 kg (1,1 partes) de cloruro de metileno pre enfriado (-13 a -7°C) y se secó a no más de 60°C hasta una pérdida durante el secado <2,5%. El material se molió y se obtuvieron 31,7 kg de tigeciclina en calidad de primera cosecha. Una segunda cosecha que consiste en el producto residual en el cristalizador proporcionó otros 2,5 kg. Ambas cosechas representan un 64% de rendimiento de la tigeciclina bruta.

Si bien esta invención se describió según las diferentes realizaciones de la invención y sus ejemplos no limitantes, los expertos en el campo pueden, después de leer la memoria y las reivindicaciones, prever otras realizaciones y variaciones dentro del alcance pensado de la invención y, por lo tanto, el alcance de la invención sólo debe ser interpretado y definido por el alcance de las reivindicaciones anexas.

### Reivindicaciones

Habiendo así especialmente descripto y determinado la naturaleza de la presente invención y la forma como la misma ha de ser llevada a la práctica, se declara reivindicar como de propiedad y derecho exclusivo.

1. Un método para preparar al menos un compuesto de fórmula 1,



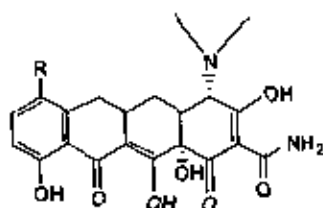
1

o una sal aceptable para uso farmacéutico del mismo,

donde  $R_1$  y  $R_2$  se selecciona cada uno en forma independiente de hidrógeno, alquilo ( $C_1-C_6$ ) de cadena recta y ramificada y cicloalquilo, o  $R_1$  y  $R_2$ , junto con N, forman un heterociclo; R es  $-NR_3R_4$ , donde  $R_3$  y  $R_4$  se selecciona cada uno en forma independiente de hidrógeno, y alquilo ( $C_1-C_6$ ) de cadena recta y ramificada; y n oscila entre 1-4,

que comprende:

- (a) hacer reaccionar al menos un agente nitrante con al menos un compuesto de fórmula 2,



2

o una sal del mismo, para producir una mezcla de reacción que comprende un intermediario; y

- (b) hacer además reaccionar el intermediario para formar el al menos un compuesto de fórmula 1,

donde el intermediario no se aísla de la mezcla de reacción.

2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, donde  $R_1$  es hidrógeno,  $R_2$  es t-butilo,  $R_3$  es metilo,  $R_4$  es metilo, y  $n$  es 1.
3. El método de acuerdo con la reivindicación 2, donde el al menos un compuesto de fórmula 1 es tigeciclina o tigeciclina HCl.
4. El método de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 3, donde el al menos un agente nitrante se selecciona de nitratos y ácido nítrico.
5. El método de acuerdo con la reivindicación 4, donde el al menos un agente nitrante se selecciona de ácido nítrico.
6. El método de acuerdo con la reivindicación 5, donde el ácido nítrico tiene una concentración de al menos 80%.
7. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde el al menos un agente nitrante está presente en un exceso molar respecto del al menos un compuesto de fórmula 2.
8. El método de acuerdo con la reivindicación 7, donde el exceso molar es de al menos 1,05 equivalentes.
9. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde la reacción en (a) es en presencia de un ácido. ...
10. El método de acuerdo con la reivindicación 9, donde el ácido es ácido sulfúrico.
11. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, donde la reacción en (a) es a una temperatura que oscila entre 5 y 15°C.
12. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, donde el al menos un compuesto de fórmula 2 se selecciona de una sal.

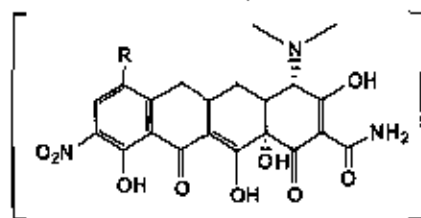
13. El método de acuerdo con la reivindicación 12, donde la sal del al menos un compuesto de fórmula 2 es seleccionada de las sales dordrato, bromhidrato, yodhidrato, del ácido fosfórico, ácido nítrico, ácido sulfúrico, ácido acético, ácido benzoico, ácido cítrico, cisteína, ácido fumárico, ácido glicólico, ácido maleico, ácido succínico, ácido tartárico, sulfato, y clorobencensulfonato.

14. El método de acuerdo con la reivindicación 12, donde la sal del al menos un compuesto de fórmula 2 se selecciona de sales de ácidos alquilsulfónicos y arilsulfónicos.

15. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, donde el intermediario es una sal.

16. El método de acuerdo con la reivindicación 15, donde el *intermediario es una sal sulfato*.

17. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, donde el intermediario es al menos un compuesto de fórmula 3,



3

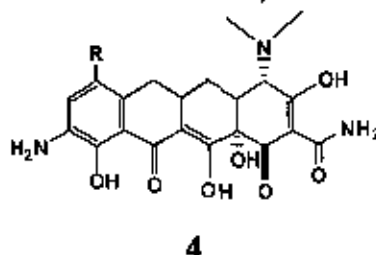
o una sal del mismo.

18. El método de acuerdo con la reivindicación 17, donde el al menos un compuesto de fórmula 3 está presente en una proporción de al menos 80% respecto de la cantidad total de componentes orgánicos, determinada por cromatografía líquida de alta resolución.

19. El método de acuerdo con la reivindicación 17, donde la mezcla de reacción incluye el epímero en C<sub>4</sub> de fórmula 3 en una proporción menor del 10%, determinada por cromatografía líquida de alta resolución.

20. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19, donde el hacer reaccionar además en (b) comprende reducir el intermediario.

21. El método de acuerdo con la reivindicación 20, donde la reducción produce al menos un compuesto de fórmula 4,

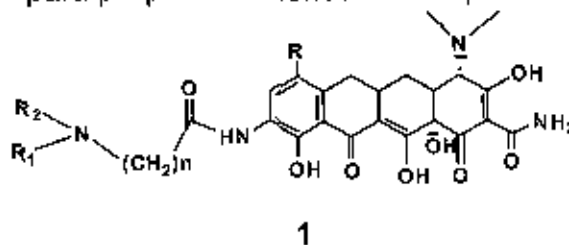


o una sal del mismo.

22. El método de acuerdo con la reivindicación 20, que comprende además acilar el intermediario reducido.

23. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22, donde el hacer reaccionar en (a) comprende proveer el al menos un compuesto de fórmula 2 en una cantidad de al menos 1 gramo.

24. Un método para preparar al menos un compuesto de fórmula 1,

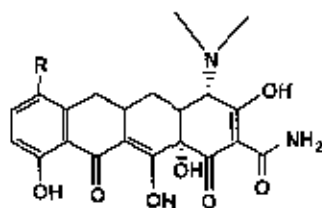


o una sal aceptable para uso farmacéutico del mismo,

donde  $R_1$  es hidrógeno,  $R_2$  es t-butilo,  $R$  es  $-NR_3R_4$  donde  $R_3$  es metilo y  $R_4$  es metilo, y  $n$  es 1,

que comprende:

(a) hacer reaccionar al menos un agente nitrante con al menos un compuesto de fórmula 2,



2

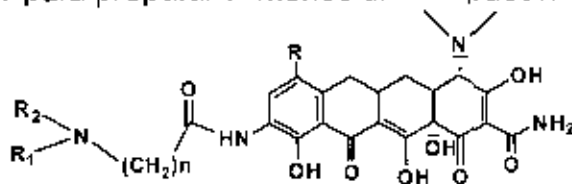
o una sal del mismo, para producir una mezcla de reacción que comprende un intermediario; y

(b) hacer reaccionar además el intermediario para formar el al menos un compuesto de fórmula 1,

donde el intermediario no se anisal de la mezcla de reacción.

