



Q. F.

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

Organización CSA Ltda

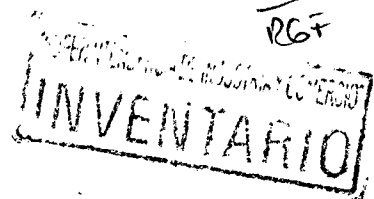
Delegatura de Propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

PCT

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION



07-134135

1. EXPEDIENTE No.

4. TÍTULO « TIGECICLINA Y MÉTODOS PARA PREPARAR
9-AMINOMINOCICLINA »

1. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL

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

1. SOLICITANTE

WYETH

DOMICILIO

NEW JERSEY, ESTADO UNIDO

4. APODERADO

ALVARO CORREA ORDONEZ.
T.P. 20.281

2. BOGOTÁ, D. C., DICIEMBRE 19, 2007

592 (30-05-08)

45

PETITORIO

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 07-134135- -00000-0000

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

Fecha: 2007-12-19 16:07:26 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 287

ción

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: office.bogota@bakernet.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, Nontreal-Nord, Quebec H1H 1C6, Canadá; 178 Arbor Lane, Colchester, VT 05446, 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, Estadounidense, Estadounidense, Estadounidense y Estadounidense, respectivamente.

⑤ PCT (85)

Solicitud Internacional No. PCT/US2006/020536

Fecha 25-MAY-06

Publicación Internacional No. WO/2006/130500

Fecha 07-DIC-06

⑥ Título (54)

TIGECICLINA Y MÉTODOS PARA PREPARAR 9-AMINOMINOCICLINA

⑦

Clasificación Internacional (51)

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

⑧

Prioridad

(33) País de Origen

US

(32) Fecha

27-MAY-05

(31) Número de Solicitud

60/685,146

SI

☒

NO

☐

⑨

Comprobante de pago No. 07-93800

Fecha 19-NOV-07

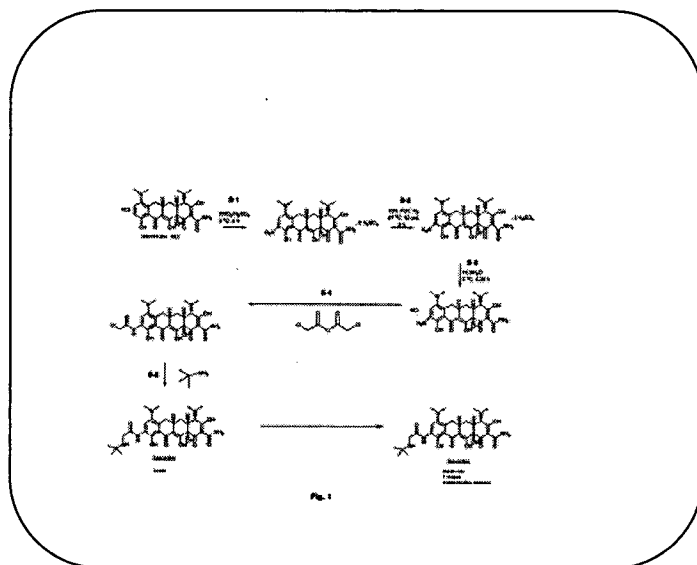
10

ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- ☒ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica
- ☒ Poderes, si fuere el caso
- ☒ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante
- ☐ Declaraciones
- ☒ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar 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 Internacional y Opinión escrita, solicitud de corrección de errores en la publicación internacional y notificación de presentación de documento de prioridad.

11

FIGURA CARATERISTICA



12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: ALVARO CORREA ORDOÑEZ

FIRMA:

C.C. 79.143.366 de Usaquén

T.P. 20.281

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

~~00000023~~

00003

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 07-134135- -00000-0000

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 07 - 93,800
 FECHA : NOVIEMBRE 19 DE 2007

Fecha: 2007-12-19 16:07:26 Dep. 2020 NUECREACIONI
 Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
 Act. 411 PRESENTACION Folios: 287

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
RAISBECK LARA RODRIGUEZ	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	57478456	19/11/2007	47,408,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	
1		TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	482,000.00
		TOTAL :	\$ 482,000.00

SON: CUATROCIENTOS OCHENTA Y DOS MIL PESOS

RESPONSABLE :

TRADUCCIÓN OFICIAL No. 490/07 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 20 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-AMINOMINOCICLINA".
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 No. 01016
DE MINISTERIO DE JUSTICIA

[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. A296282
- 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
RESOLUCION No. 01016
DE 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

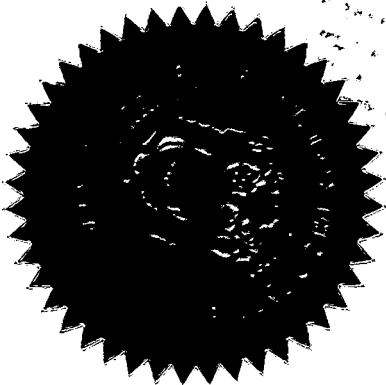
(CONVENTION DE LA HAYE DU 5 OCTOBRE 1961)

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. A296282
9. SEAL/STAMP:
10. SIGNATURE

Bradley Abelow



Raisbeck, Lara, Rodríguez & Rueda
Av. 82 No. 10 - 62 6th Floor
Bogotá, Colombia

NIT: 860.068.840-3
Tel: +57 1 634 1500
Fax: +57 1 376 2211
www.bakernet.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, Rodríguez & 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/US2006/020536 and entitled "TIGECYCLINE AND METHODS OF PREPARING 9-AMINOMINOCYCLINE" 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 CONCHA**

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/US2006/020536 y titulada "**TIGECICLINA Y METODOS PARA PREPARAR 9-AMINOMINOCICLINA**"

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.

Igualmente, 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

000008

NOTARIAL CERTIFICATIONCERTIFICACION NOTARIAL

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

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

CERTIFIES

1. That **William H. Calnan**

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

set his hand on the foregoing document.

suscribió de su puño y letra el documento que antecede.

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

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

3. That the grantor has executed the foregoing document as

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

Assistant Secretary

Subsecretario

of the judicial person **WYETH**

de la persona jurídica **WYETH**

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

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

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

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

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.

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

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

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:

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:

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

Acta de la reunión de la 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

000009

TRADUCCIÓN OFICIAL No. 491/07 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 20 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-AMINOMINOCICLINA". Certificación notarial suscrita por Barbara A. Kiely, Notario Público del estado de Nueva Jersey, y legalizaciones subsiguientes.

AM102035

DECLARACIÓN JURAMENTADA

MARIA TERESA LARA R.
TRADUCTORA OFICIAL
RESOLUCION No. 01016
DE MINISTERIO DE JUSTICIA

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. 60/685,146, titulada: "TIGECICLINA Y METODOS PARA PREPARAR 9-AMINOMINOCICLINA"), 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

PARA USO EN COLOMBIA

Estado de Nueva Jersey)
)
 Condado de Morris)

(Fdo.) Barbara A. Kiely
Notario Público

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

ARIA TERESA LARA R.
TRADUCTORA OFICIAL
RESOLUCION No. 0140
DE MINISTERIA

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 Giralda Farms
Madison, Nueva Jersey 07940

MARIA TERESA LARA R.
TRADUCTORA OFICIAL
RESOLUCION NO. 01416
DE MINISTERIA

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-AMINOMINOCICLINA

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. 60/685,146 presentada el: 27 de mayo de 2005

TERESA LARA R.
TRADUCTORA OFICIAL
RESOLUCION No. 0116
DE MINISTERIO DE JUSTICIA

[] 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 L.
TRADUCTORA OFICIAL
RESOLUCION No. 0110
DE MINISTERIO

SS:

MARIA TERESA LAR
TRADUCTORA OFICIAL
RESOLUCION No. 01816
DE MINISTRIA

SS:

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

(Fdo.) Sylvain Daigneault
Sylvain Daigneault

21 Noviembre 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.

MARIA TERESA LARA R.
TRADUCTORA OFICIAL
RESOLUCION No. 01416
DE MINUTERIA

(Fdo.) Line Martin
Notario Público

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

(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.

(Fdo.) Line Martin
Notario Público

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

(Fdo.) Anthony Scott Pilcher
Anthony Scott Pilcher
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 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
Jeffrey Marshall Horne
11-Nov-2005
Fecha

RECONOCIMIENTO

Estado de Nueva York }
ss:
Condado de Clinton }

RIA TERESA LARA R.
TRADUCTORA OFICIAL
RESOLUCION No. 01816
DE MINISTRIA

000017

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

TERESA LARA
TRADUCTORA OFICIAL
RESOLUCION No. 01/05
DE MINISTERIO

(Fdo.) Adam Joseph Tuper
Adam Joseph Tuper
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 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

(Fdo.) Joseph James McCauley III11-Nov-2005

Joseph James McCauley IIIFecha

RECONOCIMIENTO

Estado de Nueva York }

Condado de Clinton }

ss:

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
TRADUCTORA OFICIAL
RESOLUCION No. 0116
DE MINISTRIA

(Fdo.) Adam P. Michaud11-Nov-2005

Adam P. MichaudFecha

RECONOCIMIENTO

Estado de Vermont }

Condado de Chittenden }

ss:

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.

000019

(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)

TERESA R.
TRADUCTORA OFICIAL
RESOLUCION No. 016
DE MINISTRIA

- 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. A296293
- 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.



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



MARIA TERESA LARA
TRADUCTORA OFICIAL
RESOLUCION NO. 01016
DE MINISTERIO DE JUSTICIA

00021
APOSTILLE

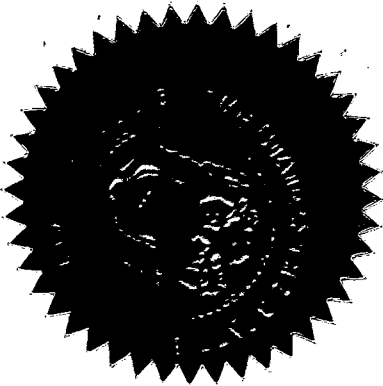
(CONVENTION DE LA HAYE DU 5 OCTOBRE 1961)

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. A296293
9. SEAL/STAMP:
10. SIGNATURE

Bradley Abelow



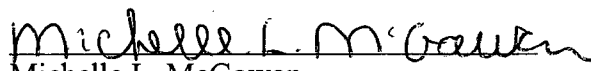
AM102035

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. 60/685,146, entitled: "TIGECYCLINE AND METHODS OF PREPARING 9-AMINOMINOCYCLINE") 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

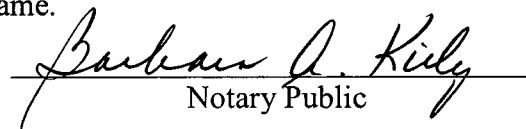

Michelle L. McGowan
Legalization Associate

TO BE USED IN COLOMBIA

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.


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

000024

(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-AMINOMINOCYCLINE

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

and which is found in U.S. Provisional Application No. 60/685,146 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.

Lalitha Krishnan

Date Nov. 28, 2005

State of New York }
County of Rockland }

ROSEANN D. JASTROW
NO. 01JA6085816
QUALIFIED IN ROCKLAND COUNTY
MY COMMISSION EXPIRES 01-06-2007

Rose Ann D. Johnson
Notary Public

000026

Phaik-Eng Sum
Phaik-Eng Sum

Nov 28, 2005
Date

ACKNOWLEDGMENT

State of New York }
County of Rockland }
ss:

On the 28th 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. 01JA6085816
QUALIFIED IN ROCKLAND COUNTY
MY COMMISSION EXPIRES 01-06-2007

Rose Ann D. Jastrow
Notary Public

Sylvain Daigneault
Sylvain Daigneault

21 NOVEMBER, 2005
Date

ACKNOWLEDGMENT

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

On the 21st 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.

F. Leclerc
Notary Public, Canada
My Commission is for life
Notary Public

000027

Michel Bernatchez
Michel Bernatchez

21-Nov-2005
Date

ACKNOWLEDGMENT

State of CANADA }

ss:

County of PROVINCE OF QUEBEC }

On the 21 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.

Line MARTIN
Line 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 }

ss:

County of Chittenden }

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. 01WI6023921
Qualified in Clinton County
Commission Expires May 3, 2007

Julie A. Winterbottom
Notary Public

00028

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. 01W3023921
Qualified in Clinton County
Commission Expires 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. 01W3023921
Qualified in Clinton County
Commission Expires May 3, 2007

Julie A. Winterbottom
Notary Public

11-29

Joseph James McCauley III
Joseph James McCauley III

11-NOV-2005
Date

ACKNOWLEDGMENT

State of New York }
County of Clinton } ss:

On the 11 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 May 3, 2007

Julie A. Winterbottom
Notary Public

~~~~~  
Adam P. Michaud 11 Nov 2005  
Adam P. Michaud 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

Julie A. Winterbottom  
Notary Public

From the INTERNATIONAL BUREAU

000030

**PCT**NOTIFICATION CONCERNING  
AVAILABILITY OF THE PUBLICATION  
OF THE INTERNATIONAL APPLICATION

RDB-AC7-GXP-MCM

To:

MCDONELL, Leslie, A.  
FINNEGAN, HENDERSON, FARABOW, GARRETT &  
DUNNER LLP  
901 New York Avenue  
Washington, DC 20001-4413  
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Date of mailing (day/month/year)

18 January 2007 (18.01.2007)

Applicant's or agent's file reference

1142-381-304

**IMPORTANT NOTICE**

International application No.

PCT/US2006/020536

International filing date (day/month/year)

25 May 2006 (25.05.2006)

Priority date (day/month/year)

27 May 2005 (27.05.2005)

Applicant

WYETH et al

The applicant is hereby **notified** that the International Bureau:☐has **published** the above-indicated international application on under  
No. WO☒has **republished** the above-indicated international application on 18 January 2007 (18.01.2007) under  
No. WO 2006/130500For an explanation as to the reason for this republication of the international application, reference is made to INID codes (15), (48)  
or (88) (*as the case may be*) on the front page of the published international application.A copy of the international application is available for viewing and downloading on WIPO's website at the following address:  
<http://www.wipo.int/pctdb> (under "Query" enter the PCT or WO number).The applicant may also request a paper copy of the published international application from the International Bureau by submitting a written  
request to PatentScope@wipo.int or to the address provided below.The International Bureau of WIPO  
34, chemin des Colombettes  
1211 Geneva 20, Switzerland

Authorized officer

Nora Lindner

Facsimile No. +41 22 338 82 70

e-mail: pt02@wipo.int

✓  
2-12-07

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

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau(43) International Publication Date  
7 December 2006 (07.12.2006)

PCT

(10) International Publication Number  
**WO 2006/130500 A3**

## (51) International Patent Classification:

C07C 231/02 (2006.01) A61K 31/65 (2006.01)  
C07C 237/26 (2006.01) A61P 31/00 (2006.01)

## (21) International Application Number:

PCT/US2006/020536

(22) International Filing Date: 25 May 2006 (25.05.2006)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

## (30) Priority Data:

60/685,146 27 May 2005 (27.05.2005) US

(71) Applicant (for all designated States except US): **WYETH**  
[US/US]; Five Firda Farms, Madison, NJ 07940 (US).

## (72) Inventors; and

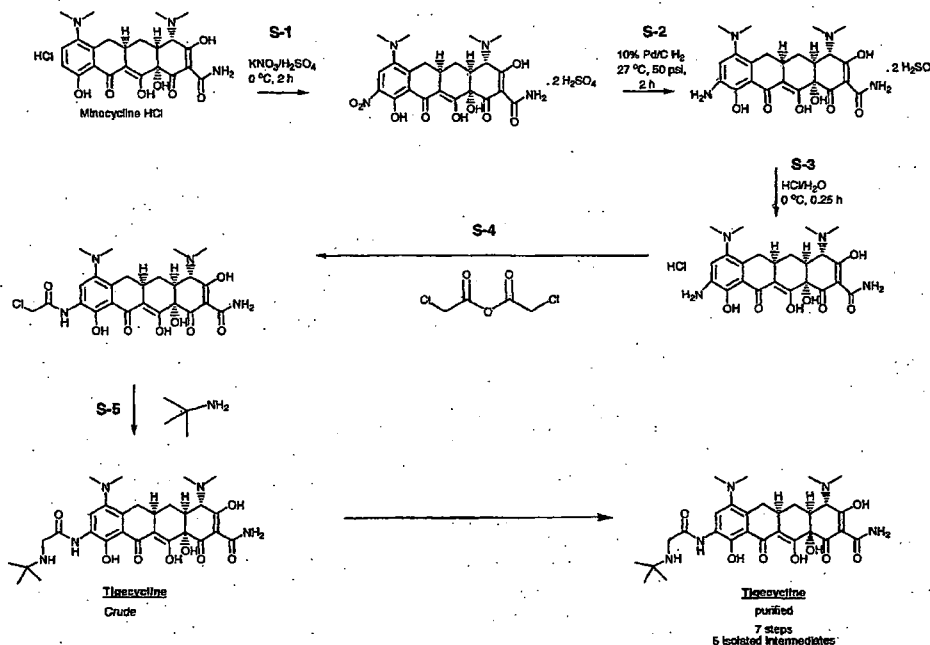
(75) Inventors/Applicants (for US only): **KRISHNAN, Lalitha** [US/US]; 2 Sonia Court, Suffern, NY 10901 (US). **SUM, Phaik-eng** [US/US]; 16 Chamberlain Court, Pomona, NY 10970 (US). **DAIGNEAULT, Sylvain** [CA/CA]; 201 Des Peupliers, Laval, XX H7R 1G6 (CA). **BERNATCHEZ, Michel** [CA/CA]; 3990, Boul. Gouin-est, Montreal-nord, Quebec, XX H1H 1C6 (CA). **PILCHER, Anthony, Scott** [US/US]; 178 Arbor Lane, Colchester, VT 05446 (US). **HORNE, Jeffrey, Marshall**[US/US]; Po Box 288, 3 East Street, Mooers, NY 12958 (US). **TUPER, Adam, Joseph** [US/US]; 10 Oakwood Drive, Rouses Point, NY 12979 (US). **MCCAULEY, Joseph, James** [US/US]; 73 Beekman Street, Planttsburgh, NJ 12901 (US). **MICHAUD, Adam, P.** [US/US]; 3 Pomfret Lane, Essex Junction, VT 05452 (US).(74) Agent: **MCDONELL, Leslie, A.**; **FINNEGAN, HENDERSON, FARABOW, GARRETT & DUNNER LLP**, 901 New York Avenue, Washington, DC 20001-4413 (US).

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

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT,

[Continued on next page]

## (54) Title: TIGECYCLINE AND METHODS OF PREPARING 9-AMINOMINOCYCLINE



(57) Abstract: Methods of preparing and purifying tetracyclines, such as tigecycline, are disclosed. Also disclosed are tetracycline compositions, such as tigecycline compositions, prepared by these methods.

## WO 2006/130500 A3



RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(88) Date of publication of the international search report:  
18 January 2007

**Published:**

- with international search report
- before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments

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

RDB/ACT/GXP/MCM

PATENT COOPERATION TREATY

WO 2006/130500  
PCT/US2006/020536

From the INTERNATIONAL BUREAU

00033

## PCT

NOTIFICATION CONCERNING  
AVAILABILITY OF THE PUBLICATION  
OF THE INTERNATIONAL APPLICATION

To:

MCDONELL, Leslie, A.  
FINNEGAN, HENDERSON, FARABOW, GARRETT &  
DUNNER LLP  
901 New York Avenue  
Washington, DC 20001-4413  
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Date of mailing (day/month/year)

07 December 2006 (07.12.2006)

Applicant's or agent's file reference

1142-381-304

## IMPORTANT NOTICE

International application No.

PCT/US2006/020536

International filing date (day/month/year)

25 May 2006 (25.05.2006)

Priority date (day/month/year)

27 May 2005 (27.05.2005)

Applicant

WYETH et al

The applicant is hereby **notified** that the International Bureau:has **published** the above-indicated international application on 07 December 2006 (07.12.2006) under  
No. WO 2006/130500has **republished** the above-indicated international application on under  
No. WOFor an explanation as to the reason for this republication of the international application, reference is made to INID codes (15), (48)  
or (88) (as the case may be) on the front page of the published international application.A copy of the international application is available for viewing and downloading on WIPO's website at the following address:  
<http://www.wipo.int/pctdb> (under "Query" enter the PCT or WO number).The applicant may also request a paper copy of the published international application from the International Bureau by submitting a written  
request to PatentScope@wipo.int or to the address provided below.The International Bureau of WIPO  
34, chemin des Colombettes  
1211 Geneva 20, Switzerland

Authorized officer

Nora Lindner

Facsimile No. +41 22 338 82 70

e-mail: pt02@wipo.int

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau



(43) International Publication Date  
7 December 2006 (07.12.2006)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 2006/130500 A2

(51) International Patent Classification:

C07C 231/02 (2006.01) A61K 31/65 (2006.01)

C07C 237/26 (2006.01) A61P 31/00 (2006.01)

(21) International Application Number:

PCT/US2006/020536

(22) International Filing Date: 25 May 2006 (25.05.2006)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:

60/685,146 27 May 2005 (27.05.2005) US

(71) Applicant (for all designated States except US): WYETH  
[US/US]; Five Firalda Farms, Madison, NJ 07940 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): KRISHNAN, Lalitha [US/US]; 2 Sonia Court, Suffern, NY 10901 (US). SUM, Phaik-eng [US/US]; 16 Chamberlain Court, Pomona, NY 10970 (US). DAIGNEAULT, Sylvain [CA/CA]; 201 Des Peupliers, Laval, XX H7R 1G6 (CA). BERNATCHEZ, Michel [CA/CA]; 3990, Boul. Gouin-est, Montreal-nord, Quebec, XX H1H 1C6 (CA). PILCHER, Anthony, Scott [US/US]; 178 Arbor Lane, Colchester, VT 05446 (US). HORNE, Jeffrey, Marshall

[US/US]; Po Box 288, 3 East Street, Mooers, NY 12958 (US). TUPER, Adam, Joseph [US/US]; 10 Oakwood Drive, Rouses Point, NY 12979 (US). MCCAULEY, Joseph, James [US/US]; 73 Beekman Street, Plantttsburgh, NJ 12901 (US). MICHAUD, Adam, P. [US/US]; 3 Pomfret Lane, Essex Junction, VT 05452 (US).

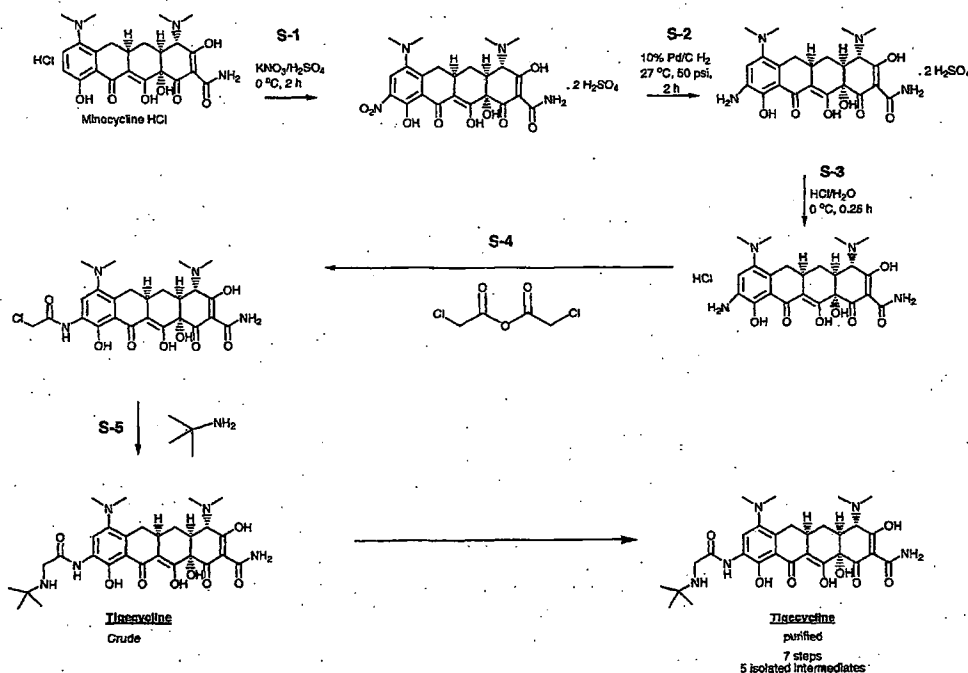
(74) Agent: MCDONELL, Leslie, A.; FINNEGAN, HENDERSON, FARABOW, GARRETT & DUNNER LLP, 901 New York Avenue, Washington, DC 20001-4413 (US).

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

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT,

[Continued on next page]

(54) Title: TIGECYCLINE AND METHODS OF PREPARING 9-AMINOMINOCYCLINE



(57) Abstract: Methods of preparing and purifying tetracyclines, such as tigecycline, are disclosed. Also disclosed are tetracycline compositions, such as tigecycline compositions, prepared by these methods.

WO 2006/130500 A2



RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

*For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.*

**Published:**

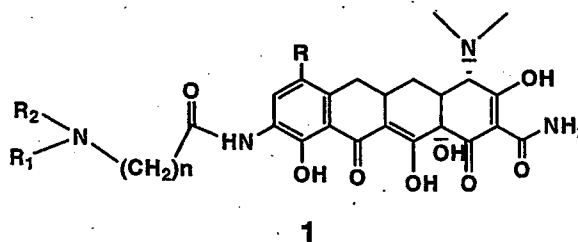
- *without international search report and to be republished upon receipt of that report*

00036

**TIGECYCLINE AND METHODS OF PREPARING 9-AMINOMINOCYCLINE**

This application claims benefit of U.S. Provisional Application No. 60/685,146, 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,

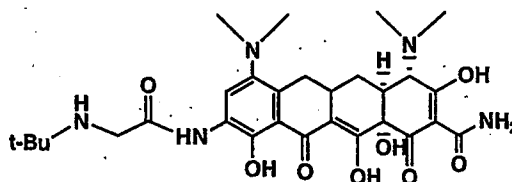


1

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.

[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*-butyl-glycylamido)-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 glycylicycline 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).

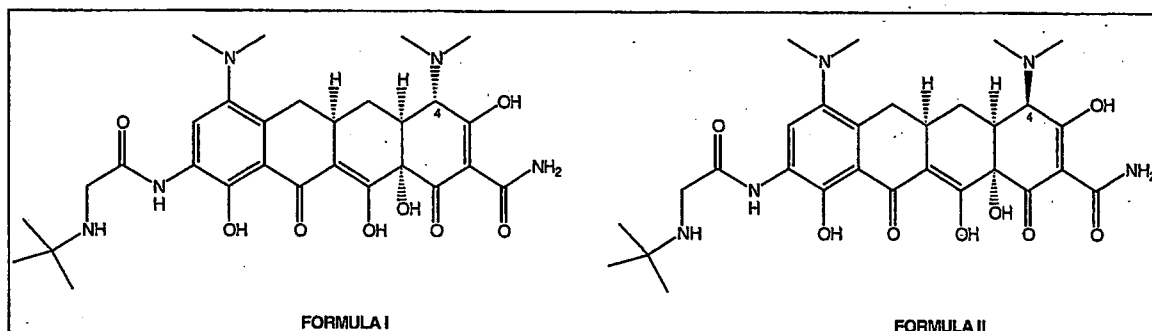
[005] Tigecycline may be used in the treatment of many bacterial infections, such as complicated intra-abdominal infections (cIAI), complicated skin and skin structure infections (cSSSI), Community Acquired Pneumonia (CAP), and Hospital Acquired Pneumonia (HAP) indications, which may be caused by gram-negative 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

000038

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.

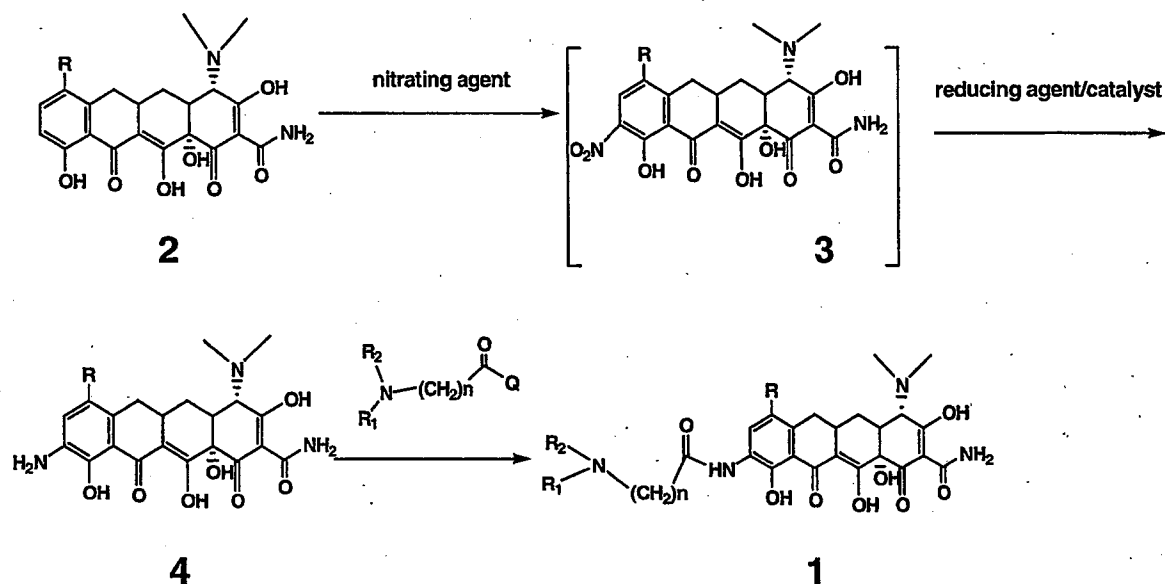
000040

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 I** below:



**Scheme I**

[016] R<sub>1</sub> and R<sub>2</sub> are each independently chosen from hydrogen, straight and branched chain (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)alkyl, and cycloalkyl, or R<sub>1</sub> and R<sub>2</sub>, together with N, form a heterocycle; and R is -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; 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<sub>2</sub> substituent to form the compound of formula 3. The -NO<sub>2</sub> 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.

000042

[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.

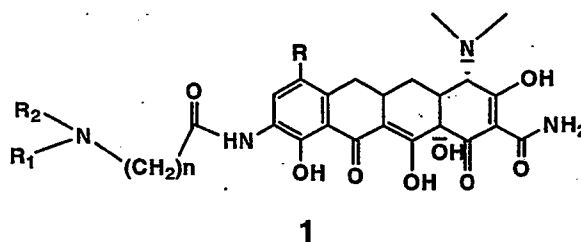
[026] "Pharmaceutically acceptable" as used herein to refer to those compounds, materials, compositions, and/or dosage forms which are, within the scope of sound medical judgment, suitable for use in contact with the tissues of patients without excessive toxicity, irritation, allergic response, or other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



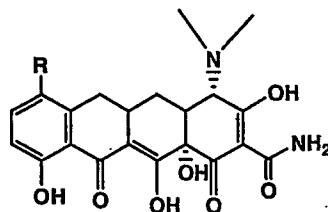
or a pharmaceutically acceptable salt thereof,

wherein R<sub>1</sub> and R<sub>2</sub> are each independently chosen from hydrogen, straight and branched chain (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)alkyl, and cycloalkyl, or R<sub>1</sub> and R<sub>2</sub>, together with N, form a heterocycle; R is -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; and n ranges from 1-4.

000023

[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,



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, cystein, 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<sub>2</sub> substituent to a compound, or transform an existing substituent to an -NO<sub>2</sub> substituent. Exemplary nitrating reagents include nitric acid and nitrate salts, such as alkali metal salts, e.g., KNO<sub>3</sub>. 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%. 000044

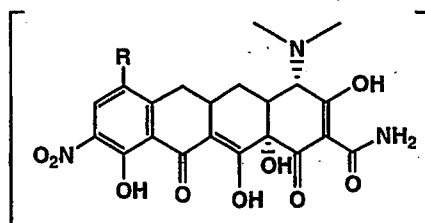
[035] In one embodiment, the at least one nitrating agent is provided in a molar excess relative to the at least one compound of formula 2. Suitable molar excesses can be determined by one of ordinary skill in the art and can include, but are not limited to, values such as at least 1.05, e.g., a molar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

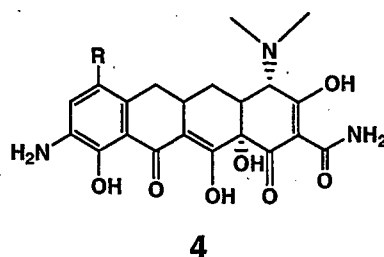
[044] In one embodiment, the nitration is performed such that the amount of starting material, e.g., the at least one compound of formula 2, is low. In one embodiment, the at least one compound of formula 2 is present in the nitration

000046

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.

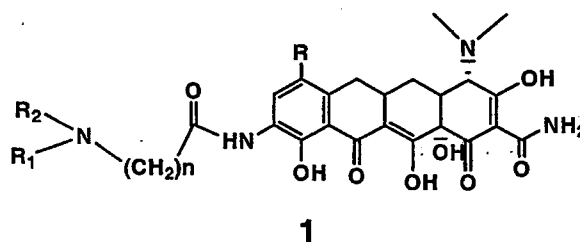
[046] In one embodiment, the reducing forms at least one compound of formula 4,



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,

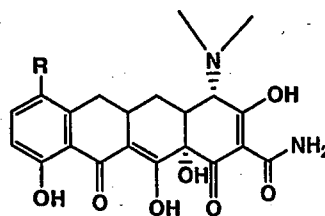


or a pharmaceutically acceptable salt thereof;

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

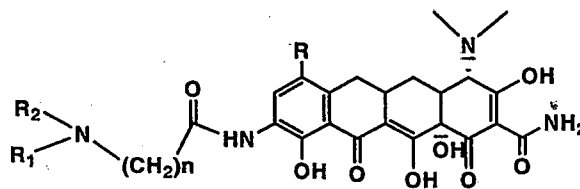
or a salt thereof, to produce a reaction mixture comprising an intermediate;  
and

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

[049] 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,



1

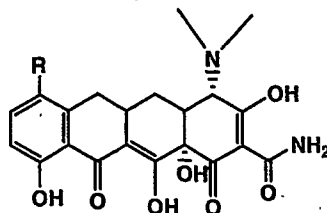
or a pharmaceutically acceptable salt thereof,

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,

000028



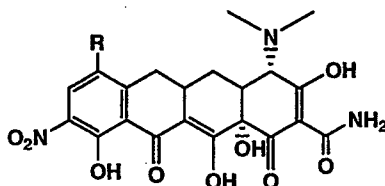
2

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.

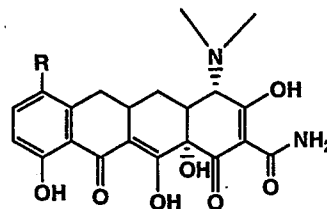
[053] Another embodiment disclosed herein is a method of preparing at least one compound of formula 3 or a salt thereof,



3

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:

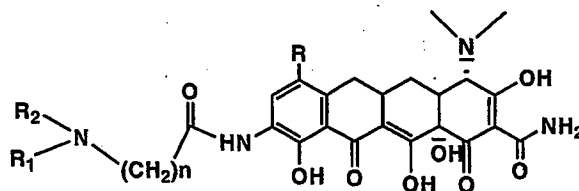
reacting at least one nitrating agent with at least one compound of formula 2 or a salt thereof,



2

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

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



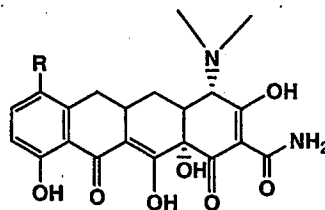
1

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

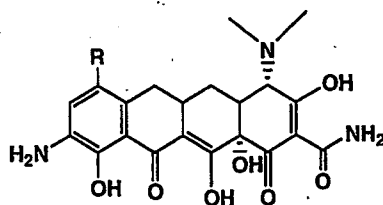