25. El método de acuerdo con la reivindicación 24, donde el al menos un compuesto de fórmula 1 es tigeciclina o tigeciclina HCl.

26. Un método para preparar al menos un compuesto de fórmula 1,



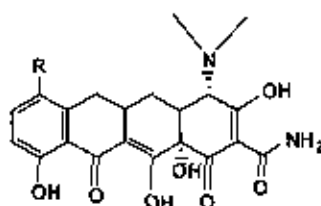
1

o una sal aceptable para uso farmacéutico del mismo,

donde  $R_1$  y  $R_2$  se selecciona cada uno en forma independiente de hidrógeno, alquilo ( $C_1$ - $C_6$ ) de cadena recta y ramificada y cicloalquilo, o  $R_1$  y  $R_2$ , junto con N, forman un heterociclo; R es  $-NR_3R_4$ , donde  $R_3$  y  $R_4$  se selecciona cada uno en forma independiente de hidrógeno, y alquilo ( $C_1$ - $C_4$ ) de cadena recta y ramificada; y n oscila entre 1-4,

que comprende:

(a) hacer reaccionar al menos un agente nitrante con al menos un compuesto de fórmula 2,

**2**

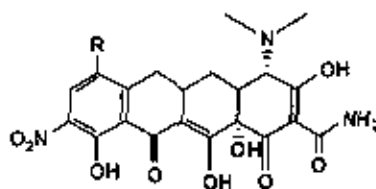
o una sal del mismo, para producir una suspensión; y

(b) hacer reaccionar la suspensión para formar el al menos un compuesto de fórmula 1.

27. El método de acuerdo con la reivindicación 26, donde  $R_1$  es hidrógeno,  $R_2$  es t-butilo,  $R$  es  $-NR_3R_4$  donde  $R_3$  es metilo y  $R_4$  es metilo, y  $n$  es 1.

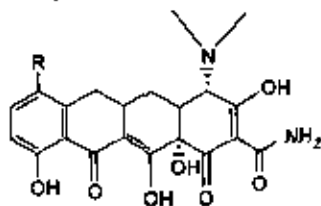
28. El método de acuerdo con la reivindicación 26, donde el al menos un compuesto de fórmula 1 es tigeciclina o tigeciclina HCl.

29. Un método para preparar al menos un compuesto de fórmula 3 o una sal del mismo,

**3**

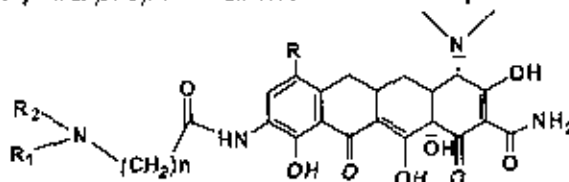
donde  $R$  es  $-NR_3R_4$ , donde  $R_3$  y  $R_4$  se selecciona cada uno en forma independiente de hidrógeno, y alquilo ( $C_1$ - $C_4$ ) de cadena recta y ramificada, que comprende:

hacer reaccionar al menos un agente nitrante con al menos un compuesto de fórmula 2 o una sal del mismo,

**2**

donde la reacción se realiza a una temperatura que oscila entre 5 y 15°C.

30. Un método para preparar al menos un compuesto de fórmula 1,



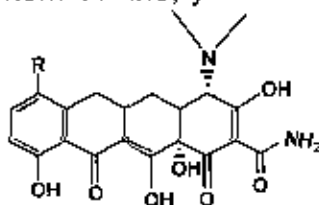
1

o una sal aceptable para uso farmacéutico del mismo,

donde  $R_1$  y  $R_2$  se selecciona cada uno en forma independiente de hidrógeno, alquilo ( $C_1$ - $C_6$ ) de cadena recta y ramificada y cicloalquilo, o  $R_1$  y  $R_2$ , junto con N, forman un heterociclo; R es  $-NR_3R_4$ , donde  $R_3$  y  $R_4$  se selecciona cada uno en forma independiente de hidrógeno, y alquilo ( $C_1$ - $C_4$ ) de cadena recta y ramificada; y n oscila entre 1-4,

que comprende:

(a) hacer reaccionar al menos un agente nitrante con al menos un compuesto de fórmula 2 o una sal del mismo para producir una mezcla de reacción que comprende un intermediario; y



2

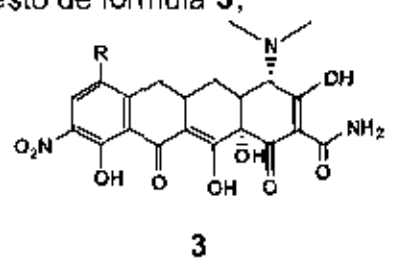
(b) hacer reaccionar además el intermediario para formar el al menos un compuesto de fórmula 1

donde el hacer reaccionar en (a) se realiza a una temperatura que oscila entre 5 y 15°C.

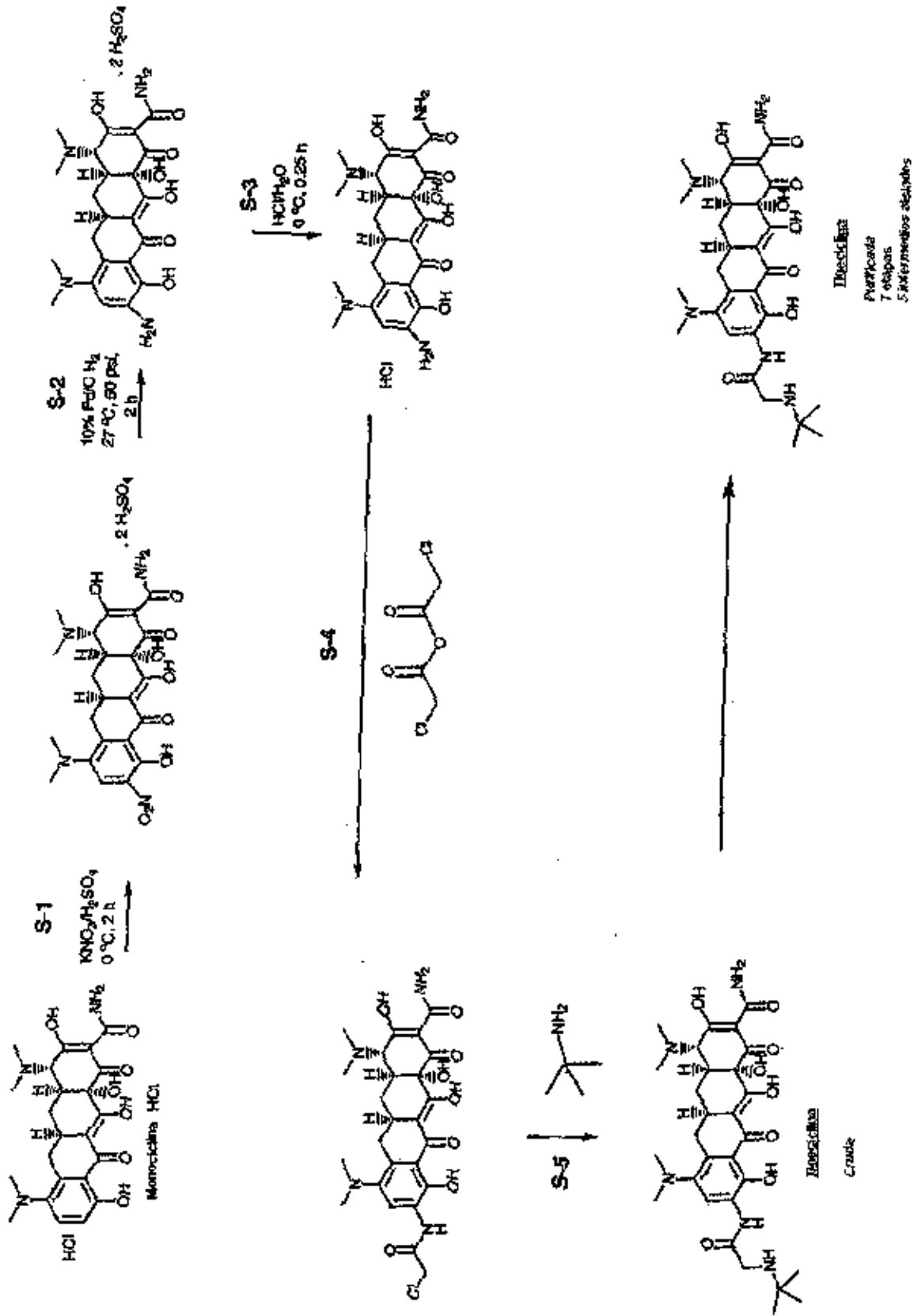
31. El método de acuerdo con la reivindicación 30, donde  $R_1$  es hidrógeno,  $R_2$  es *t*-butilo,  $R_3$  es metilo,  $R_4$  es metilo, y n es 1.

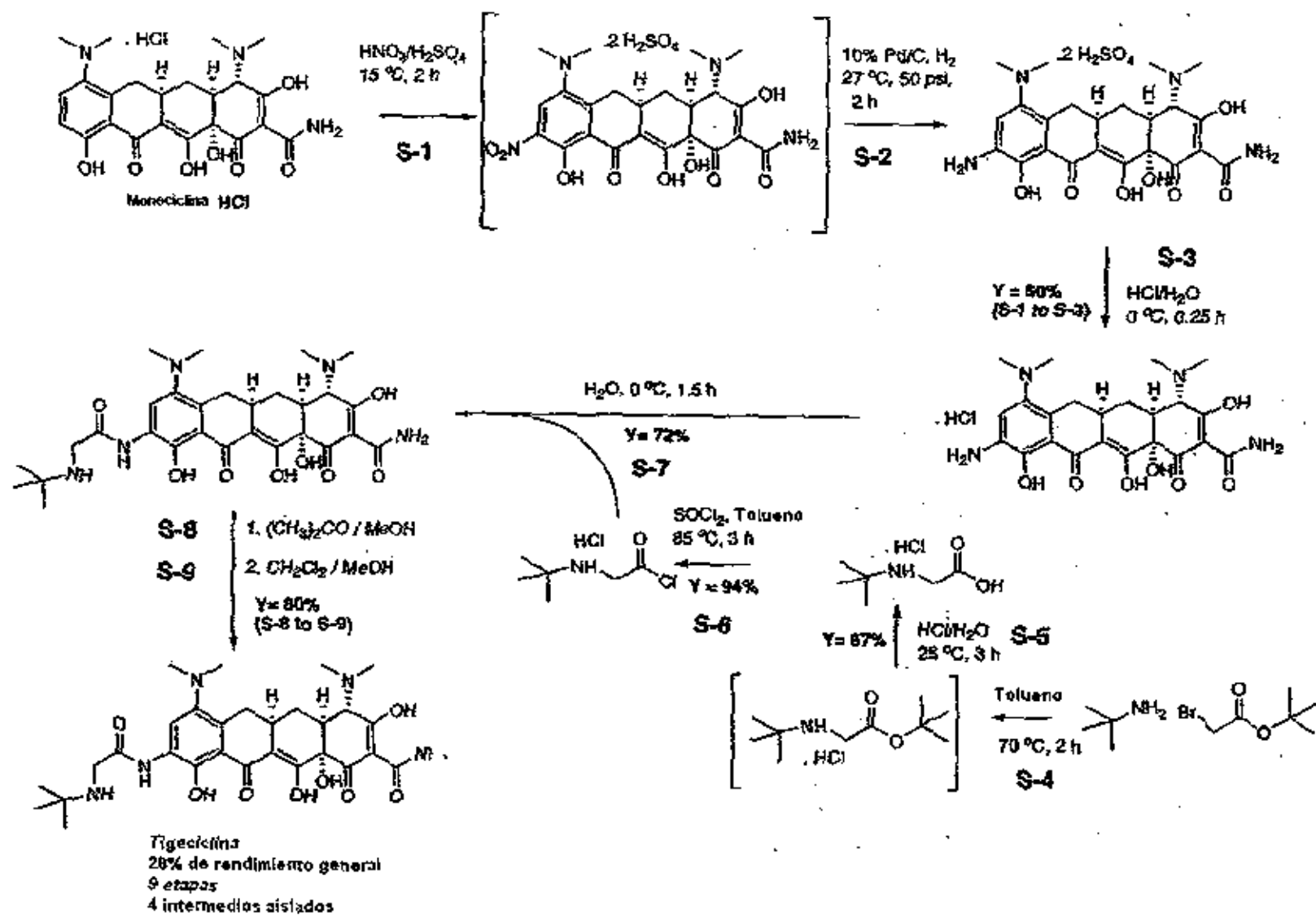
32. Un compuesto o una sal del mismo preparado por el método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 31.