(b) further reacting the intermediate to form the at least one compound of formula 1.

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

[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,

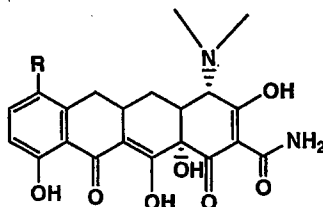


4

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 the reduction, the reaction mixture is combined with a solvent comprising at least one ( $C_1$ - $C_8$ ) alcohol. The at least one ( $C_1$ - $C_8$ ) 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 ( $C_1$ - $C_8$ ) branched chain alcohol and a ( $C_1$ - $C_8$ ) hydrocarbon. In one embodiment, the ( $C_1$ - $C_8$ ) branched chain alcohol is isopropanol. In one embodiment, the ( $C_1$ - $C_8$ ) 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.

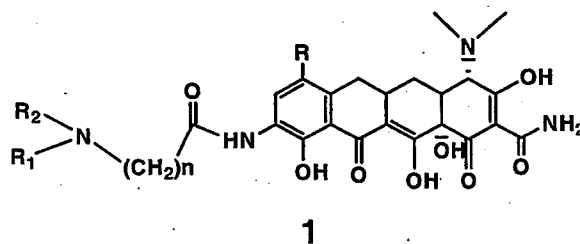
[068] In one embodiment, the solid composition comprises a  $C_4$ -epimer of formula 4 in an amount less than 10% as determined by high performance liquid

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, 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,

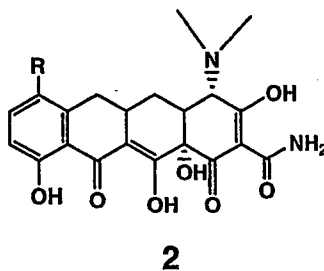


or a pharmaceutically acceptable salt thereof,

wherein R<sub>1</sub> and R<sub>2</sub> are each independently chosen from hydrogen, straight and branched chain (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)alkyl, and cycloalkyl, or R<sub>1</sub> and R<sub>2</sub>, together with N, form a heterocycle; R is -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; 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,

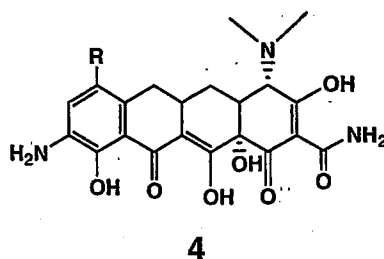


or a salt thereof, to form a second intermediate; and

(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.

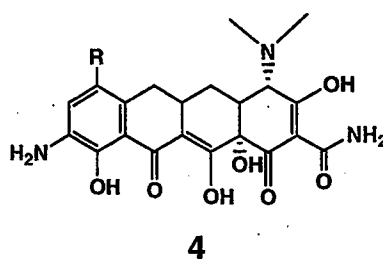
[073] In one embodiment, the intermediate is at least one compound of formula 3 or salt thereof, and the second intermediate is at least one compound of formula 4,



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.

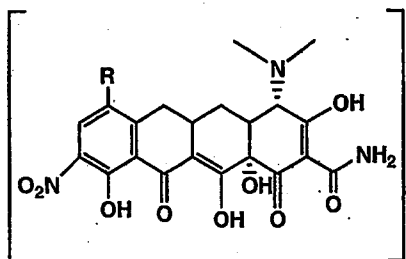
[075] Another embodiment disclosed herein is a method of preparing at least one compound of formula 4 or a salt thereof,



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:

reducing an intermediate of formula 3 or a salt thereof,

00054

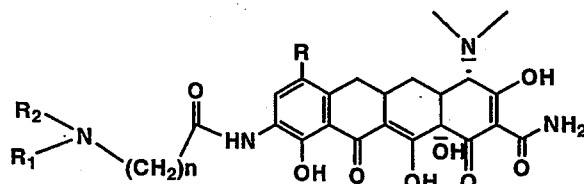


3

[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,



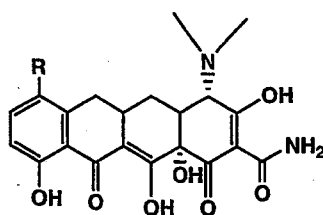
1

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,

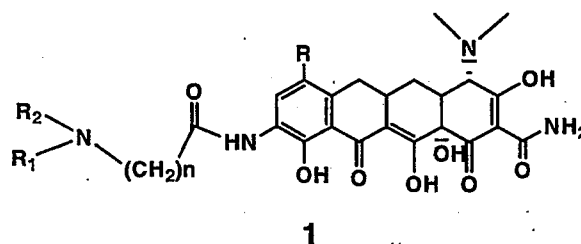


2

(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,

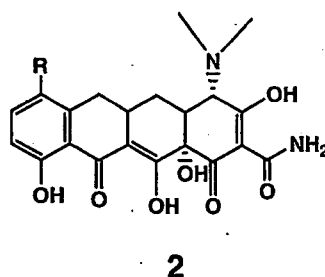


or a pharmaceutically acceptable salt thereof,

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:

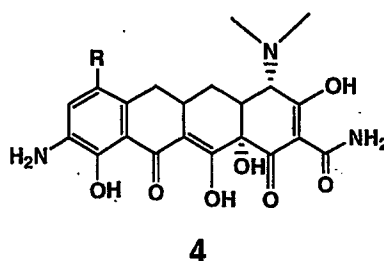
(a) combining at least one Group VIII metal-containing catalyst in the presence of hydrogen with a reaction mixture, such as a reaction mixture slurry, prepared from a reaction between at least one nitrating agent and at least one compound of formula 2 or a salt thereof,



[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,



or a salt thereof,

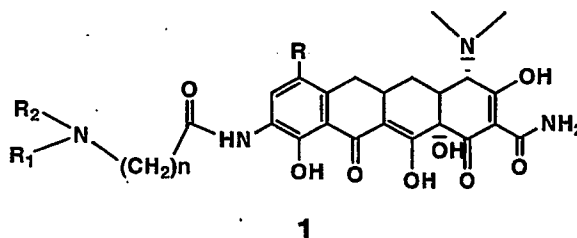
wherein R is  $-NR_3R_4$ , where  $R_3$  and  $R_4$  are each independently chosen from hydrogen, and straight and branched chain ( $C_1$ - $C_4$ )alkyl,

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

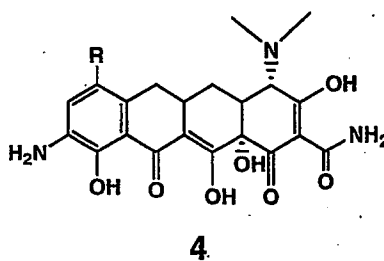
[083] One embodiment of the present disclosure provides a method for preparing at least one compound of Formula 1:



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,

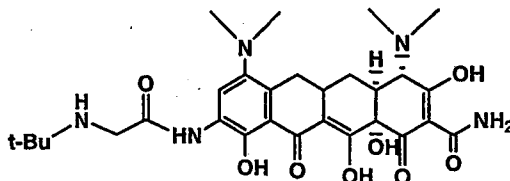
comprising reacting at least one compound of Formula 4:



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 I 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 pyrrolidinyl 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.

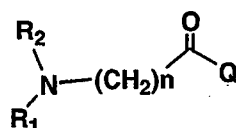
[086] The reaction medium may be a solvent chosen from a polar aprotic solvent or mixture of solvents thereof. In one embodiment, the polar aprotic solvent is chosen from acetonitrile, 1,2-dimethoxyethane, dimethylacetamide, dimethylformamide, hexamethylphosphoramide, N,N'-dimethylethyleneurea, N,N'-dimethylpropyleneurea, 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

000058

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

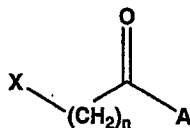
or a salt thereof,

wherein  $\text{R}_1$  and  $\text{R}_2$  are each independently chosen from hydrogen, straight and branched chain ( $\text{C}_1$ - $\text{C}_6$ )alkyl, and cycloalkyl, or  $\text{R}_1$  and  $\text{R}_2$ , 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,  $\text{R}_1\text{R}_2\text{NH}$ , to prepare at least one carboxylic acid,

wherein  $R_1$  and  $R_2$  are each independently chosen from hydrogen, straight and branched chain ( $C_1$ - $C_6$ )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 ( $C_1$ - $C_6$ )alkyl and arylalkyl, such as aryl( $C_1$ - $C_6$ )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.

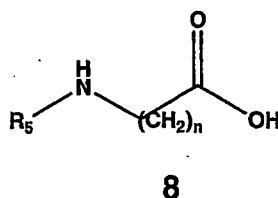
[091] In one embodiment,  $R_1$  and  $R_6$  may each be t-butyl. In another embodiment,  $R_1$  and  $R_2$ , together with N, may form a heterocycle, such as pyrrolidine, and  $R_6$  may be arylalkyl-, such as benzyl. In another embodiment, n is one. In a further embodiment, X is bromide.

[092] In another embodiment, the at least one ester of Formula 7 is a hydrochloride salt. An excess of amine  $R_1R_2NH$  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  $R_6$  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:



or a salt thereof,

wherein  $R_5$  is chosen from straight or branched ( $C_1$ - $C_6$ )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 6 °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.

[098] 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.

[099] 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.

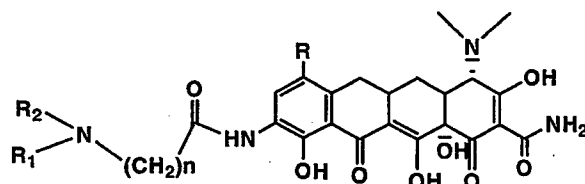
[0101] The compound of Formula 1 obtained from the reaction may be crystallized in at least one organic solvent or mixture of solvents. In one embodiment, the organic mixture of solvents comprises methanol and methylene chloride. Crystallization may, for example, occur at a temperature ranging from -15 °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.

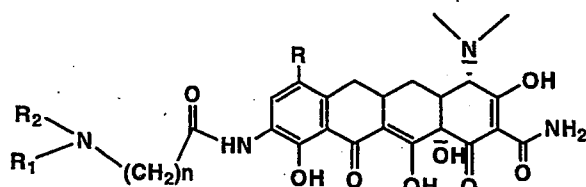
[0105] In one embodiment, the composition may comprise at least one compound of Formula 1:



**Formula 1**

or a pharmaceutically acceptable salt thereof,

wherein n is 1, R<sub>1</sub> and R<sub>2</sub>, together with N, forms a t-butyl group, and R<sub>3</sub> and R<sub>4</sub> are each methyl. In another embodiment, the composition may comprise at least one compound of formula 1:

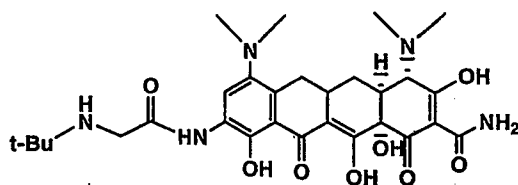
**Formula 1**

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**

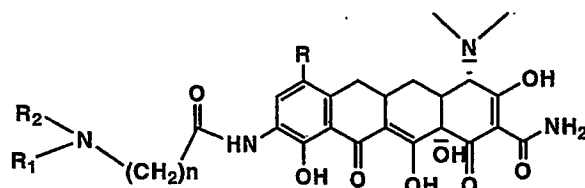
or a pharmaceutically acceptable salt thereof, and

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:

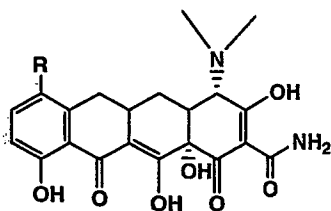


**Formula 1**

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:

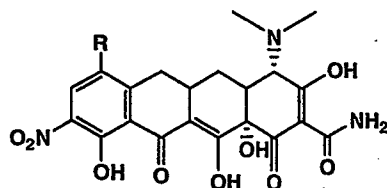
A) reacting at least one nitrating agent with at least one compound of Formula 2:



**Formula 2**

or a salt thereof,

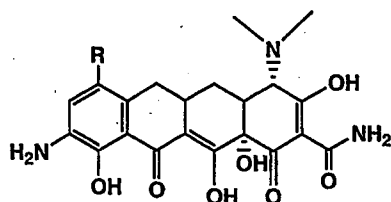
to prepare a reaction mixture slurry comprising at least one compound of Formula 3:



**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,

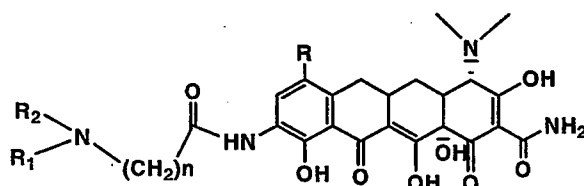
**Formula 4**

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 I prepared by this method may be tigecycline.

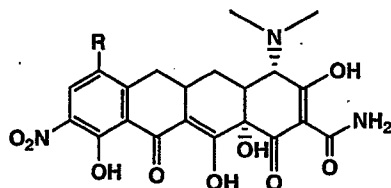
[0110] Another embodiment of the present disclosure includes a method for preparing at least one compound of Formula 1:

**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:

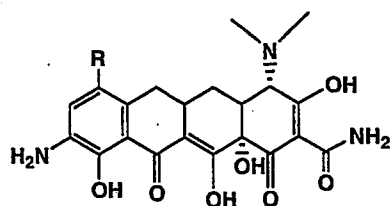
A) combining at least one reducing agent with a reaction mixture slurry comprising at least one compound of Formula 3:

**Formula 3**

or a salt thereof,

to prepare at least one compound of Formula 4:

000066

**Formula 4**

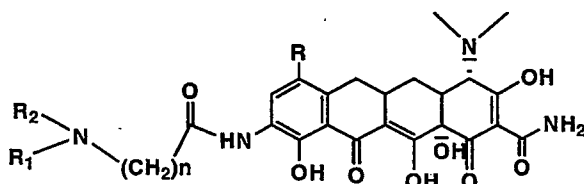
or a salt thereof, and

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 I 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

000067

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

000088

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

000069

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-[[t-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-[[pyrrolidiny]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,

000070

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.

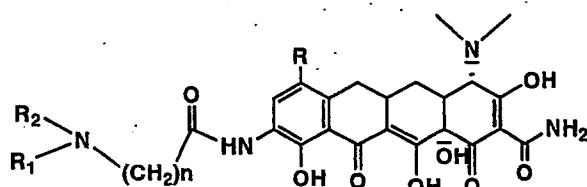
[0127] The tigecycline that is combined with at least one polar aprotic solvent and at least one polar protic solvent may be provided in a form chosen from a solid, a slurry, a suspension, and a solution. In one embodiment, the tigecycline obtained from the method may contain less than 1% of the C-4 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.

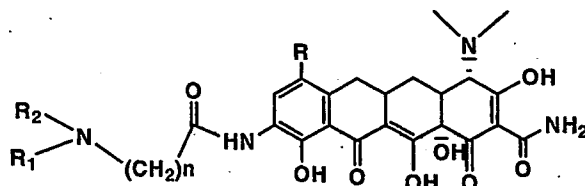
[0131] In one embodiment, the composition may comprise at least one compound of Formula 1:



**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.

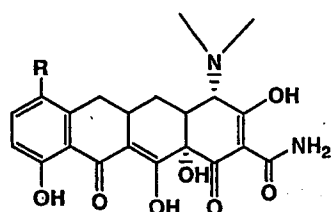
[0132] One embodiment of the disclosure includes a method for preparing at least one compound of Formula 1:



**Formula 1**

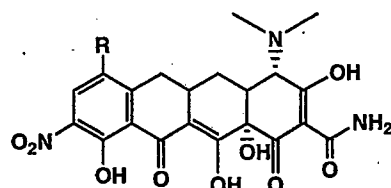
or a pharmaceutically acceptable salt thereof,  
wherein  $R_1$  and  $R_2$  are each independently chosen from hydrogen, straight and branched chain ( $C_1$ - $C_6$ )alkyl, and cycloalkyl, or  $R_1$  and  $R_2$ , together with N, form a heterocycle;  $R$  is  $-NR_3R_4$ , where  $R_3$  and  $R_4$  are 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**

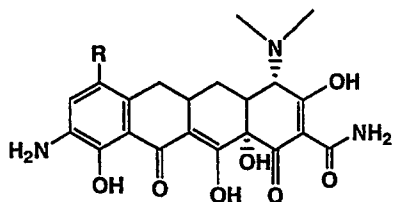
or a salt thereof,  
to prepare a reaction mixture, such as a reaction mixture slurry, comprising an intermediate, such as at least one compound of Formula 3:



**Formula 3**

or a salt thereof,

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



**Formula 4**

or a salt thereof,

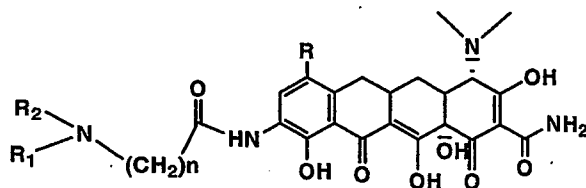
C) reacting the second intermediate with at least one aminoacyl compound in a reaction medium to obtain at least one compound of formula I. In one embodiment, the reaction medium is chosen from an aqueous medium, and at least one basic solvent in the absence of a reagent base. Additional steps may include,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



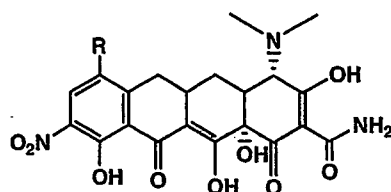
**Formula 1**

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,

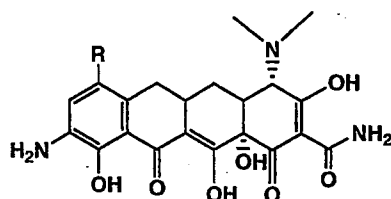
form a heterocycle; R is  $-NR_3R_4$ , where  $R_3$  and  $R_4$  are each independently chosen from hydrogen, and straight and branched  $(C_1-C_4)$ alkyl; and n ranges from 1-4, comprising:

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:

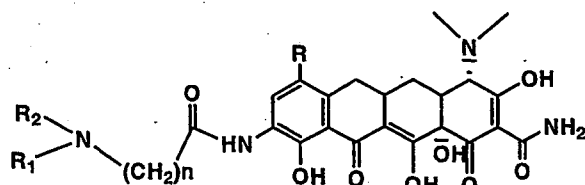
C) combining the at least one compound of Formula 1 with at least one polar aprotic solvent and at least one polar protic solvent to give a first mixture,

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:

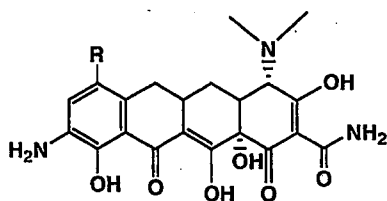
000074

**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,

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,  $R_1$  is hydrogen,  $R_2$  is t-butyl, and  $R_3$  and  $R_4$  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, 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

000076

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, edisylic, estolic, esyl, esylic, formic, fumaric, gluceptic, gluconic, glutamic, glycolic, glycolylarsanilic, hexamic, hexylresorcinoic, 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

00077

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                 |

[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.

nnn79  
[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 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)

9.46% (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.

ann 81

**Table 2**

| 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> | Mino<br>(Area %) | 9-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                  | 4.3                  | 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> 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.

00002

**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>(di H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub><br>salt, %) | Tot. 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                           | 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> 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.

000023

[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                                                                                                                                                                                                                     |

000084

**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.

000086

[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.

[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-aminocycline 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.

111088

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

000089

**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 49.5 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-aminominocycline 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,

nnn90

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-Aminominocycline 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%                          | 4.49%               | 2.76%                         | 2.76%  | 8 days                     |