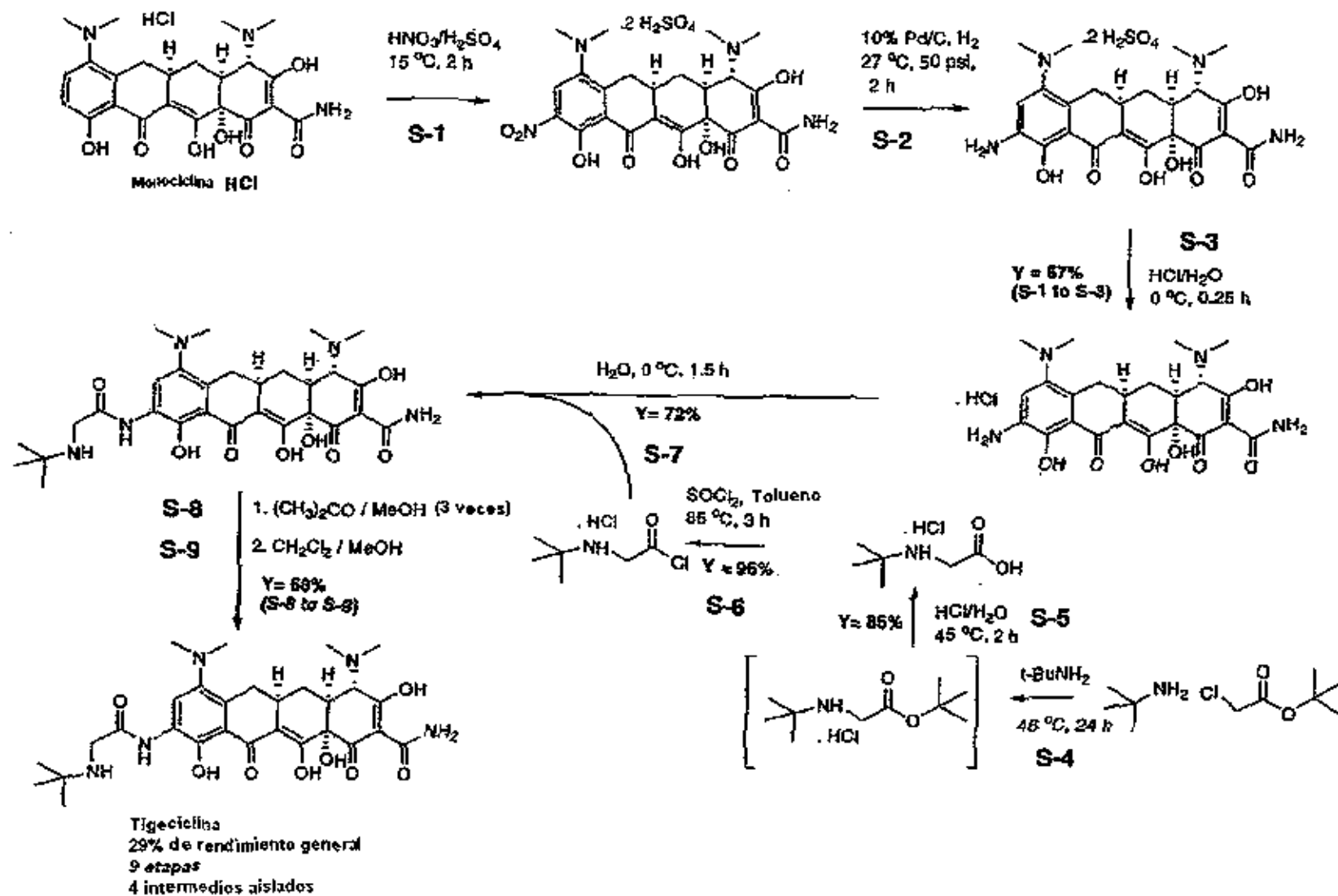
- 33. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 32, donde  $R_1$  es hidrógeno,  $R_2$  es t-butilo,  $R_3$  es metilo,  $R_4$  es metilo, y  $n$  es 1.
- 34. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 33, donde el al menos un compuesto de fórmula 1 es tigeciclina o tigeciclina HCl.
- 35. Una composición que comprende un compuesto o una sal del mismo preparado por el método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 31.
- 36. La composición de acuerdo con la reivindicación 35, donde  $R_1$  es hidrógeno,  $R_2$  es t-butilo,  $R_3$  es metilo,  $R_4$  es metilo, y  $n$  es 1.
- 37. La composición de acuerdo con la reivindicación 36, donde el al menos un compuesto de fórmula 1 es tigeciclina o tigeciclina HCl.
- 38. La composición de acuerdo con la reivindicación 35, que comprende además al menos un vehículo aceptable para uso farmacéutico.
- 39. Una composición que comprende:  
al menos un compuesto de fórmula 3,



- o una sal del mismo,
- donde  $R$  es  $-NR_3R_4$ , donde  $R_3$  y  $R_4$  se selecciona cada uno en forma independiente de hidrógeno, y alquilo ( $C_1$ - $C_6$ ) de cadena recta y ramificada,
- donde un epímero de  $C_4$  de fórmula 3 está presente en una proporción menor del 10%, determinada por cromatografía líquida de alta resolución.
- 40. La composición de acuerdo con la reivindicación 39, donde  $R_1$  es hidrógeno,  $R_2$  es t-butilo,  $R$  es  $-NR_3R_4$  donde  $R_3$  es metilo y  $R_4$  es metilo, y  $n$  es 1.







**Fig. 3**

From the INTERNATIONAL BUREAU

**PCT**

**NOTIFICATION CONCERNING  
SUBMISSION OR TRANSMITTAL  
OF PRIORITY DOCUMENT**

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

To:

MCDONELL, Leslie, A.  
Finnegan, Henderson, Farabow, Garrett & Dunner,  
L.L.P.  
901 New York Avenue  
Washington, DC 20001-4413  
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

|                                                                      |                                                                        |
|----------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------|
| Date of mailing (day/month/year)<br>29 August 2006 (29.08.2006)      | IMPORTANT NOTIFICATION                                                 |
| Applicant's or agent's file reference<br>1142.380-304                |                                                                        |
| International application No.<br>PCT/US2006/020540                   | International filing date (day/month/year)<br>25 May 2006 (25.05.2006) |
| International publication date (day/month/year)<br>Not yet published | Priority date (day/month/year)<br>27 May 2005 (27.05.2005)             |
| Applicant<br>WYETH et al                                             |                                                                        |

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

Priority date

Priority application No.

Country or regional Office  
or PCT receiving Office

Date of receipt  
of priority document

27 May 2005 (27.05.2005)

60/685,291

US

24 July 2006 (24.07.2006)

The International Bureau of WIPO  
34, chemin des Colombettes  
1211 Geneva 20, Switzerland

Authorized officer

Nora Lindner

Facsimile No. +41 22 338 82 70

Facsimile No. +41 22 338 89 65

Telephone No. +41 22 338 97 20

From the INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

PCT

To:

PINMEGAN, HENDERSON, PARABOW,  
GARRETT & DUNNER, L.L.P.  
Attn. McDonnell, Leslie A.  
901 New York Avenue  
Washington, DC 20001-4413  
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF  
THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT AND  
THE WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL  
SEARCHING AUTHORITY, OR THE DECLARATION

(PCT Rule 44.1)

|                                                       |                                                          |
|-------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|
| Date of mailing<br>(day/month/year)                   | 25/01/2007                                               |
| Applicant's or agent's file reference<br>1142.380-304 | FOR FURTHER ACTION See paragraphs 1 and 4 below          |
| International application No.<br>PCT/US2006/020540    | International filing date<br>(day/month/year) 25/05/2006 |
| Applicant<br>WYETH                                    |                                                          |

1. ☒ The applicant is hereby notified that the international search report and the written opinion of the International Searching Authority have been established and are transmitted herewith.

**Filing of amendments and statement under Article 19:**

The applicant is entitled, if he so wishes, to amend the claims of the International Application (see Rule 46):

**When?** The time limit for filing such amendments is normally two months from the date of transmittal of the International Search Report.

**Where?** Directly to the International Bureau of WIPO, 34 chemin des Colombettes  
1211 Geneva 20, Switzerland, Facsimile No.: (41-22) 338.62.70

For more detailed instructions, see the notes on the accompanying sheet.

2. ☐ The applicant is hereby notified that no international search report will be established and that the declaration under Article 17(2)(a) to that effect and the written opinion of the International Searching Authority are transmitted herewith.
3. ☐ With regard to the protest against payment of (an) additional fee(s) under Rule 40.2, the applicant is notified that:

- ☐ the protest together with the decision thereon has been transmitted to the International Bureau together with the applicant's request to forward the texts of both the protest and the decision thereon to the designated Offices.
- ☐ no decision has been made yet on the protest; the applicant will be notified as soon as a decision is made.

**4. Reminders**

Shortly after the expiration of 18 months from the priority date, the international application will be published by the International Bureau. If the applicant wishes to avoid or postpone publication, a notice of withdrawal of the international application, or of the priority claim, must reach the International Bureau as provided in Rules 90bis.1 and 90bis.3, respectively, before the completion of the technical preparations for international publication.

The applicant may submit comments on an informal basis on the written opinion of the International Searching Authority to the International Bureau. The International Bureau will send a copy of such comments to all designated Offices unless an international preliminary examination report has been or is to be established. These comments would also be made available to the public but not before the expiration of 30 months from the priority date.

Within 18 months from the priority date, but only in respect of some designated Offices, a demand for international preliminary examination must be filed if the applicant wishes to postpone the entry into the national phase until 30 months from the priority date (in some Offices even later); otherwise, the applicant must, within 20 months from the priority date, perform the prescribed acts for entry into the national phase before those designated Offices.

In respect of other designated Offices, the time limit of 30 months (or later) will apply even if no demand is filed within 18 months.

See the Annex to Form PCT/IB/301 and, for details about the applicable time limits, Office by Office, see the PCT Applicant's Guide, Volume II, National Chapters and the WIPO Internet site.

Name and mailing address of the International Searching Authority

 European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2  
NL-2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Sandrine Parriche

Article 19: 3-25-07  
Written Opinion: 04-25-07

IPS: 04-25-07 See notes on accompanying sheet

2/5/07

OKT  
not  
2/2/07

227  
227

## NOTES TO FORM PCT/ISA/220

These Notes are intended to give the basic instructions concerning the filing of amendments under Article 19. The Notes are based on the requirements of the Patent Cooperation Treaty, the Regulations and the Administrative Instructions under that Treaty. In case of discrepancy between these Notes and those requirements, the latter are applicable. For more detailed information, see also the *PCT Applicant's Guide*, a publication of WIPO.

In these Notes, "Article", "Rule", and "Section" refer to the provisions of the PCT, the PCT Regulations and the PCT Administrative Instructions, respectively.

### INSTRUCTIONS CONCERNING AMENDMENTS UNDER ARTICLE 19

The applicant has, after having received the international search report and the written opinion of the International Searching Authority, one opportunity to amend the claims of the international application. It should however be emphasized that, since all parts of the international application (claims, description and drawings) may be amended during the international preliminary examination procedure, there is usually no need to file amendments of the claims under Article 19 except where, e.g. the applicant wants the letter to be published for the purposes of provisional protection or has another reason for amending the claims before international publication. Furthermore, it should be emphasized that provisional protection is available in some States only (see *PCT Applicant's Guide*, Volume I/A, Annexes B1 and B2).

The attention of the applicant is drawn to the fact that amendments to the claims under Article 19 are not allowed where the International Searching Authority has declared, under Article 17(2), that no international search report would be established (see *PCT Applicant's Guide*, Volume I/A, paragraph 296).

#### What parts of the international application may be amended?

Under Article 19, only the claims may be amended.

During the international phase, the claims may also be amended (or further amended) under Article 34 before the International Preliminary Examining Authority. The description and drawings may only be amended under Article 34 before the International Examining Authority.

Upon entry into the national phase, all parts of the international application may be amended under Article 28 or, where applicable, Article 41.

#### When?

Within 2 months from the date of transmittal of the international search report or 16 months from the priority date, whichever time limit expires later. It should be noted, however, that the amendments will be considered as having been received on time if they are received by the International Bureau after the expiration of the applicable time limit but before the completion of the technical preparations for international publication (Rule 46.1).

#### Where not to file the amendments?

The amendments may only be filed with the International Bureau and not with the receiving Office or the International Searching Authority (Rule 46.2).

Where a demand for international preliminary examination has been/is filed, see below.

#### How?

Either by cancelling one or more entire claims, by adding one or more new claims or by amending the text of one or more of the claims as filed.

A replacement sheet must be submitted for each sheet of the claims which, on account of an amendment or amendments, differs from the sheet originally filed.

All the claims appearing on a replacement sheet must be numbered in Arabic numerals. Where a claim is cancelled, no renumbering of the other claims is required. In all cases where claims are renumbered, they must be renumbered consecutively (Section 205(b)).

The amendments must be made in the language in which the international application is to be published.

#### What documents must/may accompany the amendments?

##### Letter (Section 205(b)):

The amendments must be submitted with a letter.

The letter will not be published with the international application and the amended claims. It should not be confused with the "Statement under Article 19(1)" (see below, under "Statement under Article 19(1)").

The letter must be in English or French, at the choice of the applicant. However, if the language of the international application is English, the letter must be in English; if the language of the international application is French, the letter must be in French.

## NOTES TO FORM PCT/ISA/220 (continued)

The letter must indicate the differences between the claims as filed and the claims as amended. It must, in particular, indicate, in connection with each claim appearing in the international application (it being understood that identical indications concerning several claims may be grouped), whether

- (i) the claim is unchanged;
- (ii) the claim is cancelled;
- (iii) the claim is new;
- (iv) the claim replaces one or more claims as filed;
- (v) the claim is the result of the division of a claim as filed.

The following examples illustrate the manner in which amendments must be explained in the accompanying letter:

1. [Where originally there were 48 claims and after amendment of some claims there are 51]:  
"Claims 1 to 29, 31, 32, 34, 35, 37 to 48 replaced by amended claims bearing the same numbers; claims 30, 33 and 36 unchanged; new claims 49 to 51 added."
2. [Where originally there were 15 claims and after amendment of all claims there are 11]:  
"Claims 1 to 15 replaced by amended claims 1 to 11."
3. [Where originally there were 14 claims and the amendments consist in cancelling some claims and in adding new claims]:  
"Claims 1 to 6 and 14 unchanged; claims 7 to 13 cancelled; new claims 15, 16 and 17 added." or  
"Claims 7 to 13 cancelled; new claims 15, 16 and 17 added; all other claims unchanged."
4. [Where various kinds of amendments are made]:  
"Claims 1-10 unchanged; claims 11 to 13, 18 and 19 cancelled; claims 14, 15 and 16 replaced by amended claim 14; claim 17 subdivided into amended claims 15, 16 and 17; new claims 20 and 21 added."

### "Statement under article 19(1)" (Rule 46.4)

The amendments may be accompanied by a statement explaining the amendments and indicating any impact that such amendments might have on the description and the drawings (which cannot be amended under Article 19(1)).

The statement will be published with the international application and the amended claims.

It must be in the language in which the international application is to be published.

It must be brief, not exceeding 500 words if in English or if translated into English.

It should not be confused with and does not replace the letter indicating the differences between the claims as filed and as amended. It must be filed on a separate sheet and must be identified as such by a heading, preferably by using the words "Statement under Article 19(1)".

It may not contain any disparaging comments on the international search report or the relevance of citations contained in that report. Reference to citations, relevant to a given claim, contained in the International search report may be made only in connection with an amendment of that claim.