| (Comp.<br>Example 1)         | 52 kg                               | 90.4%    | 37.0%                          | 6.45%               | 0.84%                         | 1.75%  | 24 days                    |
|                              | 52 kg                               | 87.9%    | 27.2%                          | 9.72%               | 3.73%                         | 3.88%  | 25 days                    |
| (Comp.<br>Example 2<br>or 3) | 104 kg                              | 86.4%    | 48% <sup>2</sup>               | 10.79%              | 0.63%                         | 3.18%  | 33<br>days <sup>3</sup>    |
|                              |                                     | 87.8%    |                                | 9.31%               | 0.57%                         | 2.46%  |                            |
| (Example 4<br>or 5)          | 104 kg                              | 87.7%    | 57%                            | 3.5%                | 1.2%                          | 0.72%  | 14 days                    |

<sup>1</sup> cycle time is from minocycline.HCl to 9-aminominocycline 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 µm, 15 x 0.46 cm                                                                                                                                 |
| Mobile Phase: | 80% (0.05 M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> + 10 mL triethylamine/L phosphate + H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> to pH 6.2)/ 20% Acetonitrile + 0.5 g NaEDTA |
| Flow rate     | 1.0 mL/min                                                                                                                                                 |
| Detection     | 250 nm                                                                                                                                                     |

000091

### 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 N<sub>2</sub>, 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%

### 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)

000092

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 and the phases were separated. The aqueous layer was extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (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

000093

the filtrate was concentrated by distillation (20 °C, 80-120 mm Hg) to a volume of 400 mL. To this mixture was added CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (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 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (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-butylbromoacetate 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<sup>+</sup>).

[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<sup>+</sup>).

### 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

011096

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 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. 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+).

### 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.

000097

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-H <sub>2</sub> O<br>(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                |

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

| Example | Solvent          | Yield | Results <sup>1</sup>                                               |
|---------|------------------|-------|--------------------------------------------------------------------|
| 18      | NMP              | --    | Reaction "works well on small scale," "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,  $d(0.5) = 103 \mu\text{m}$ ), 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 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

<sup>2</sup> Reaction mixture was quenched with isopropanol-ethyl acetate, then partitioned between water and  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . The organic phase was concentrated, then diluted with toluene prior to isolation of the product.

000000

pressure equalizing addition funnel was added the milled N-t-butylglycine hydrochloride (450 g, 2.68 moles,  $d(0.5) = 664 \mu\text{m}$ ), 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 79 – 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 charges 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-aminominocycline HCl. Wet cake analytical results: minocycline = 1.26%, single largest impurity = 0.37%, C-4 epimer = 0.50%.

### Example 23

#### Tigecycline

[0221] 9-Aminominocycline 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

00101

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-aminominocycline HCl.

### **Comparative Example 24**

#### **Tigecycline Monohydrochloride**

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

[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-aminominocycline 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-chloroacetamidominocycline (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-chloroacetamidominocycline*

[0225] Methylene chloride (325 mL) was cooled to -5 to 0 °C and 9-Aminominocycline 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-Chloroacetamidominocycline (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

<sup>3</sup> The washed Amberchrom®(CG161M) resin was prepared by adding 183 g of filtered, homnagonized 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.

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 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, 386 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

---

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

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 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 Mino-cycline•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                                |

| Minocycline•HCl source | Tigecycline processing stage | Total impurities in final Tigecycline (%) | Recovered Mino-cycline•HCl (%) | C-4 epimer in final Tigecycline (%) |
|------------------------|------------------------------|-------------------------------------------|--------------------------------|-------------------------------------|
| Interchem purified     | purified                     | 0.38                                      | 0.10                           | 0.15                                |
| 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>5</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-aminominocycline (0%), and for the largest single impurity other than 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

<sup>5</sup> Dry weight calculated from loss on drying data.

00111

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 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

---

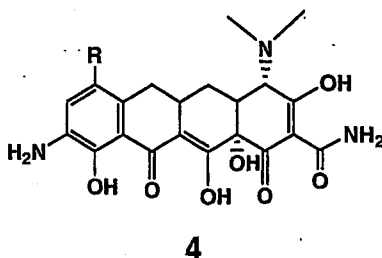
<sup>6</sup> Dry weight calculated from loss on drying data.

00112

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:

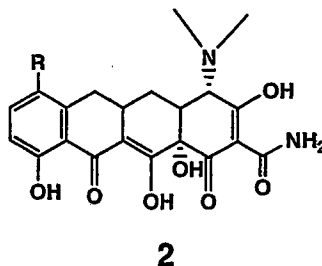
1. A method of preparing at least one compound of formula 4,



or a salt thereof,

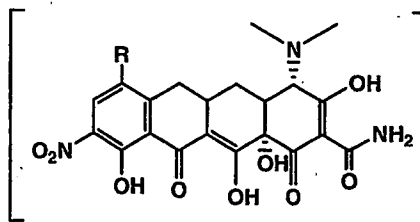
wherein  $R = -NR_3R_4$ , where  $R_3$  and  $R_4$  are each independently chosen from hydrogen, and straight and branched chain ( $C_1$ - $C_4$ )alkyl, comprising:

combining at least one reducing agent with a reaction mixture 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.

2. The method according to claim 1, wherein the intermediate is a compound of formula 3 or a salt thereof.



3. The method according to claim 1 or claim 2, wherein the at least one reducing agent is provided in the presence of at least one catalyst.

4. The method according to claim 3, wherein the at least one catalyst is chosen from rare earth metal oxides, Group VIII metal-containing catalysts, and salts of Group VIII metal-containing catalysts.

5. The method according to claim 4, wherein the at least one catalyst is chosen from Group VIII metal-containing catalysts.

6. The method according to claim 5, wherein the Group VIII metal-containing catalyst comprises palladium.

7. The method according to claim 6, wherein the Group VIII metal-containing catalyst is palladium on carbon.

8. The method according to claim 7, wherein the palladium on carbon is in wet form.

9. The method according to claim 7 or claim 8, wherein the palladium on carbon 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.

10. The method according to any one of claims 1 to 9, wherein the at least one reducing agent is hydrogen.

11. The method according to claim 10, wherein the hydrogen is provided at a pressure ranging from 1 to 75 psi.

12. The method according to claim 10, wherein the hydrogen is provided at a pressure ranging from 1 to 50 psi.

13. The method according to any one of claims 1 to 12, wherein prior to the combining, the reaction mixture is combined with a solvent comprising at least one (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>) alcohol.

14. The method according to claim 13, wherein the at least one (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>) alcohol is chosen from methanol and ethanol.

15. The method according to any one of claims 1 to 14, wherein the combining is performed at a temperature ranging from 0°C to 50°C.

16. The method according to claim 15, wherein the combining is performed at a temperature ranging from 20°C to 40°C.

17. The method according to claim 16, wherein the combining is performed at a temperature ranging from 26°C to 28°C.

18. The method according to any one of claims 1 to 17, wherein the at least one nitrating agent is chosen from nitrate salts and nitric acid.

19. The method according to any one of claims 1 to 18, wherein the at least one compound of formula 2 is a salt chosen from hydrochloride, hydrobromide, hydroiodide, phosphoric, nitric, sulfuric, acetic, benzoic, citric, cysteine, fumaric, glycolic, maleic, succinic, tartaric, sulfate, and chlorobenzenesulfonate salts.

20. The method according to any one of claims 1 to 19, wherein after the combining, the reaction mixture contains the at least one compound of formula 2 in an amount less than 2% as determined by high performance liquid chromatography.

21. The method according to any one of claims 1 to 19, wherein after the combining, the reaction mixture contains the at least one compound of formula 2 in an amount less than 1% as determined by high performance liquid chromatography.

22. The method according to any one of claims 1 to 21, wherein after the combining, the reaction mixture is added to 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.

23. The method according to claim 22, wherein the (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>) branched chain alcohol is isopropanol.

24. The method according to claim 22 or claim 23, wherein the (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>) hydrocarbon is chosen from hexane, heptane, and octane.

25. The method according to any one of claims 22 to 24, wherein after the combining, the reaction mixture is added to the solvent system at a temperature ranging from 0°C to 50°C.

26. The method according to any one of claims 22 to 24, wherein after the combining, the reaction mixture is added to the solvent system at a temperature ranging from 0°C to 10°C.

27. The method according to any one of claims 1 to 26, further comprising isolating the at least one compound of formula 4 as a solid composition.

28. The method according to claim 27, wherein the at least one compound of formula 4 is isolated as a salt.

29. The method according to claim 28, wherein the at least one compound of formula 4 is isolated as a salt in the presence of sodium sulfite.

30. The method according to any one of claims 27 to 29, wherein the solid composition contains a C<sub>4</sub>-epimer of formula 4 in an amount less than 10% as determined by high performance liquid chromatography.

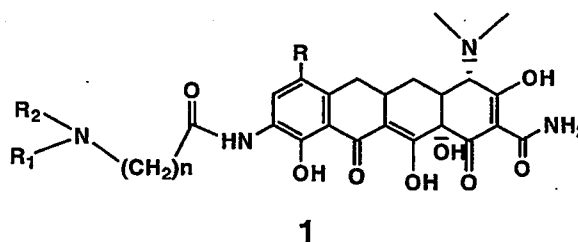
31. The method according to claim 30, wherein the solid composition contains a C<sub>4</sub>-epimer of formula 4 in an amount less than 1% as determined by high performance liquid chromatography.

32. The method according to claim 30, wherein the solid composition contains a C<sub>4</sub>-epimer of formula 4 in an amount less than 0.5% as determined by high performance liquid chromatography.

33. The method according to any one of claims 27 to 32, wherein the solid composition contains the at least one compound of formula 2 in an amount less than 2% as determined by high performance liquid chromatography.

34. The method according to any one of claims 1 to 33, wherein the at least one compound of formula 2 is present in the reaction mixture in an amount of at least 1 gram.

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



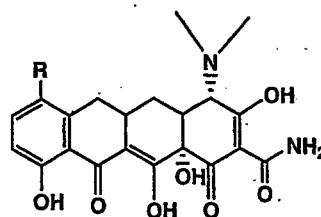
or a pharmaceutically acceptable salt thereof,

wherein R<sub>1</sub> and R<sub>2</sub> are each independently chosen from hydrogen, straight and branched chain (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)alkyl, and cycloalkyl, or R<sub>1</sub> and R<sub>2</sub>, together with N, form a heterocycle; R is -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; and n ranges from 1-4,

comprising:

(a) combining at least one reducing agent with 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,

00117



2

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

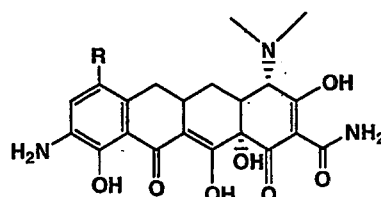
(b) further reacting the second intermediate in the reaction mixture to prepare the at least one compound of formula 1.

36. The method 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 method according to claim 35, wherein the at least one compound of formula 1 is tigecycline.