### Consequence if a demand for international preliminary examination has already been filed

If, at the time of filing any amendments and any accompanying statement, under Article 19, a demand for international preliminary examination has already been submitted, the applicant must preferably, at the time of filing the amendments (and any statement) with the International Bureau, also file with the International Preliminary Examining Authority a copy of such amendments (and of any statement) and, where required, a translation of such amendments for the procedure before that Authority (see Rules 55.3(a) and 62.2, first sentence). For further information, see the Notes to the demand form (PCT/IPEA/401).

If a demand for international preliminary examination is made, the written opinion of the International Searching Authority will, except in certain cases where the International Preliminary Examining Authority did not act as International Searching Authority and where it has notified the International Bureau under Rule 66.1 bis(b), be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority. If a demand is made, the applicant may submit to the International Preliminary Examining Authority a reply to the written opinion together, where appropriate, with amendments before the expiration of 3 months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later (Rule 43 bis 1(c)).

### Consequence with regard to translation of the international application for entry into the national phase

The applicant's attention is drawn to the fact that, upon entry into the national phase, a translation of the claims as amended under Article 19 may have to be furnished to the designated/elected Offices, instead of, or in addition to, the translation of the claims as filed.

For further details on the requirements of each designated/elected Office, see the PCT Applicant's Guide, Volume II.

# PCT

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

|                                                              |                                                                                               |                                                                |
|--------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|
| Applicant's or agent's file reference<br><b>1142.380-304</b> | <b>FOR FURTHER ACTION</b><br>see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below. |                                                                |
| International application No.<br><b>PCT/US2006/020540</b>    | International filing date (day/month/year)<br><b>25/05/2006</b>                               | (Earliest) Priority Date (day/month/year)<br><b>27/05/2005</b> |
| Applicant<br><b>WYETH</b>                                    |                                                                                               |                                                                |

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

This international search report consists of a total of 6 sheets.

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

### 1. Basis of the report

a. With regard to the language, the international search was carried out on the basis of:

- ☒ the international application in the language in which it was filed  
☐ a translation of the international application into \_\_\_\_\_, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b))

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

2. ☐ Certain claims were found unsearchable (See Box No. II)

3. ☒ Unity of Invention is lacking (see Box No. III)

4. With regard to the title,

- ☒ the text is approved as submitted by the applicant  
☐ the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the abstract,

- ☒ the text is approved as submitted by the applicant  
☐ the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority

6. With regard to the drawings,

- a. the figure of the drawings to be published with the abstract is Figure No. 1  
☒ as suggested by the applicant  
☐ as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure  
☐ as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention  
b. ☐ none of the figures is to be published with the abstract

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US2006/020540

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

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

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

see additional sheet

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

1-28, 32(part)-40(part)

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-28,32(part)-40(part)

Claims 1-28,32(part)-40(part) directed to a method for preparing at least one compound of formula 1 of the application or a pharmaceutically acceptable salt thereof, comprising a) reacting at least one nitrating agent with at least one compound of formula 2 of the application or a salt thereof, to produce a reaction mixture comprising an intermediate, and b) further reacting the intermediate to form at least one compound of formula 1 of the application, wherein the intermediate is not isolated from the reaction mixture (regarding claims 26-28 the "slurry" was considered to relate to a reaction mixture in which no compounds are isolated).

---

2. claims: 29-31,32(part)-40(part)

Claims 29-31,32(part)-40(part) directed to a method for preparing at least one compound of formula 3 of the application or a salt thereof, comprising a) reacting at least one nitrating agent with at least one compound of formula 2 of the application or a salt thereof, wherein the reacting is performed at a temperature ranging from 5 to 15°C.

---

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/US2006/020540

232

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C07C231/02 C07C237/26 A61K31/65 A61P31/00

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)

C07C A61K A61P

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

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

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

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                           | Relevant to claim No. |
|----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| X        | HUNTER PA, CASTANER J: "GAR-936, Tetracycline Antibiotic"                                                    | 32-40                 |
| A        | DRUGS OF THE FUTURE,<br>vol. 26, 2001, pages 851-858, XP002400050<br>page 851, column 1, paragraph SYNTHESIS | 1-28                  |
| X        | US 5 675 030 A (KRISHNAN ET AL)<br>7 October 1997 (1997-10-07)                                               | 32-40                 |
| A        | the whole document                                                                                           | 1-28                  |
|          | -----<br>-/-                                                                                                 |                       |

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

## \* Special categories of cited documents:

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

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

Date of the actual completion of the international search

21 October 2006

Date of mailing of the international search report

25. 01. 07

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

GRENOUILLAT, N

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2006/020540

233

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages.                                                                                                                                                                                                                            | Relevant to claim No. |
|-----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| A         | NELSON ML AND CO: "Versatile and facile synthesis of diverse semisynthetic tetracycline derivatives via Pd-catalyzed reactions"<br>JOURNAL OF ORGANIC CHEMISTRY,<br>vol. 68, 2003, pages 5838-5851,<br>XP002400051<br>page 5839<br>page 5846; example 5a                                                       | 1-28,<br>32-40        |
| A         | SUM P-E ET AL: "GLYCILCYCLINES. 1. A NEW GENERATION OF POTENT ANTIBACTERIAL AGENTS THROUGH MODIFICATION OF 9-AMINOTETRACYCLINES"<br>JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, WASHINGTON, US,<br>vol. 37, no. 1, 1994, pages 184-188,<br>XP002323590<br>ISSN: 0022-2623<br>the whole document | 1-28,<br>32-40        |
| A,P       | SUM ET AL: "Synthesis and antibacterial activity of 9-substituted minocycline derivatives"<br>BIOORGANIC & MEDICINAL CHEMISTRY LETTERS, OXFORD, GB,<br>vol. 16, no. 2,<br>15 January 2006 (2006-01-15), pages 400-403, XP005175006<br>ISSN: 0960-894X<br>page 401; figure 1                                    | 1-28,<br>32-40        |

**Information on patent family members.**

PCT/US2006/020540

234

Patent document  
cited in search report

Publication date

Patent family member(s)

Publication  
date

US 5675030

A

07-10-1997

NONE

From the  
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

To:

see form PCT/ISA/220

PCT

WRITTEN OPINION OF THE  
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY  
(PCT Rule 43bis.1)Date of mailing  
(day/month/year) see form PCT/ISA/210 (second sheet)Applicant's or agent's file reference  
see form PCT/ISA/220**FOR FURTHER ACTION**  
See paragraph 2 belowInternational application No.  
PCT/US2006/020540International filing date (day/month/year)  
25.05.2006Priority date (day/month/year)  
27.05.2005International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC  
INV. C07C231/02 C07C237/26 A61K31/65 A61P31/00Applicant  
WYETH

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

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

## 2. FURTHER ACTION

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

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of 3 months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.