38. The method according to claim 35, wherein the at least one compound of formula 1 is tigecycline hydrochloride.

39. The method according to any one of claims 33 to 38, wherein the second intermediate in the slurry is at least one compound of formula 4,



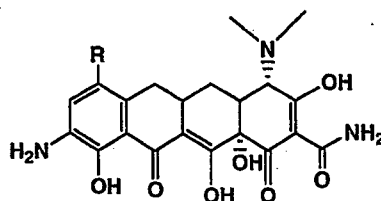
4

or a salt thereof.

40. The method according to any one of claims 35 to 39, wherein the further reacting in (b) comprises acylating the second intermediate.

41. The method according to claim 40, wherein prior to the acylating, the second intermediate is isolated as a salt.

42. A method of preparing at least one compound of formula 4 or a salt thereof,

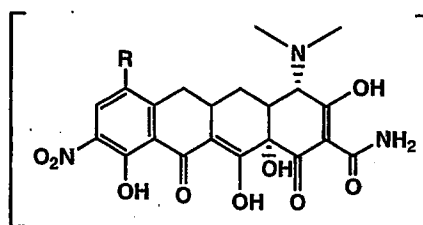


4

00118

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:

reducing an intermediate of formula 3 or a salt thereof,

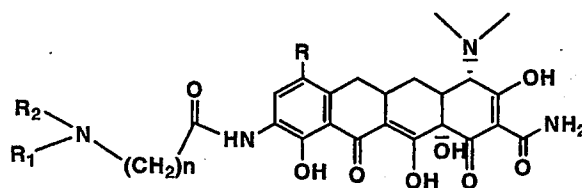


3

wherein the intermediate of formula 3 is present in a reaction mixture slurry.

43. The method according to claim 42, wherein the reducing comprises combining at least one reducing agent with the reaction mixture.

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



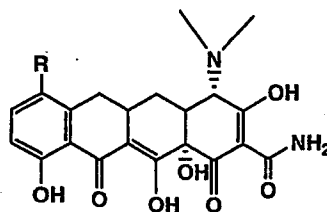
1

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 prepare a reaction mixture,



2

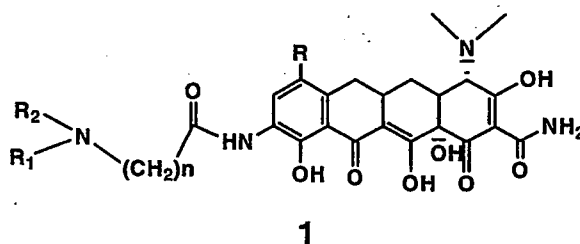
- (b) without isolating any solids from the reaction mixture, combining at least one reducing agent with the reaction mixture to prepare an intermediate; and
- (c) preparing the at least one compound of formula 1 from the intermediate.

45. The method according to claim 44, wherein  $R_1$  is hydrogen,  $R_2$  is t-butyl,  $R_3$  is methyl,  $R_4$  is methyl, and  $n$  is 1.

46. The method according to claim 44, wherein the at least one compound of formula 1 is tigecycline.

47. The method according to claim 46, wherein the at least one compound of formula 1 is tigecycline hydrochloride.

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

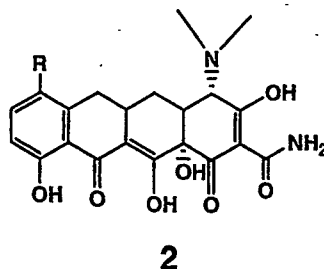


or a pharmaceutically acceptable salt thereof,

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 Group VIII metal-containing catalyst in the presence of hydrogen with 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,



wherein 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.

49. The method according to claim 48, wherein  $R_1$  is hydrogen,  $R_2$  is t-butyl,  $R_3$  is methyl,  $R_4$  is methyl, and  $n$  is 1.

50. The method according to claim 48, wherein the at least one compound of formula 1 is tigecycline.

51. The method according to claim 50, wherein the at least one compound of formula 1 is tigecycline hydrochloride.

52. A compound or a salt thereof prepared by the method according to any one of claims 1 to 51.

53. The compound according to claim 52, wherein  $R_1$  is hydrogen,  $R_2$  is t-butyl,  $R_3$  is methyl,  $R_4$  is methyl, and  $n$  is 1.

54. The compound according to claim 53, wherein the at least one compound of formula 1 is tigecycline.

55. A composition comprising a compound or a salt thereof prepared by the method according to any one of claims 1 to 51.

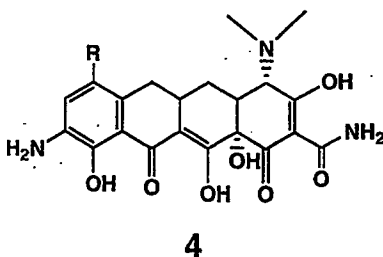
56. The composition according to claim 55, further comprising at least one pharmaceutically acceptable carrier.

57. The composition according to claim 56, wherein  $R_1$  is hydrogen,  $R_2$  is t-butyl,  $R_3$  is methyl,  $R_4$  is methyl, and  $n$  is 1.

58. The composition according to claim 57, wherein the at least one compound of formula 1 is tigecycline.

59. A composition comprising:

at least one compound of formula 4,



or a salt thereof,

00121

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.

60. The composition according to claim 59, wherein  $R_1$  is hydrogen,  $R_2$  is t-butyl,  $R_3$  is methyl,  $R_4$  is methyl, and n is 1.

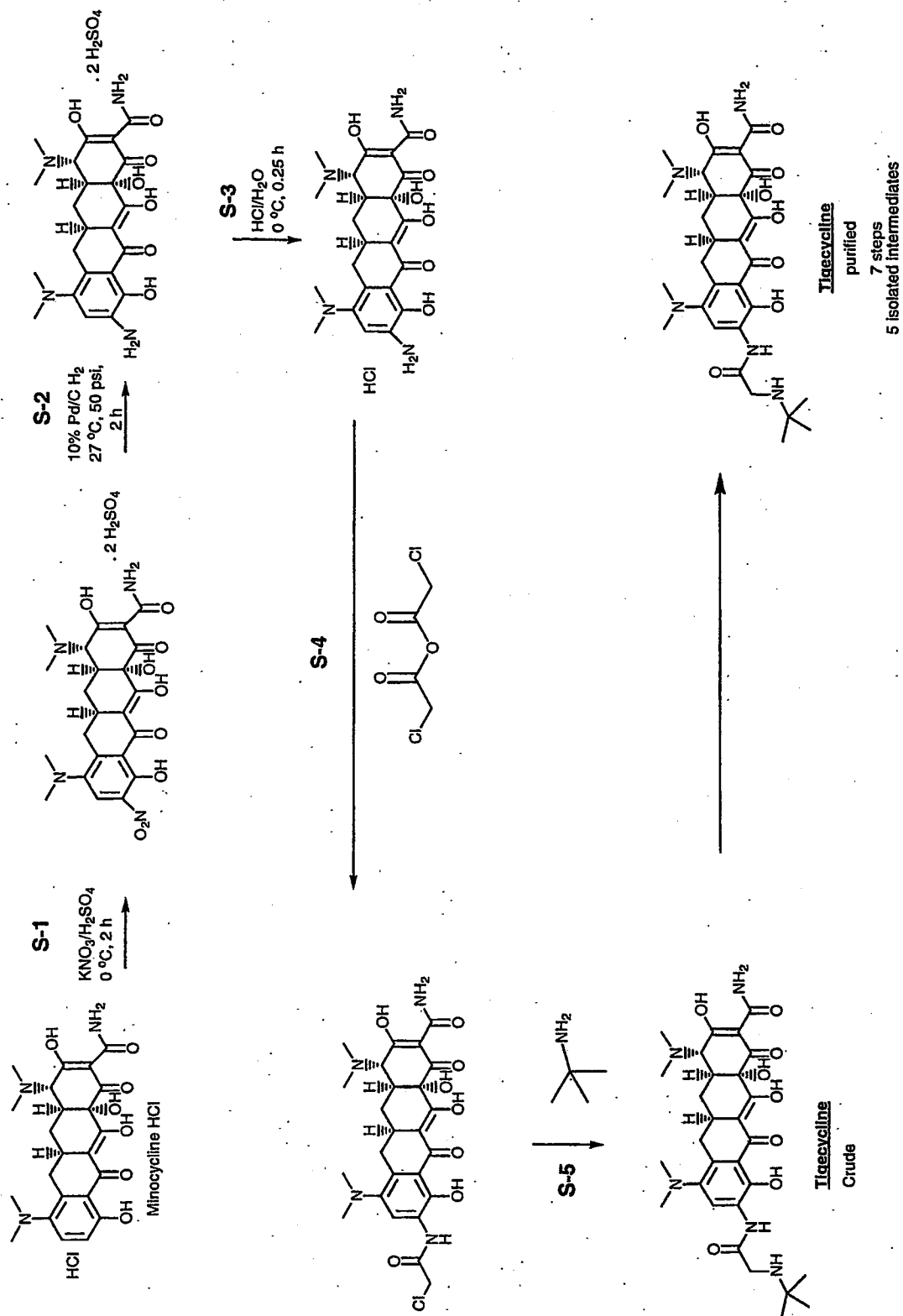


Fig. 1



00124

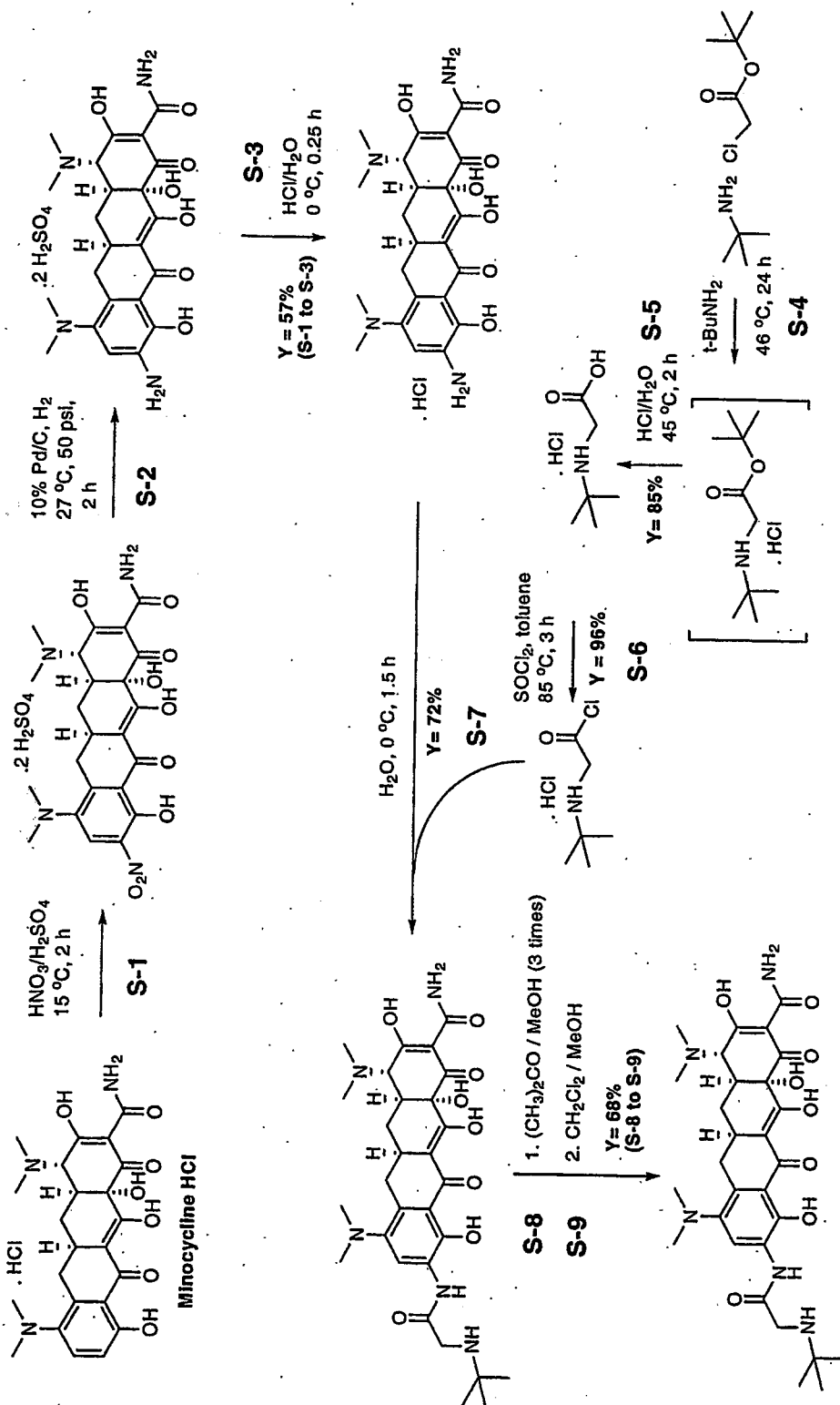
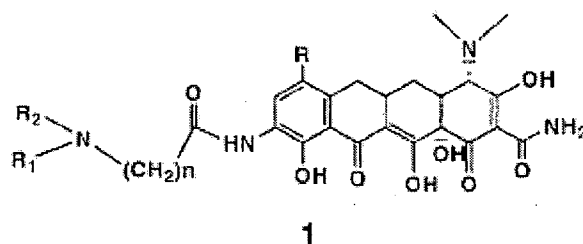


Fig. 3

# TIGECICLINA Y MÉTODOS PARA PREPARAR 9-AMINOMINOCICLINA

Esta solicitud reivindica beneficio de la solicitud provisional U.S. No. 60/685,146 presentada en Mayo 27, 2005, cuyos contenidos se incorporan aquí como referencia.

[001] Se describen aquí métodos para preparar por lo menos un compuesto de fórmula 1.

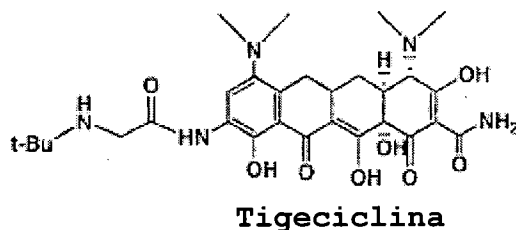


O una sal farmacéuticamente aceptable de esta,

En donde  $R_1$  y  $R_2$  son cada uno independientemente escogidos de hidrógeno, alquilo ( $C_1-C_6$ ) de cadena recta y ramificada, y cicloalquilo, o  $R_1$  y  $R_2$  juntos con N, forman un heterociclo; R es  $-NR_3R_4$ , donde  $R_3$  y  $R_4$  son cada uno independientemente escogidos de hidrógeno y de alquilo ( $C_1-C_4$ ) de cadena recta y ramificada; y n varía de 1-4.

[002] En una modalidad,  $R_1$  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 tigeclina. La tigeclina, (9-(t-butil-glicilamido)-minociclina, TBA-MINO), (4S, 4aS, 5aR, 12aS)-9-[2-(terc-butilamino)acetamido]-4,7-bis(dimetilamino)-1,4,4a,5, 5a, 6, 11, 12a-octahidro-3,10,12,12a-tetrahidroxi-1,11-dioxo-2-maftacenocarboxamida, donde  $R_1$  es hidrógeno,  $R_2$  es t-butilo,  $R_3$  es metilo,  $R_4$  es metilo, y n es 1. La tigeclina es un antibiótico de glicilciclina y un análogo de tetraciclina semi sintético, la

minociclina. La tigeciclina es un derivado de 9-t-butilglicilamido de minociclina, como se muestra en la estructura de adelante:



[003] La tigeciclina se desarrolló en respuesta a la amenaza mundial de la resistencia emergente a los antibióticos. La tigeciclina tiene una actividad antibacterial de amplio espectro tanto in vitro como in vivo. Los antibióticos de glicilciclina, como los antibióticos de la tetraciclina, actúan al inhibir la traducción de proteína en la bacteria.

[004] La tigeciclina es un antibiótico conocido de la familia de la tetraciclina y un análogo químico de minociclina. Se puede utilizar como un tratamiento contra bacterias resistentes a drogas, y se han mostrado que trabajan donde otros antibióticos han fallado por ejemplo, esta es activa contra *Estafilococos áureos*, resistentes a meticiclina, *Streptococos pneumoniae* resistente a penicilina, enterococos resistentes a vancomicina (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); y P.J. Petersen et al., Antimicrob. Agents Chemother. 43:738-744 (1999), y contra organismos que llevan cualquiera de las dos formas mayores de resistencia a la tetraciclina: protección ribosómica y de eflujo (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).

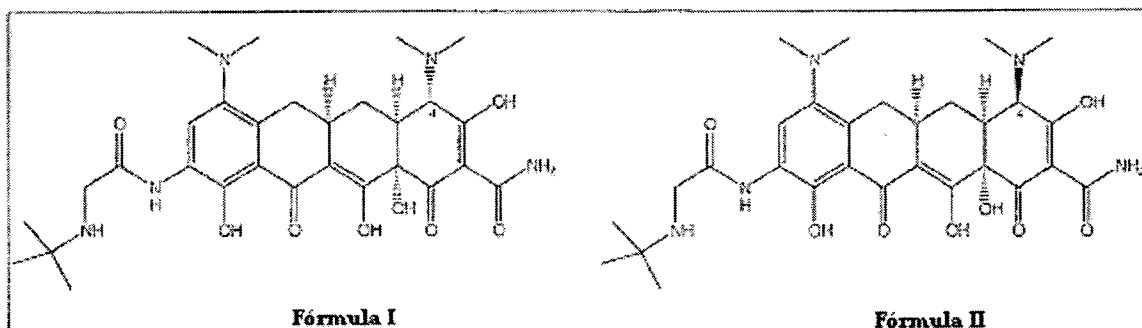
10

[005] La tigeciclina se puede utilizar en el tratamiento de muchas infecciones bacterianas, tales como infecciones intra-abdominales complicadas (cIAI), infecciones de la piel y de la estructura de la piel complicadas (cSSSI), Neumonía Adquirida Comunitaria (CAP), e indicaciones de Neumonía Adquirida en Hospital (HAP), que pueden ser originadas por patógenos gran negativos y gran positivos, anaerobios, y cepas tanto susceptibles a la meticilina como resistentes a la meticilina de Estafilococos áureos (MSSA y MRSA). Adicionalmente, la tigeciclina se puede utilizar para tratar o controlar infecciones bacterianas en animales de sangre caliente causadas por bacterias que tienen los determinantes resistentes al TetM y TetK. También, la tigeciclina se puede utilizar para tratar infecciones de hueso y articulaciones, Neutropenia relacionada con catéter, infección obstétricas y ginecológicas o para tratar otros patógenos resistentes, tales como VRE, ESBL, entéricos, micro-bacterias de rápido crecimiento y similares.

25

[006] La tigeciclina sufre algunas desventajas en que pueden degradarse mediante epimerización. La epimerización es una senda de degradación conocida en las tetraciclinas generalmente, aunque la tasa de degradación puede variar dependiendo de la tetraciclina. Comparativamente, la tasa de epimerización de la tigeciclina puede ser rápida aún por ejemplo, bajo condiciones acidas medias y/o a temperaturas moderadamente elevadas. La literatura de la tetraciclina reporta que varios métodos científicos se han utilizado para ensayar y minimizar la formación de epímero en las tetraciclinas. En algunos métodos, la formación de calcio, magnesio, zinc, o sales de metal de aluminio con las tetraciclinas limita la formación de epímero cuando se hacen a pH básicos en soluciones no acuosas. (Gordon, P.N, Stephens Jr, C.R., Noseworthy, M.M., Teare, F.W., U.K.Patent No. 901.107). En otros métodos, (Tobkes, U.S. Patent No. 4.038.315) la formación del complejo de metal se desarrolla a un pH ácido y una forma sólida estable de la droga es preparada posteriormente.

[007] La tigeciclina difiere estructuralmente de su epímero en un aspecto.



[008] En la tigeciclina, el grupo N-dimetilo en el carbono 4 es cis al hidrógeno adyacente como se muestra anteriormente en la

fórmula **I**, mientras en el epímero (es decir, el epímero C<sub>4</sub>), la fórmula **II**, ellos son trans uno al otro de la manera indicada. Aunque el epímero de tigeciclina se cree que es no toxico bajo ciertas condiciones le puede faltar la eficacia antibacteriana de la tigeciclina y puede, por lo tanto ser un producto de degradación indeseable. Más aún, la cantidad de epimerización se puede magnificar cuando se sintetiza tigeciclina a gran escala.

[009] Otros métodos para reducir la formación de epímero incluyen mantener los pHs mayores de aproximadamente 6.0 durante el procesamiento; evitando el contacto con los conjugados de ácidos débiles tales como formatos, acetato, fosfatos, o boronatos; y evitando el contacto con la humedad incluyendo soluciones basadas en agua. Con relación a la protección de la humedad, Noseworthy y Spiegel (Patente U.S.No 3.026.248) y Nash y Haeger (Patente U.S No 3.219.529) ha propuesto formular análogos de tetraciclina en vehículos no acuosos para mejorar la estabilidad de la droga. Sin embargo, la mayoría de los vehículos incluidos en estas descripciones son más apropiados para uso tópico que parenteral. La epimerización de tetraciclina también es conocida por ser dependiente de la temperatura de tal forma que la producción y almacenamiento de las tetraciclinas a temperaturas bajas también puede reducir la tasa de formación de epímero (Yuen, PH., Sokoloski, T.D., J.Pharm. Sci. 66: 1648-1650, 1977; Pawelczyk, E., Matlak, B, Pol. J. Pharmacol. Pharm. 34:409-421, 1982). Varios de estos métodos se han intentados con la tigeciclina pero aparentemente ninguno ha tenido éxito en reducir tanto la formación de epímero como la degradación oxidativa

aunque no introduciendo degradantes adicionales. La complejación del metal, por ejemplo, se encontró que tenía poco efecto sobre la formación o degradación del epímero generalmente a pH básico.

5        [010] Aunque el uso de amortiguadores de fosfato, acetato, y citrato mejora la estabilidad en estado de solución, ellos parecen acelerar la degradación de la tigeciclina en estado liofilizado. aún sin un amortiguador, sin embargo, la epimerización es el problema más serio con la tigeciclina es que  
10 con otras tetraciclinas tales como la minociclina.

      [011] Además al epímero C<sub>4</sub>, otras impurezas incluyen subproductos de oxidación. Algunos de estos subproductos se obtienen mediante la oxidación del anillo D de la molécula, que  
15 es un amino fenol. Los compuestos de fórmula **3** (ver esquema I adelante) pueden ser fácilmente oxidados en las posiciones C-11 y C-12a. El aislamiento de los compuestos de fórmula **3** mediante precipitación con un no solvente puede tener el problema de que los subproductos de oxidación y las sales de metal co-precipitan  
20 con el producto resultando en muy pocas impurezas. La oxidación y la degradación del núcleo de los compuestos de fórmula **3** puede ser más pronunciada bajo condiciones de reacción básicas y más aún en operaciones a gran escala en razón a que los tiempo de procesamiento son típicamente más largos y los compuestos están  
25 en contacto con la base durante mayor tiempo.

      [012] Más aún, los productos de degradación se pueden obtener durante cada uno de las diferentes etapas sintéticas de

un esquema, y separar el compuesto requerido de estos productos de degradación puede ser tedioso. Por ejemplo, las técnicas de purificación convencional tal como la cromatografía sobre sílice gel o HPLC preparativo puede no ser utilizada para purificar  
5 estos compuestos fácilmente en razón de sus propiedades quelantes. Aunque algunas tetraciclinas han sido purificadas mediante cromatografía de partición utilizando columnas hechas de tierra de diatomáceas impregnadas con fases estacionarias amortiguadas que contienen agentes secuestrantes como el EDTA,  
10 estas técnicas pueden sufrir de muy baja resolución, reproducibilidad y capacidad.

Estas desventajas pueden impedir la síntesis a gran escala. El HPLC también se ha utilizado para purificación, pero la  
15 resolución adecuada de varios componentes sobre las columnas de HPLC requiere la presencia de agentes pareantes de ión en la fase móvil. Separar el producto final de los agentes secuestrantes y pareantes de ión en la fase móvil puede ser difícil.

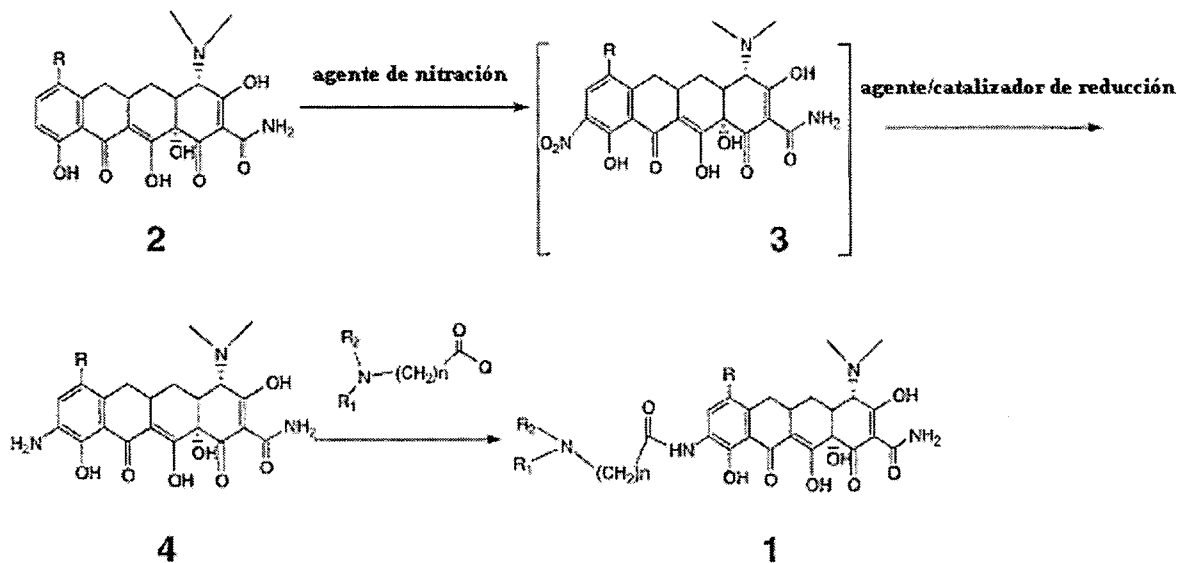
20 [013] Aunque a pequeña escala los compuestos impuros obtenidos mediante precipitación se pueden purificar mediante HPLC preparativo de fase inversa, la purificación mediante cromatografía líquida de fase inversa puede ser ineficiente y costosa cuando trata con cantidades de material en kilogramo.

25

[014] De acuerdo con esto, subsiste la necesidad de obtener por lo menos un compuesto de fórmula **1** en una forma más purificada que las previamente logradas. También subsiste la

necesidad de nuevas síntesis para minimizar el uso de cromatografía para la purificación.

[015] Se describe aquí métodos para producir tetraciclinas, tal como tigeciclina tal como se ilustra de manera general en el **Esquema I** de adelante:



**Esquema I**

[016]  $R_1$  y  $R_2$  son cada uno independientemente escogidos 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; y R es  $-NR_3R_4$  donde  $R_3$  y  $R_4$  son cada uno independientemente escogidos de hidrógeno, y el alquilo ( $C_1$ - $C_4$ ) de cadena recta y ramificada; y n varía de 1-4.

[017] El compuesto de fórmula **2** también es conocido como minociclina o derivado de minociclina. La reacción del compuesto de fórmula **2** con por lo menos un agente nitrante da como resultado un sustituyente que  $-NO_2$  para formar el compuesto de fórmula **3**. El sustituyente  $-NO_2$  en la fórmula **3** puede ser posteriormente reducido a un amino, tal como mediante

hidrogenación, para formar el compuesto de fórmula **4**. Finalmente, la acilación del compuesto de fórmula **4** genera el compuesto de fórmula **1**.

5        [018] Se describen aquí métodos para desarrollar reacciones para producir el compuesto de fórmula **1**, por ejemplo, reacciones de nitración, reducción, y acilación. También se describen métodos para purificar el compuesto de fórmula **1**.

10       [019] Los métodos descritos aquí pueden formar el producto deseado aunque reduciendo la cantidad de por lo menos una impureza presente en el producto final, tal como la formación de epímero, la presencia de reactivos de partida, y los subproductos de oxidación. Tal reacción en las impurezas se puede lograr  
15 durante por lo menos en una etapa de la síntesis, es decir, durante una cualquiera de las reacciones de nitración, reducción, acilación. Los métodos descritos aquí también pueden facilitar la síntesis a gran escala con purezas adecuadas de los productos finales.

20

### **DIBUJOS**

[020] La **figura 1** describe un esquema de ejemplo para preparar tigeciclina.

25

[021] **Figura 2** describe un esquema de ejemplo para preparara tigeciclina.

[022] **Figura 3** describe un esquema de ejemplo para preparar tigerciclina.

### DEFINICIONES

5

[023] Se debe notar que, como se utiliza en esta especificación y en las reivindicaciones anexas las formas singulares "un", "una", y "el" incluyen los referentes plurales a menos que el contexto claramente dicte otra cosa. Así, por ejemplo, la referencia a una composición que contiene "un compuesto" incluye una mezcla de dos o más compuestos. También se debe notar que el término "o" es generalmente empleado en su sentido incluyente "y/o" a menos que el contenido claramente dicte otra cosa.

15

[024] "Tigeciclina" como se utiliza aquí incluye tigeciclina en forma de base libre y en forma de sal, tal como cualquier sal farmacéuticamente aceptable, enantiómeros, y epímeros. La tigeciclina, como se utiliza aquí como se puede formular de acuerdo a métodos conocidos en la técnica.

20

[025] "Compuesto" como se utiliza aquí se refiere a un compuesto neutral (por ejemplo una base libre), y formas de sal de estos (tal como sales farmacéuticamente aceptables). El compuesto puede existir en forma anhidra, o como un hidrato, o como un solvato. El compuesto puede estar presente como esteroisómeros (por ejemplo enantiómeros y diastereómeros), y se puede aislar como enantiómeros, mezclas racémicas,

25

diastereómeros, y mezclas de estas. El compuesto en forma sólida puede existir en varias formas cristalinas y amorfas.

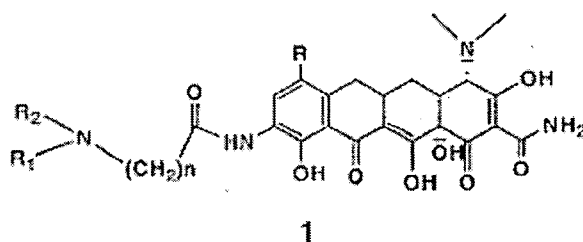
[026] "Farmacéuticamente aceptables" como se utiliza aquí para referirse aquellos compuestos, materiales, composiciones, y/o formas de dosis que están dentro del alcance del juicio medico, adecuadas para uso en contacto con el tejido de los pacientes sin toxicidad, irritación, respuesta alérgica excesiva u otros problemas o complicaciones proporcionales con una proporción riesgo/beneficio razonable.

[027] "Cicloalquilo" como se utiliza aquí se refiere a un sistema de anillo carbocíclico saturado que tiene 3 a 6 miembros de anillos.

[028] "Heterociclo" como se utiliza aquí se refiere a un grupo heterociclo monocíclico que contiene por lo menos un miembro de anillos de nitrógeno en que tiene 3 a 6 miembros de anillo en cada anillo en donde cada anillo se satura y no se sustituye de otra manera.

### NITRACIÓN

[029] Una modalidad describe un método para preparar por lo menos un compuesto de fórmula 1.

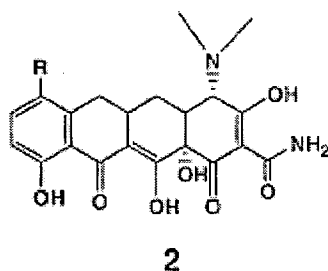


O una sal farmacéuticamente aceptable de este,

En donde  $R_1$  y  $R_2$  son cada uno independientemente escogidos 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  $R_4$  son cada uno independientemente escogidos de hidrógeno y alquilo ( $C_1-C_4$ ) de cadena recta y ramificada; y n varía de 1-4.

[030] Una modalidad describe una reacción de nitración en el producto de nitración no es aislado. De acuerdo con esto, en una modalidad, el método comprende:

(a) hacer reaccionar por lo menos un agente nitrante con por lo menos un compuesto de fórmula **2**,



**2**

O una sal de estos, para producir una mezcla de reacción que comprende un intermedio; y

(b) hacer reaccionar adicionalmente el intermedio para formar por lo menos un compuesto de fórmula **1**.

[031] En una modalidad, el intermedio no es aislado de la mezcla de reacción.

[032] El por lo menos un compuesto de fórmula **2** se puede suministrar como una base libre o como una sal. En una modalidad, el por lo menos un compuesto de fórmula **2** es una sal. "Sales" como se utilizan aquí se pueden preparar in situ o separadamente al hacer reaccionar una base libre con un ácido adecuado. Las sales de ejemplo incluyen pero no están limitadas, a sales de clorhidrato, bromohidrato, yodohidrato, fosfóricas, nítricas, sulfúricas, acéticas, benzoicas, cítricas, cisteína, fumárica, glicólicas, maléicas, succénicas, tartáricas, de sulfato y de clorobenzensulfonato. En otra modalidad, la sal se puede escoger de sales alquilsulfónicas y arilsulfónicas. En una modalidad, el por lo menos un compuesto de fórmula **2** se suministra como una sal de clorhidrato, o como una sal de sulfato.

[033] "Agente Nitrante" como se utiliza aquí se refiere a un reactivo y puede agregar un sustituyente  $\text{-NO}_2$  a un compuesto para o transformar un sustituyente existente a un sustituyente  $\text{-NO}_2$ . Reactivos nitrantes de ejemplo incluyen ácido nítrico y sales de nitrato, tales como sales de metal alcalino, por ejemplo,  $\text{KNO}_3$ . Donde el agente nitrante es un ácido nítrico, el ácido nítrico puede tener una concentración de por lo menos 80%, tal como una concentración de 85%, 88%, 90%, 95%, 99%, o a un 100%.

[034] El agente nitrante puede reaccionar con por lo menos un compuesto de fórmula **2** y cualquier solvente considerado adecuado por un experto en la técnica. En una modalidad, la reacción se desarrolla en la presencia de ácido sulfúrico y/o sales de sulfato. En una modalidad, el ácido sulfúrico utilizado

es ácido sulfúrico concentrado, por ejemplo, a una concentración de por lo menos 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, o por lo menos 95%.

[035] En una modalidad, el por lo menos un agente nitrante se suministra en un exceso molar con relación al por lo menos un compuesto de fórmula **2**. El exceso molar adecuado se puede determinar por un experto en la técnica y puede incluir, pero no está limitado a, valores tales como por lo menos 1.05, por ejemplo, un exceso molar que varía desde 1.05 a 1.75 equivalentes, tal como un exceso molar que varía desde 1.05 a 1.5, o desde 1.05 a 1.25, o desde 1.05 a 1.1 equivalentes. En otra modalidad, el exceso molar es 1.05, 1.1, 1.2, 1.3, o 1.4 equivalentes.

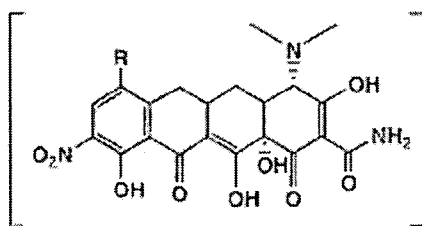
[036] En una modalidad, el por lo menos un agente nitrante reacciona con por lo menos un compuesto de fórmula **2** al agregar el por lo menos un agente nitrante durante un periodo de tiempo. Un experto en la técnica puede determinar el periodo de tiempo durante el cual la cantidad total de agente nitrante se agrega para utilizar las condiciones de reacción. Por ejemplo, la adición del reactivo de nitración se puede monitorear mediante, por ejemplo, HPLC, para controlar la cantidad del por lo menos un agente nitrante utilizado. En una modalidad, la cantidad total de por lo menos un agente nitrante se agrega durante un periodo de tiempo de por lo menos 1h, tal como un periodo de tiempo de por lo menos 2h, por lo menos 3h, por lo menos 5h, por lo menos 10h, por lo menos 24h, o un periodo de tiempo que varía de 1h a una

semana, que varía desde 1h a 48h, que varía de 1h a 24h, o que varía de 1h a 12h.

[037] El por lo menos un agente nitrante se puede agregar  
5 continuamente.

[038] En una modalidad, el agente nitrante puede reaccionar con el por lo menos un compuesto de fórmula **2** a una temperatura que varía desde 0 a 25°C, tal como una temperatura que varía de 5  
10 a 15°C, de 5 a 10°C, o de 10 a 15°C.

[039] Un "intermedio" como se utiliza aquí se refiere a un compuesto que se forma como un producto intermedio entre el material de partida y el producto final. En una modalidad, el  
15 intermedio es un producto de nitración del por lo menos un compuesto de fórmula **2**. Por ejemplo, el intermedio puede ser por lo menos un compuesto de fórmula **3**, o una sal de estos,

**3**

[040] El intermedio puede existir como una base libre o como una sal, tal como cualquiera de las sales descritas aquí. En una  
25 modalidad, el intermedio es una sal de sulfato.

[041] En una modalidad, el intermedio no es aislado de la mezcla de reacción. "Mezcla de reacción" como se utiliza aquí se

refiere a una solución o suspensión que comprende por lo menos un producto de una reacción química entre reactivos; así como también subproductos, por ejemplo, impurezas (que incluyen compuestos con estereoquímicas no deseadas), disolventes y cualquiera reactivos restantes, tales como materiales de partida. En una modalidad, el intermedio es el producto de la nitración y está presente en la mezcla de reacción, que también puede contener reactivos de partida (tal como el agente nitrante y/o por lo menos un compuesto de fórmula **2**), los subproductos (tales como el epímero C<sub>4</sub> de la fórmula **2** o la fórmula **3**). En una modalidad, la mezcla de reacción es una suspensión, donde la suspensión puede ser una composición que comprende por lo menos un sólido y por lo menos un líquido (tal como agua, ácido, o solvente), por ejemplo, una suspensión o una dispersión de sólidos.

[042] En una modalidad, la reacción de nitración produce el intermedio aunque generando una cantidad baja del epímero C<sub>4</sub> correspondiente. Por ejemplo, donde el intermedio es por lo menos un compuesto de fórmula **3**, la nitración da como resultado la formación del epímero C<sub>4</sub> de la fórmula **3** en una cantidad de menos del 10%, determinada mediante cromatografía líquida de alto desempeño (HPLC). En otra modalidad, el epímero C<sub>4</sub> está presente en una cantidad de menos del 5%, menos del 3%, menos del 2%, menos del 1%, o menos del 0.5%.

000141

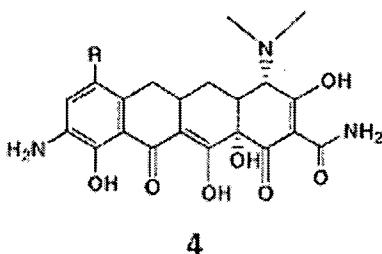
[043] Los parámetros HPLC para cada etapa, es decir, la nitración, reducción, y acilación, se suministran en la sección de ejemplos.

5 [044] En una modalidad, la nitración se desarrolla de tal forma que la cantidad del material de partida, por ejemplo, el por lo menos un compuesto de fórmula **2**, es baja. En una modalidad, el por lo menos un compuesto de fórmula **2** está presente en el producto de nitración en una cantidad de menos del  
10 10%, como se determina mediante HPLC, o menos del 5%, menos del 3%, menos del 2%, menos del 1% o menos del 0.5%.

[045] En una modalidad, la nitración se puede desarrollar a gran escala. En una modalidad, "gran escala" se refiere al uso de  
15 por lo menos un gramo de compuesto de acuerdo a la fórmula **2**, tal como el uso de por lo menos 2 gramos, por lo menos 5 gramos, por lo menos 10 gramos, por lo menos 25 gramos, por lo menos 50 gramos, por lo menos 100 gramos, por lo menos 500 gramos, por lo menos 1 kg, por lo menos 5 kg, por lo menos 10 kg, por lo menos  
20 25 kg, por lo menos 50 kg, o por lo menos 100 kg.

[046] En una modalidad, las formas reductoras por lo menos un compuesto de fórmula **4**.

25

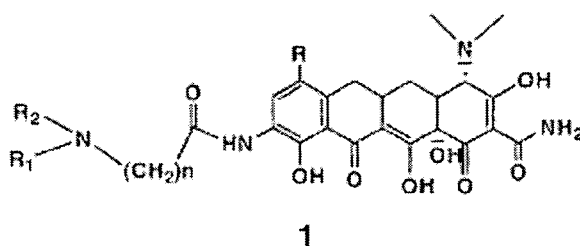


O una sal de este.

[047] En una modalidad, la reacción adicional en (b) comprende reducir el intermedio. En otra modalidad, el método comprende además acilar el intermedio reducido.

5

[048] Otra modalidad descrita aquí, es un método para preparar por lo menos un compuesto de fórmula 1,

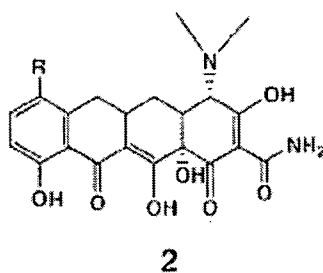


O una sal farmacéuticamente aceptable de este,

En 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 por lo menos un agente nitrante con por lo menos un compuesto de fórmula 2,



O una sal de estos, para producir una mezcla de reacción que comprende un intermedio;

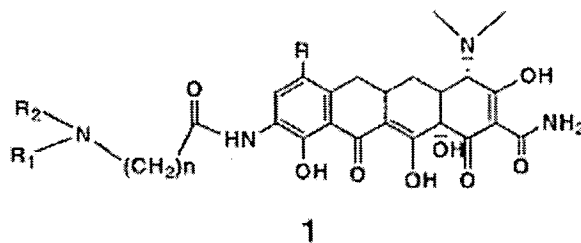
y

(b) hacer reaccionar además el intermedio para formar el por lo menos un compuesto de fórmula 1.

[049] En una modalidad, el intermedio no es aislado de la mezcla de reacción.

[050] En una modalidad, el por lo menos un compuesto de fórmula **1** es tigeciclina.

[051] Otra modalidad descrita aquí es un método para preparar el por lo menos un compuesto de fórmula **1**.

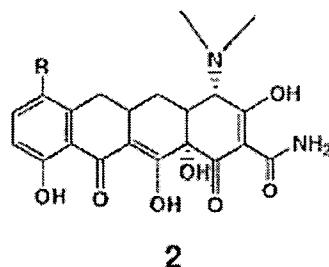


O una sal farmacéuticamente aceptable de estos,

En donde  $R_1$  y  $R_2$  son cada uno independientemente escogidos de hidrógeno, alquilo ( $C_1$ - $C_6$ ) de cadena recta y ramificada, y cicloalquilo, y o  $R_1$  y  $R_2$  junto con N, forman un heterociclo; R es  $-NR_3R_4$ , donde  $R_3$  y  $R_4$  son cada uno independientemente escogidos de hidrógeno y alquilo ( $C_1$ - $C_4$ ) de cadena recta y ramificada; y n varía de 1-4.