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

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

Name and mailing address of the ISA:



European Patent Office  
D-80298 Munich  
Tel. +49 89 2399-0 Tx: 523656 epmu d  
Fax: +49 89 2399-4465

Date of completion of  
this opinionsee form  
PCT/ISA/210

Authorized Officer

GRENOUILLAT, N

Telephone No. +49 89 2399-8914



236  
00238

WRITTEN OPINION OF THE  
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.  
PCT/US2006/020540

Box No. I Basis of the opinion

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

237  
237

**WRITTEN OPINION OF THE  
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.  
PCT/US2006/020540

**Box No. IV Lack of unity of invention**

1. ☒ In response to the invitation (Form PCT/ISA/206) to pay additional fees, the applicant has, within the applicable time limit:
- ☐ paid additional fees
  - ☐ paid additional fees under protest and, where applicable, the protest fee
  - ☐ paid additional fees under protest but the applicable protest fee was not paid
  - ☒ not paid additional fees
2. ☐ This Authority found that the requirement of unity of invention is not complied with and chose not to invite the applicant to pay additional fees.
3. *This Authority considers that the requirement of unity of invention in accordance with Rule 13.1, 13.2 and 13.3 is*
- ☐ complied with
  - ☒ not complied with for the following reasons:  
**see separate sheet**
4. Consequently, this report has been established in respect of the following parts of the international application:
- ☐ all parts.
  - ☒ the parts relating to claims Nos. 1-28,32-40

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

**1. Statement**

|                               |             |            |
|-------------------------------|-------------|------------|
| Novelty (N)                   | Yes: Claims | 1-28       |
|                               | No: Claims  | 32-40      |
| inventive step (IS)           | Yes: Claims | 1-28       |
|                               | No: Claims  |            |
| Industrial applicability (IA) | Yes: Claims | 1-28,32-40 |
|                               | No: Claims  |            |

**2. Citations and explanations**

**see separate sheet**

Reference is made to the following documents:

- D1: Drugs of the Future, 2001, 26, 851-858  
D2: US5675030  
D3: Journal of Organic Chemistry, 2003, 68, 5838-5851  
D4: Journal of Medicinal Chemistry, 1994, 37, 184-188

**Re Item IV: Lack of unity of invention**

1. This Authority considers that there are 2 groups of invention covered by the claims indicated as follows:
  - I: Claims 1-28, 32(part)-40(part) directed to a method for preparing at least one compound of formula 1 of the application or a pharmaceutically acceptable salt thereof, comprising a) reacting at least one nitrating agent with at least one compound of formula 2 of the application or a salt thereof, to produce a reaction mixture comprising an intermediate, and b) further reacting the intermediate to form at least one compound of formula 1 of the application, wherein the intermediate is not isolated from the reaction mixture (regarding claims 26-28 the "slurry" was considered to relate to a reaction mixture in which no compounds are isolated).
  - II: Claims 29-31, 32(part)-40(part) directed to a method for preparing at least one compound of formula 3 of the application or a salt thereof, comprising a) reacting at least one nitrating agent with at least one compound of formula 2 of the application or a salt thereof, wherein the reacting is performed at a temperature ranging from 5 to 15 °C.
2. The document D1 is regarded as being the closest prior art and discloses (see Paragraph "Synthesis" p 851):

A process for the synthesis of tigecycline comprising the steps of:

- nitration of minocycline with  $\text{KNO}_3$  and  $\text{H}_2\text{SO}_4$  to form a 9-nitro derivative,

WRITTEN OPINION OF THE  
INTERNATIONAL SEARCHING  
AUTHORITY (SEPARATE SHEET)

International application No.

PCT/US2006/020540

- reduction of this 9-nitro derivative with  $H_2$  over Pd/C in 2-methoxyethanol/2N  $H_2SO_4$  to provide 9-aminomincycline,
- acylation of 9-aminomincycline either a) with 2-bromoacetyl bromide in N,N-dimethylpropyleneurea (DMPU) to form 9-(2-bromoacetamido)minocycline, followed by reaction with tert-butylamine to yield after purification the attended tigecycline, either b) with N-tert-butylglycyl chloride to form directly the attended tigecycline.

3. Therefore, the differences between the disclosure of D1 and the two inventions can be defined as follows:

Claim 1: The subject-matter of claim 1 differs from D1 in that the nitro-intermediate is not isolated from the reaction mixture but directly involved in the reductive step.

Claim 29: The subject-matter of claim 29 differs from D1 in that the first step of nitration is performed at a specific temperature ranging from 5 to 15°C.

4. Starting from the process disclosed in D1, and according to the examples and comparative examples described in this application, it appears that claims 1 and 29 solve the same problem: how to modify the process to get the minocycline derivatives in a purer form and more specifically contaminated with a less amount of the C4-epimer.
5. The special technical feature of claim 1 is the non isolation of the nitro-intermediate from the reaction mixture.  
The special technical feature of claim 29 is the specific range of temperature of the first step (nitration).
6. Since the special technical features are neither nor corresponding, there are no same or corresponding special technical features shared by independent claims 1 and 29 of the invention. Therefore the two groups of claims define two different inventions not linked by a single general inventive concept. The application, hence does not meet the requirements of unity of invention as defined in rules 13.1, 13.2 PCT.

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

International application No.

PCT/US2006/020540

**Re Item V.**

**Reasoned statement with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement**

1. The present application does not meet the criteria of Article 33(1) PCT, because the subject-matter of claims 32 to 40 is not new in the sense of Article 33(2) PCT.

The compounds disclosed in this application are already known (see D1), therefore the subject-matter of claims 32 and 34 is not new in the sense of Article 33(2) PCT.

Moreover the use of the compounds disclosed in this application in a composition is also not new in the sense of that these compounds were *already known* (see D1 and D2), therefore the subject-matter of claims 35-40 is not new in the sense of Article 33(2) PCT.

2. Document D1 is regarded as being the closest prior art to the subject-matter of claim 1 (*see above*).

The subject-matter of claim 1 differs from D1 in that the nitro-intermediate is not isolated from the reaction mixture and direct involving in the reductive step .

The subject-matter of claim 1 is therefore new (Article 33(2) PCT).

The problem to be solved by this application is to find a process which produce the minocycline derivatives in a purer form and more specially contaminated with a less amount of the C4-epimer.

According to comparative examples 1 and 2 using the method described in D1 (see pages 44-56 of this application), the isolated aminominocycline derivate (4) is contaminated with 1.75% to 3.88% of the C4-epimer. According to example 1 using the method claimed in this application (see page 50 of this application), the isolated aminominocycline derivate (4) is contaminated with 0.9% of the C4-epimer.

D2 discloses the purification of compounds of formula 1, contaminated with the C4-epimer and oxidative degradation by-products by performing an extraction on the crude compound. The purity of the final compounds obtained by this method is 92 to 98.5%. There is no indication in D2 to modify to process of the synthesis of compounds of formula 1 in order to get them in a purer form (column 2 line 57 to column 3 lines 35).

None of the documents cited in the search report show or suggest that the non isolation of the nitro-derivatives would allow to higher the purity of the 9-aminomincyclines. Therefore the subject matter of claim 1 appears to be novel and inventive.

Claims 2-28 are dependent on claim 1 and as such also meet the requirements of the PCT with respect to novelty and inventive step.

3. Further remarks

- 3.1 Claims 1, 24 and 26 are not supported by the description as required by Article 6 PCT, as their scope is broader than justified by the description and drawings. The reasons therefor are the following:

Claims 1, 24 and 26 claim the formation of an intermediate resulting of reaction of a nitrating agent with a compound of formula 2. According to the description of the complete reaction scheme described in this application, the only intermediate formed seems to be the 9-nitromincycline derivate (compound 3). Therefore the term "intermediate" using in claims 1, 24 and 26 without precisising the nature of this intermediate, renders the scope of the claims broader than justified by the description.