Que comprende:

(a) hacer reaccionar por lo menos un agente nitrante con por lo menos incompuesto de fórmula **2**,



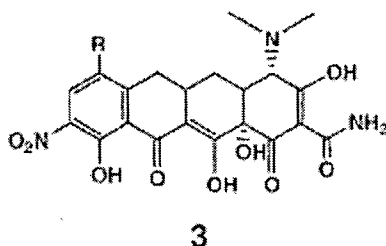
00124

O una sal de estos, para producir una suspensión; y

(b) hacer reaccionar adicionalmente la suspensión para formar por lo menos un compuesto de fórmula **1**.

5 [052] En una modalidad,  $R_1$  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 modalidad, el por lo menos un compuesto de fórmula **1** es tigeciclina.

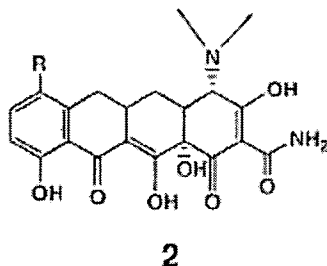
10 [053] Otra modalidad descrita aquí es un método para preparar por lo menos un compuesto de fórmula **3** o una sal de estos,



15 En donde R es  $-NR_3R_4$  donde  $R_3$  y  $R_4$  son cada uno independientemente escogidos de hidrógeno, y alquilo ( $C_1-C_4$ ) de cadena recta y ramificada,

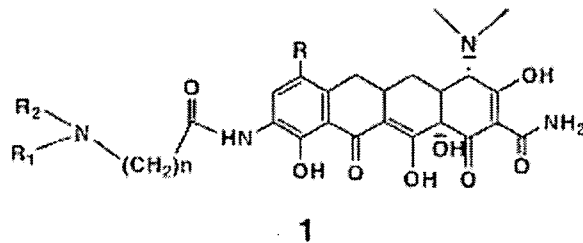
Que comprende:

Hacer reaccionar por lo menos un agente nitrante con por lo menos un compuesto de fórmula **2** o una sal de estos,



En donde la reacción es desarrollada a una temperatura que varía de 5 a 15°C.

[054] Otra modalidad descrita aquí es un método para preparar por lo menos un compuesto de fórmula 1.

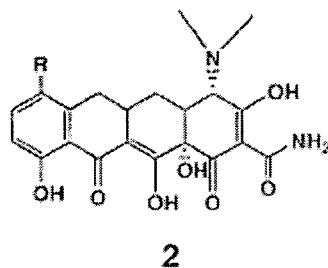


O una sal farmacéuticamente aceptable de estos,

En donde  $R_1$  y  $R_2$  son cada uno independientemente escogidos 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  $R_4$  son cada uno independientemente escogidos de hidrógeno y alquilo ( $C_1$ - $C_4$ ) de cadena recta y ramificada; y n varía de 1-4,

Que comprende:

(a) hacer reaccionar por lo menos un agente nitrante con por lo menos un compuesto de fórmula 2 o una sal de estos para producir una mezcla de reacción que comprende un intermedio; y



(b) hacer reaccionar además el intermedio para formar el por lo menos un compuesto de fórmula 1.

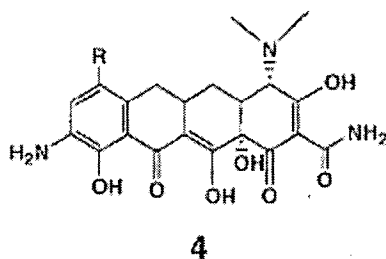
En donde la reacción (a) se desarrolla a una temperatura que  
5 varía de 5 a 15°C.

[055] En una modalidad  $R_1$  es hidrógeno,  $R_2$  es t-butilo,  $R_3$  es metilo y  $R_4$  es metilo, y n es 1.

## 10 REDUCCIÓN

[056] Una modalidad describe un método para preparar por lo menos un compuesto de fórmula 4.

15

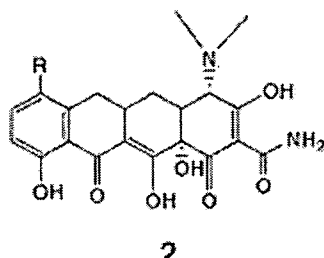


O una sal de estos,

En donde  $R = -NR_3R_4$ , donde  $R_3$  y  $R_4$  son cada uno  
20 independientemente escogidos de hidrógeno y alquilo ( $C_1-C_4$ ) de cadena recta y ramificada,

Que comprende:

Combinar por lo menos un agente reductor con una mezcla de  
25 reacción, tal como una suspensión de mezcla de reacción, que comprende un intermedio preparado de una reacción entre por lo menos un agente nitrante y por lo menos un compuesto de fórmula 2,



5           O una sal de estos.

[057] En una modalidad, el método describe un proceso de "un  
recipiente", donde las etapas de nitración y reducción se  
desarrollan sin aislar los productos de la nitración provenientes  
10 de la mezcla de reacción de nitración.

[058] En una modalidad  $R_1$  es hidrógeno,  $R_2$  es t-butilo,  $R_3$  es  
metilo y  $R_4$  es metilo, y  $n$  es 1.

15           [059] "Agente reductor" como se utiliza aquí se refiere a un  
agente químico que agrega hidrógeno a un compuesto. En una  
modalidad, el agente reductor es hidrógeno. La reducción se puede  
desarrollar bajo una atmósfera de hidrógeno a una presión  
adecuada como se determina por un experto en la técnica. En una  
20 modalidad, el hidrógeno se suministra a una presión que varía de  
1 a 75 psi, tal como una presión que varía de 1 a 50 psi, o una  
presión que varía de 1 a 40 psi.

[060] En otra modalidad, el agente reductor se suministra en  
25 la presencia de por, lo menos un catalizador. Catalizadores de  
ejemplo incluyen, pero no están limitados a, óxidos de metal de  
tierras raras, catalizadores que contienen metales del Grupo  
VIII, y sales de catalizadores que contienen metales del Grupo

VIII. Un ejemplo de un catalizador que contiene metales del Grupo VIII es paladio, tal como paladios o de carbono.

[061] Donde el catalizador es paladio sobre carbono, en una 5 modalidad, el catalizador se presenta en una cantidad que varía de 0.1 partes a 1 partes, con relación a la cantidad de por lo menos un compuesto de fórmula **2** presente antes de la reacción con por lo menos un agente nitrante.

10 [062] En una modalidad, el intermedio es un compuesto de fórmula **3**. En una modalidad, el compuesto de fórmula **3**,  $R_1$  es hidrógeno,  $R_2$  es t-butilo,  $R_3$  es metilo y  $R_4$  es metilo, y  $n$  es 1.

[063] Un experto en la técnica puede determinar un solvente 15 adecuado para la reacción de reducción. En una modalidad, antes de combinar, por ejemplo, antes de la reducción la mezcla de reacción se combina con un disolvente que comprende por lo menos un alcohol ( $C_1-C_8$ ). El por lo menos un alcohol ( $C_1-C_8$ ) se puede escoger, por ejemplo, de metanol y etanol.

20 [064] Un experto en la técnica puede determinar una temperatura adecuada para la reacción de reducción. En una modalidad, el combinar, por ejemplo, la reducción, se desarrolla a una temperatura que varía de  $0^{\circ}\text{C}$  a  $50^{\circ}\text{C}$ , tal como una 25 temperatura que varía de  $20^{\circ}\text{C}$  a  $40^{\circ}\text{C}$ , o una temperatura que varía de  $26^{\circ}\text{C}$  a  $28^{\circ}\text{C}$ .

[065] En una modalidad, después de la combinación, por ejemplo, después de la reducción, la mezcla de reacción resultante se agrega a o se combina con el sistema disolvente que comprende un alcohol de cadena ramificada ( $C_1-C_8$ ) y un  
5 hidrocarburo ( $C_1-C_8$ ). En una modalidad, el alcohol de cadena ramificada ( $C_1-C_8$ ) es isopropanol. En una modalidad, el hidrocarburo ( $C_1-C_8$ ) se escoge de hexano, heptano, octano.

[066] En una modalidad, después de combinación, por ejemplo,  
10 después de reducción, la mezcla de reacción resultante se agrega al sistema disolvente a una temperatura que varía de  $0^{\circ}\text{C}$  a  $50^{\circ}\text{C}$ , tal como una temperatura que varía de  $0^{\circ}\text{C}$  a  $10^{\circ}\text{C}$ .

[067] En una modalidad, el método comprende además aislar el  
15 por lo menos un compuesto de fórmula **4** como un sólido o como una composición sólida. En una modalidad, el por lo menos un compuesto de fórmula **4** se precipita o se aísla como a una sal, tal como cualquiera de las sales descritas aquí.

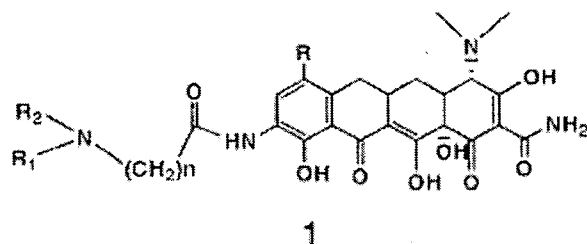
20 [068] En una modalidad, la composición sólida comprende un epímero  $C_4$  de fórmula **4** en una cantidad de menos del 10% determinada mediante cromatografía líquida de alto desempeño. En otra modalidad, el epímero  $C_4$  está presente en una cantidad del menos del 5%, menos del 3%, menos del 2%, menos del 1%, o menos  
25 de 0.5%.

[069] En una modalidad, la composición sólida comprende el por lo menos un compuesto de fórmula **2** en una cantidad de menos

del 2%, tal como una cantidad de menos del 1% o menos del 0.5%, determinada mediante cromatografía líquida de alto desempeño.

[070] En una modalidad, la reducción se puede desarrollar a gran escala. En una modalidad, "gran escala" se refiere al uso de por lo menos 1 gramo del compuesto de acuerdo a la fórmula **2**, tal como el uso de por lo menos 2 gramos, por lo menos 5 gramos, por lo menos 10 gramos, por lo menos 25 gramos, por lo menos 50 gramos, por lo menos 100 gramos, por lo menos 500 gramos, por lo menos 1 kg, por lo menos 5 kg, por lo menos 10 kg, por lo menos 25 kg, por lo menos 50 kg, o por lo menos 100 kg.

[071] Otra modalidad descrita aquí es un método para preparar por lo menos un compuesto de fórmula **1**.

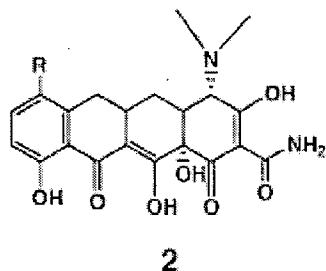


O una sal farmacéuticamente aceptable de este,

20 En donde  $R_1$  y  $R_2$  son cada uno independientemente escogidos 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  $R_4$  son cada uno independientemente escogidos de hidrógeno y alquilo ( $C_1-C_4$ ) de cadena recta y ramificada; y n  
25 varía de 1-4.

Que comprende:

(a) combinar por lo menos un agente reductor con una mezcla de reacción, tal como una suspensión de la mezcla de reacción, que comprende un intermedio preparado de una reacción entre por lo menos un agente nitrante y por lo menos un compuesto de fórmula 2.

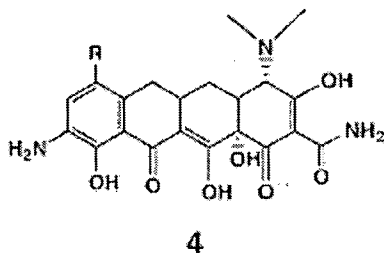


O una sal de estos, para formar un segundo intermedio; y

(b) además hacer reaccionar el segundo intermedio en la mezcla de reacción para preparar el por lo menos un compuesto de fórmula 1.

[072] En una modalidad,  $R_1$  es hidrógeno,  $R_2$  es t-butilo,  $R_3$  es metilo y  $R_4$  es metilo, y  $n$  es 1.

[073] En una modalidad, el intermedio es por lo menos un compuesto de fórmula 3 o una sal de estos, y el segundo intermedio es por lo menos un compuesto de fórmula 4.

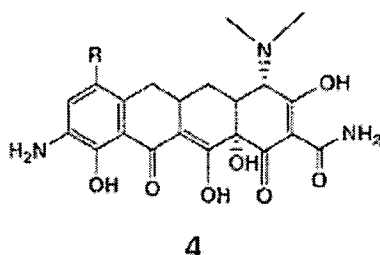


O una sal de estos.

[074] En una modalidad, la reacción adicional en (b) comprende acilar el segundo intermedio. En una modalidad antes de la acilación, el segundo intermedio se puede precipitar o aislar como una sola parte.

5

[075] Otra modalidad descrita aquí es un método para preparar por lo menos un compuesto de fórmula **4** o una sal de estos.



10

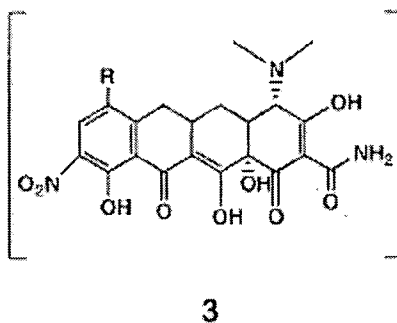
;

Donde  $R = -NR_3R_4$ , donde  $R_3$  y  $R_4$  son cada uno independientemente escogidos de hidrógeno y alquilo ( $C_1-C_4$ ) de cadena recta y

15 ramificada,

Que comprende:

Reducir un intermedio de fórmula **3** o una sal de estos,



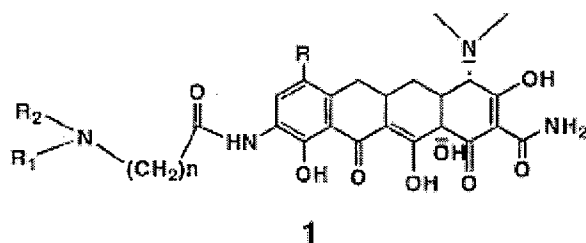
20

[076] En una modalidad, el intermedio de fórmula **3** puede estar presente en una suspensión de mezcla de reacción.

25

[077] En una modalidad, la reducción comprende combinar por lo menos un agente reductor con la mezcla de reacción.

[078] Otra modalidad descrita aquí es un método para preparar por lo menos un compuesto de fórmula 1.

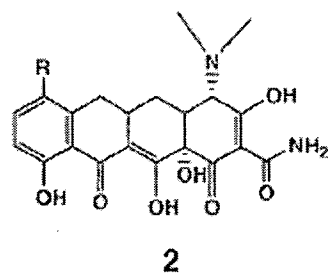


O una sal farmacéuticamente aceptable de estos,

En donde  $R_1$  y  $R_2$  son cada uno independientemente escogidos de  
 10 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  $R_4$  son cada uno independientemente escogidos de  
 hidrógeno y alquilo ( $C_1-C_4$ ) de cadena recta y ramificada; y n  
 varía de 1-4.

15 Que comprende:

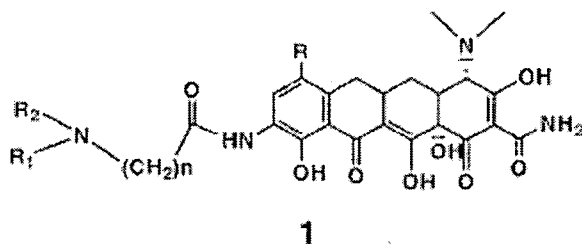
(a) hacer reaccionar por lo menos un agente nitrante con por  
 lo menos un compuesto de fórmula 2 o una sal de estos para  
 preparar una mezcla de reacción.



25 (b) sin aislar o precipitar cualquiera de los sólidos de la  
 mezcla de reacción, combinar por lo menos un agente reductor con  
 la mezcla de reacción para preparar un intermedio; y

(c) preparar el por lo menos un compuesto de fórmula **1** del intermedio.

[079] Otra modalidad descrita aquí es un método para  
5 preparar por lo menos un compuesto de fórmula **1**,

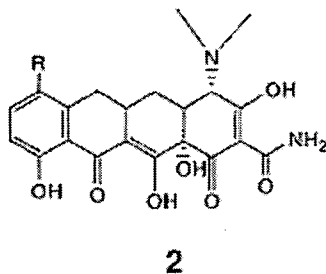


10 O una sal farmacéuticamente aceptable de estos,

En donde  $R_1$  y  $R_2$  son cada uno independientemente escogidos 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  $R_4$  son cada uno independientemente escogidos de  
15 hidrógeno y alquilo ( $C_1$ - $C_4$ ) de cadena recta y ramificada; y n varía de 1-4,

Que comprende:

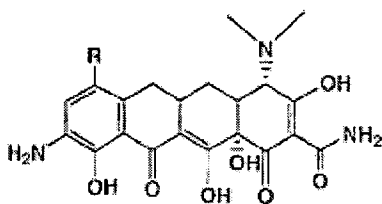
(a) combinar por lo menos un catalizador que contiene metal  
20 del Grupo VIII en la presencia de hidrógeno con una mezcla de reacción, tal como una suspensión de mezcla de reacción preparada de una reacción entre por lo menos un agente nitrante y por lo menos un compuesto de fórmula **2** o una sal de estos,



[080] En una modalidad, el por lo menos un catalizador que contiene un metal del Grupo VIII está presente en una cantidad que varía de 0.1 partes a 1 parte con relación a la cantidad de por lo menos un compuesto de fórmula **2** presentes antes de la  
5 reacción de por lo menos un agente nitrante.

[081] Otra modalidad descrita aquí es una composición que comprende:

10 por lo menos un compuesto de fórmula **4**.



**4**

15

O una sal de este,

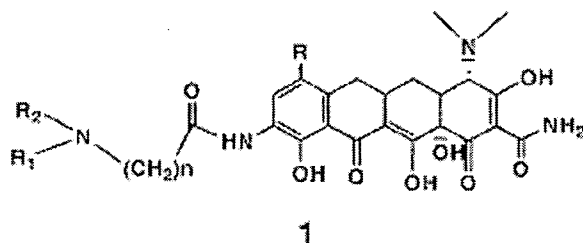
En donde  $R = -NR_3R_4$ , donde  $R_3$  y  $R_4$  son cada uno independientemente escogidos de hidrógeno y alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>) de cadena recta y ramificada,

20 En donde un epímero C<sub>4</sub> de fórmula **4** está presente en una cantidad de menos del 10%, como se determino mediante cromatografía líquida de alto desempeño.

[082] En una modalidad,  $R_1$  es hidrógeno,  $R_2$  es t-butilo,  $R_3$   
25 es metilo y  $R_4$  es metilo, y n es 1.

### ACILACIÓN

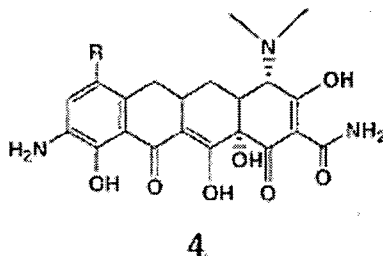
[083] Una modalidad de la presente descripción suministra un método para preparar por lo menos un compuesto de fórmula **1**:



O una sal farmacéuticamente aceptable de estos,

En donde  $R_1$  y  $R_2$  son cada uno independientemente escogidos de hidrógeno, alquilo ( $C_1-C_6$ ) de cadena recta y ramificada, y cicloalquilo, 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 -  
 10  $NR_3R_4$ , donde  $R_3$  y  $R_4$  son cada uno independientemente escogidos de hidrógeno y de alquilo ( $C_1-C_4$ ) recto y ramificado; y n varía de 1-4,

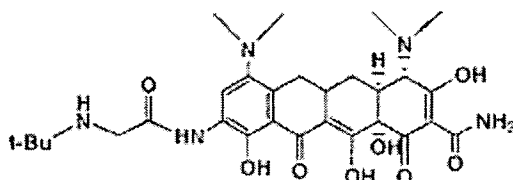
15 Que comprende hacer reaccionar por lo menos un compuesto de fórmula **4**:



O una sal de estos,

Con por lo menos un compuesto de amino acilo en un medio de reacción. En una modalidad, el medio de reacción se puede escoger de un medio acuoso, y por lo menos un disolvente básico en  
 25 ausencia de un reactivo base.

[084] En una modalidad, el método para preparar un compuesto de fórmula I es un método para preparar tigecilina:

**Tigeciclina**

O una sal farmacéuticamente aceptables de estos.

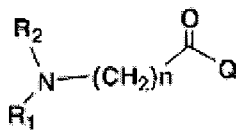