- 3.2 Claim 6 refers to the concentration of the nitric acid but fails to define if it is the concentration of the nitric acid solution used for the reaction or the concentration in the reaction mixture. Therefore claim 6 is not clear and does not meet the requirement of Article 6 PCT.

- 3.3 Claims 18 and 19 do not meet the requirements of Article 6 PCT in that the matter for which protection is sought is not clearly defined. The claims attempt to define

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

International application No.

PCT/US2006/020540

the subject-matter in terms of the result to be achieved, which merely amounts to a statement of the underlying problem, without providing the technical features necessary for achieving this result.

- 3.4 Claim 26 does not meet the requirement of Article 6 PCT in that claim 26 comprises all the features of claim 1 ("slurry" is defined as being the reaction mixture of step (a)) and is therefore not appropriately formulated as a claim dependent on the latter (Rule 6.4 PCT). Claims 27 and 28 are dependent on claim 26 and also does not meet the requirements of Article 6 PCT.
- 3.5 Contrary to the requirements of Rule 5.1(a)(ii)PCT, the relevant background art disclosed in D1 and D2 is not mentioned in the description, nor is these documents identified therein.

**Re Item VI**

**Certain documents cited**

**Certain published documents**

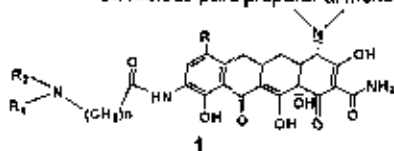
Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2006, 16, 400-403  
Available online: 21 October 2005

244  
244

|                                                                                                                                                                                                                  |  |                                                                                                                                                                                                                             |  |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|
|  <b>Industria y Comercio</b><br>SUPERINTENDENCIA                                                                                |  | <b>SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO</b><br><b>DIVISION DE NUEVAS CREACIONES</b><br>EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN<br>SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT                                                               |  |
| (21) N° de solicitud:<br><br>(22) Fecha de solicitud:<br><br>(30) Prioridad    (31) No.    (32) Fecha    (33) Pais<br>60/685,291    27/05/05    US                                                               |  | (51) Int Cl:    C07C 231/02, A61K 31/65, A61P 31/00, C07C 237/26<br><br>(71) Solicitante(s)    WYETH<br><br>(72) Inventor(es)    KRISHNAN, Lalitha<br>SUM, Phaik-Eng<br>y otros<br>(74) Apoderado:    ALVARO CORREA ORDÓÑEZ |  |
| (85) Fecha límite inicio fase nacional:    27/12/07<br>(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT<br>Fecha de presentación de la solicitud:    25/05/06<br>No. de solicitud    PCT/US2006/020540 |  | (87) Publicación internacional<br>Fecha:    07/12/06<br>N° publicación:    WO/2006/130501                                                                                                                                   |  |
| (54) Título:    TIGECICLINA Y MÉTODOS PARA PREPARAR 9-NITROMINOCICLINA                                                                                                                                           |  |                                                                                                                                                                                                                             |  |

Reivindicación(es):

1. Un método para preparar al menos un compuesto de fórmula 1,

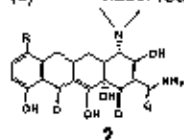


o una sal aceptable para uso farmacéutico del mismo,

donde R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> se selecciona cada uno en forma independiente de hidrógeno, alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>) de cadena recta y ramificada y cicloalquilo, o R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub>, junto con N, forman un heterociclo; R es -NR<sub>3</sub>R<sub>4</sub>, donde R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> se selecciona cada uno en forma independiente de hidrógeno, y alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) de cadena recta y ramificada; y n oscila entre 1-4,

que comprende:

- (a) hacer reaccionar al menos un agente nitrante con al menos un compuesto de fórmula 2,



o una sal del mismo, para producir una mezcla de reacción que comprende un intermediario; y

- (b) hacer además reaccionar el intermediario para formar el al menos un compuesto de fórmula 1, donde el intermediario no se aísla de la mezcla de reacción.

245 247

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 07-135330- -00000-0000

Fecha: 2007-12-21 16:08:35 Dep. 2020 NULCREACION/  
Tra. 11 PATENTE/YP Eje 378 NASENACIONAL/  
Act 411 PRESENTACION Folios: 246



# Industria y Comercio

## SUPERINTENDENCIA

Delegatura de Propiedad Industrial  
División de Nuevas Creaciones

### REQUISITOS NECESARIOS PARA PRESENTACIÓN Y AGILIZACIÓN DEL TRAMITE

|                                                                                                             | USUARIO | RADICADOR |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|-----------|
| PATENTE DE INVENCION (X) MODELO DE UTILIDAD ( )                                                             | ( )     | ( )       |
| -Indicación de que se solicita la concesión de una patente.                                                 | (X)     | (X)       |
| -Datos de identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud.                      | (X)     | (X)       |
| -Descripción de la invención.                                                                               | (X)     | (X)       |
| -Dibujos de ser estos pertinentes.                                                                          | (X)     | (X)       |
| -Comprobante de Pago de las tasas establecidas.                                                             | (X)     | (X)       |
| COMPLETA (X) INCOMPLETA                                                                                     | ( )     | ( )       |
| DISEÑO INDUSTRIAL ( )                                                                                       |         |           |
| -Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial.                                            | ( )     | ( )       |
| -Datos de identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud.                      | ( )     | ( )       |
| -Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del Material que incorpora el diseño. | ( )     | ( )       |
| -Comprobante de Pago de las tasas establecidas.                                                             | ( )     | ( )       |
| COMPLETA ( ) INCOMPLETA                                                                                     | ( )     | ( )       |
| ESQUEMA DE TRAZADO ( )                                                                                      |         |           |
| -Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial.                                            | ( )     | ( )       |
| -Datos de identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud.                      | ( )     | ( )       |
| -Representación gráfica del Esquema Trazado.                                                                | ( )     | ( )       |
| -Comprobante de Pago de las tasas establecidas.                                                             | ( )     | ( )       |
| COMPLETA ( ) INCOMPLETA                                                                                     | ( )     | ( )       |

Firma Responsable:

Fecha:

Diciembre 21, 2007

246 248

REPUBLICA DE COLOMBIA  
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá,  
2020

Doctor(a)  
CORREA ORDÓÑEZ ALVARO  
Apoderado(a) y/o Representante de  
WYETH

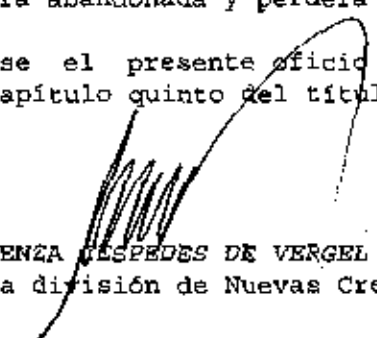
|            |                            |                   |
|------------|----------------------------|-------------------|
| REFERENCIA | Radicación No.             | 7 135330          |
|            | Solicitud internacional    | PCT/US2006/020540 |
|            | Fecha inicio fase nacional | 27/12/2007        |
|            | Trámite                    | 11                |
|            | Evento                     | 378               |
|            | Actuación                  | 430               |
|            | Oficio No.                 | 1101              |

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 la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante. (Art. 26-k) Decisión 486.

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

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

  
ALIX CARMENZA ESPEDEZ DE VERGEL  
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de  
fecha 5 + FEB 2008  
adpall