[085] En una modalidad, la variable n es 1, R<sub>1</sub> es hidrógeno, R<sub>2</sub> es t-butilo, R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> son cada uno metilo. En otra modalidad, la variable n es 1 y R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub>, junto con N forman un grupo pirrolidinilo, y R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> son cada uno metilo. La sal de por lo menos un compuesto de Fórmula 4 puede ser una sal halogenada, tal como una sal de clorhidrato.

[086] El medio de reacción puede ser un solvente escogido de un solvente aprótico polar o una mezcla de solventes de estos. En una modalidad, el solvente aprótico polar se escoge de acetonitrilo, 1,2 dimetoxietano, dimetilacetamida, dimetilformamida, hexametilfosforamida, N,N'-dimetiletilenourea, N,N'-dimetilpropilenourea, cloruro de metileno, N-metilpirrolidinona, tetrahidrofurano, y mezclas de estos. En otra modalidad, el solvente aprótico polar se escoge de acetonitrilo, dimetilformamida, N,N'-dimertilpropilenourea, N-metilpirrolidinona, tetrahidrofurano, y mezclas de estos. En por lo menos un disolvente básico puede ser una mezcla de acetonitrilo y N,N'-dimetilpropilenourea. En otra modalidad, en por lo menos un disolvente básico puede ser una mezcla de agua y

N,N'-dimetilpropilenourea. En una modalidad adicional, el por lo menos un disolvente básico es N,N'-dimetilpropilenourea.

[087] El medio de reacción puede ser un medio acuoso. En una  
 5 modalidad adicional, el por lo menos un disolvente básico en la  
 ausencia de una base es agua en la ausencia de una base. En otra  
 modalidad, el medio de reacción puede ser por lo menos un  
 disolvente básico en la ausencia de un reactivo base. El  
 disolvente básico es un disolvente capaz de aceptar, parcial o  
 10 completamente, un protón. Un reactivo base se refiere a una base  
 que se agrega al inicio de la reacción, sea concurrente o  
 secuencialmente con por lo menos un compuesto de la Fórmula 4 y  
 por lo menos un compuesto de aminoacilo y es capaz de aceptar,  
 parcial o completamente, un protón. Un reactivo base también se  
 15 refiere a una base que se agrega durante la reacción.

[088] El por lo menos un compuesto de aminoacilo puede ser  
 escogido de aminoacil haluros, aminoacil anhídridos, y aminoacil  
 anhídridos mezclados. En una modalidad, el compuesto de  
 20 aminoacilo es por lo menos un aminoacil haluro de Fórmula 6:



6

O una sal de estos,

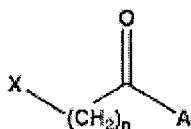
25 En donde R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> son cada uno independientemente escogidos de  
 hidrógeno, alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) de cadena recta y ramificada, y  
 cicloalquilo, o R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub>, junto con N, forman un heterociclo; n

varía de 1-4; y en donde Q es un halógeno escogido de fluor, bromo, cloro, y yodo.

[089] En una modalidad adicional, Q es cloro. La sal de compuesto de Fórmula 6 se puede escoger de una sal halogenada. La sal halogenada se refiere a cualquier sal formada de la interacción con un anión halógeno, tal como una sal de clorhidrato, o una sal de bromohidrato, o una sal yodihídrica. En una modalidad, la sal hidrogenada es una sal de clorhidrato.

[090] El por lo menos un haluro de aminoacilo de Fórmula 6 se puede obtener mediante el método que comprende:

A) hacer reaccionar por lo menos un ester de Fórmula 7:



7

O una sal de estos,

Con por lo menos una amina,  $R_1R_2NH$ , para preparar por lo menos un ácido carboxílico,

En donde  $R_1$  y  $R_2$  son cada uno independientemente escogidos 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; X es un halógeno escogido de bromo, cloro, fluor y yodo; A es  $-OR_6$  donde  $R_6$  se escoge de alquilo ( $C_1-C_6$ ) recto o ramificado y arilalquilo, tal como aril-alquil ( $C_1-C_6$ ), por ejemplo, donde arilo es fenilo; n varía de 1-4; y

(B) hacer reaccionar el por lo menos un ácido carboxílico con por lo menos un agente clorinante para dar por lo menos un compuesto aminoacilo de Fórmula 6 o una sal de estos.

5

[091] En una modalidad,  $R_1$  y  $R_2$  pueden cada uno ser t-butilo. En otra modalidad,  $R_1$  y  $R_2$  junto con N, pueden formar un heterociclo, tal como pirrolidina, y  $R_6$  puede ser arilalquilo-, tal como benzilo. En otra modalidad n es 1. En una modalidad  
10 adicional, X es bromo.

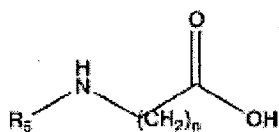
[092] En otra modalidad, el por lo menos un ester de Fórmula 7 es una sal de clorhidrato. Un exceso de amina  $R_1R_2NH$  comparado con el ester de Fórmula 7 puede estar presente en la reacción  
15 para preparar por lo menos un ácido carboxílico. En una modalidad, el por lo menos un agente clorinante puede ser cloruro de tionilo. En otra modalidad, la reacción del por lo menos un ácido carboxílico con por lo menos un agente clorinante incluye la adición de una cantidad catalítica de dimetilformamida. Un  
20 exceso de agente clorinante con relación al por lo menos un ácido carboxílico puede estar presente en la reacción para dar por lo menos un compuesto de aminoacilo de Fórmula 6. Cuando  $R_6$  es arilalquilo, el arilalquilo de por lo menos un compuesto de Fórmula 7 se puede dividir mediante hidrogenación después de  
25 reacción con la por lo menos una amina para dar el por lo menos un ácido carboxílico.

[093] La reacción del por lo menos un ácido carboxílico con un agente clorinante se puede desarrollar a una temperatura que varía de 55°C a 85°C, tal como de 80°C a 85°C, y además tal como 55°C. En una modalidad, una cantidad adicional de agente  
 5 clorinante se puede agregar a la reacción para efectuar la terminación, tal como lograr un nivel de menos del 4% de ácido carboxílico. Luego de hacer reaccionar el por lo menos un ácido carboxílico con por lo menos un agente clorinante, la suspensión resultante se puede filtrar para remover las sales, tal como  
 10 sales de clorhidrato 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.

15 [094] En otra modalidad, el por lo menos un haluro de aminoacilo de la Fórmula 6 se obtiene mediante un método que comprende:

hacer reaccionar por lo menos un ácido carboxílico en Fórmula

8:



8

O una sal de estos,

En donde R<sub>5</sub> se escoge de alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) recto o ramificado, y

25 n varía de 1 a 4, y

Con por lo menos un agente clorinante para dar por lo menos un haluro de aminoacilo de Fórmula 6 o una sal de estos.

[095] En otra modalidad, el por lo menos un ácido carboxílico de Fórmula 8 es una sal halogenada, tal como una sal de clorhidrato. El periodo de tiempo para hacer reaccionar el por lo menos un compuesto de Fórmula 8 con por lo menos un agente  
5 clorinante puede variar de 1 a 50 horas, tal como de 2 a 45 horas, y además tal como 1 a 3 horas. El por lo menos un ácido carboxílico de Fórmula 8 puede tener un tamaño de partícula de menos de 150 micrómetro, tal como menos de 110 micrómetros, y además tal como varias de 50 a 100 micrómetros. Un compuesto de  
10 Fórmula 8 que tiene un tamaño de partícula dado puede ser logrado al moler el compuesto.

[096] Hacer reaccionar por lo menos un compuesto de Fórmula 4 con por lo menos un compuesto de aminoacilo puede ser conducido a  
15 una temperatura que varía de 0°C a 30°C, tal como desde 20°C a 25°C, tal como desde 10°C a 17°C, tal como desde 0°C a 6°C, y además tal como desde 2°C a 8°C. El periodo de tiempo para la reacción puede variar de 1 a 24 horas, tal como de 0.5 horas a 4 horas y además tal como de 2 horas a 8 horas. Un exceso de  
20 compuesto aminoacilo con relación a la cantidad del compuesto de Fórmula 4 se puede utilizar en la reacción. En una modalidad, el exceso puede ser 3 equivalentes del compuesto de aminoacilo a un equivalente de por lo menos un compuesto de Fórmula 4. En otra modalidad, la proporción del medio acuoso al por lo menos un  
25 compuesto de Fórmula 4 puede ser 6:1 p/p o 5:1 en volumen. En una modalidad, el compuesto de aminoacilo se agrega a o se combina con una solución de por lo menos un compuesto de Fórmula 4 en un medio acuoso.

[097] En una modalidad, donde el medio de reacción es un medio acuoso, el pH del medio acuoso se puede ajustar a un pH que varía de 4 a 9, tal como de 5 a 7.5, tal como de 6.3 a 6.7, tal como el 5 7.0 a 7.5, además tal como 6.5 y aún además tal como 7.2. Se puede agregar agua antes de ajustar el pH. Ajusta el pH puede involucrar la adición de una base, incluyen pero no estando limitado a hidróxido de amonio. La concentración del hidróxido de amonio puede variar de 25% al 30%. En otra modalidad, un ácido, 10 tal como ácido clorhídrico, se puede utilizar para ajustar el pH. El medio de reacción durante el ajuste del pH puede ser a una temperatura que varía de -5°C a 25°C, tal como desde 5°C a 8°C, y además tal como de 0°C a 5°C.

15 [098] Luego del ajuste del pH por lo menos un disolvente orgánico o una mezcla de disolventes se pueden agregar al medio acuoso. En una modalidad, el por lo menos una mezcla orgánica de disolventes puede comprender metanol y cloruro de metileno. La concertación del metanol puede variar desde 5% a 30% incluyendo 20 pero no estando limitado a 20% y 30%. En otra modalidad, el por lo menos un disolvente orgánico o una mezcla de disolventes comprenden tetrahidrofurano. La temperatura de la mezcla puede variar de 15°C a 25°C.

25 [099] En una modalidad, el medio acuoso puede ser extraído con una mezcla de por lo menos un disolvente prótico polar y por lo menos un disolvente aprótico polar. En una modalidad, el por lo menos un disolvente aprótico polar comprende cloruro de metileno

y por lo menos un disolvente prótico polar comprende metanol. En otra modalidad, el medio acuoso es extraído con por lo menos un disolvente aprótico polar, tal como cloruro de metileno. La extracción se puede conducir a una temperatura que varía de -5°C a 25°C, además tal como desde 0°C a 5°C. En una modalidad adicional, el pH del medio acuoso se ajusta a un rango de 7.0 a 7.5, tal como 7.2 después de cada extracción. El proceso de extracción se puede repetir, por ejemplo, hasta 10 veces.

10 [0100] En una modalidad, los extractos orgánicos combinados se pueden tratar con un agente de secado, tal como sulfato de sodio. Los extractos orgánicos también se pueden tratar con carbón vegetal, tal como Norit CA-1. Los sólidos se remueven mediante filtración para dar una solución. En una modalidad, la solución  
15 se puede concentrar para lograr el compuesto de Fórmula 1.

[0101] El compuesto de Fórmula 1 obtenido de la reacción se puede cristalizar en por lo menos un disolvente orgánico o una mezcla de disolventes. En una modalidad, la mezcla orgánica de  
20 disolventes comprende metanol y cloruro de metileno. La cristalización puede, por ejemplo, ocurrir a una temperatura que varía de -15°C a 155°C, tal como desde 0°C a 15°C y además tal como de 2°C a 5°C.

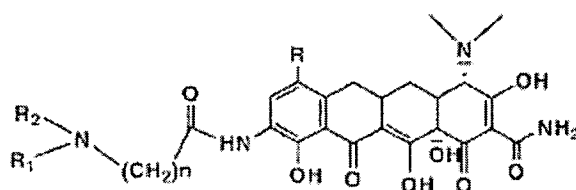
25 [0102] En otra modalidad, luego de la extracción, la mezcla orgánica resultante de por lo menos un disolvente aprótico polar y por lo menos un disolvente aprótico polar se puede concentrar para dar una suspensión y filtrar para dar el por lo menos un

compuesto de Fórmula 1. La concentración y la filtración pueden, por ejemplo, ocurrir a 0°C a 5°C.

[0103] Un método para preparar un compuesto de Fórmula 1 se puede desarrollar utilizando más de 5 gramos de la amina de Fórmula 4, tal como más de 10 gramos, tal como más de 50 gramos, tal como más de 100 gramos, tal como más de 500 gramos, tal como más de 1 kilogramo, y además tal como más de 10 kilogramos.

[0104] Una modalidad describe un compuesto preparado mediante cualquiera de los métodos descritos aquí, que incluyen pero no están limitado a 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 sales de estos. Otra modalidad incluye una composición que comprende un compuesto preparado mediante cualquiera de los métodos descritos aquí. La composición puede además comprender un portador farmacéuticamente aceptable.

[0105] En una modalidad, la composición puede comprender por lo menos un compuesto de Fórmula 1:

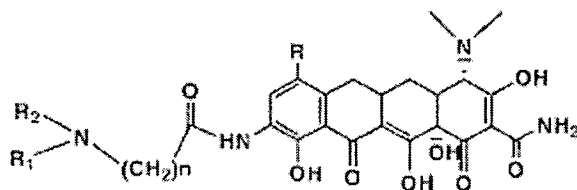


**Fórmula I**

O una sal farmacéuticamente aceptable de estos,

En donde n es 1 R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub>, junto con N, forman un grupo t-butilo, y R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> son cada uno metilo. En otra modalidad, la

composición puede comprender por lo menos un compuesto de fórmula 1:



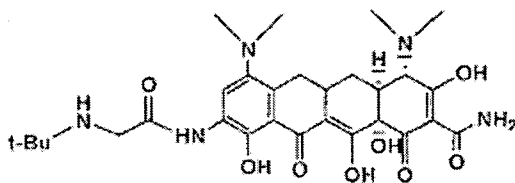
**Fórmula I**

O una sal farmacéuticamente aceptable de estos,

En donde  $R_1$  y  $R_2$  son cada uno independientemente escogidos 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  $R_4$  son cada uno independientemente escogidos de hidrógeno y alquilo ( $C_1$ - $C_4$ ) recto y ramificado; y n varía de 1-4, y

Menos de 0.5% del epímero C-4 de por lo menos un compuesto de fórmula 1 o una sal farmacéuticamente aceptable de este.

[0106] En una modalidad adicional, la composición puede comprender Tigeciclina:



**Tigeciclina**

O una sal farmacéuticamente aceptable de esta, y

Menos de 0.5% del epímero C-4 de Tigeciclina o una sal farmacéuticamente aceptable de esta.

5

para preparar por lo menos un compuesto de Fórmula 1:



### Fórmula I

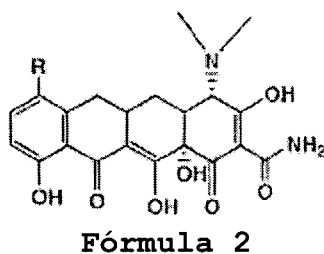
O una sal farmacéuticamente aceptable de este,

25

$-NR_3R_4$ , donde  $R_3$  y  $R_4$  son cada uno independientemente escogidos de hidrógeno y alquilo ( $C_1-C_4$ ) recto y ramificado; y  $n$  varía de 1-4,

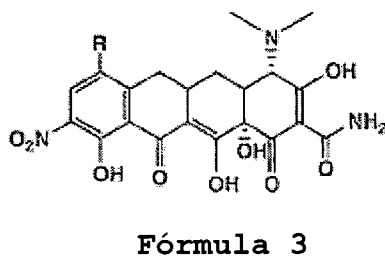
Que comprende:

A) hacer reaccionar por lo menos un agente nitrante con por lo menos un compuesto de Fórmula 2:



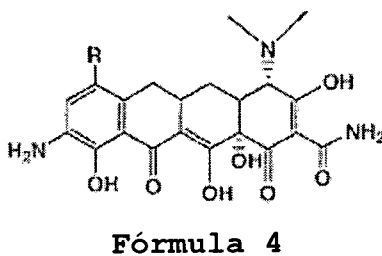
O una sal de estos,

Para preparar una suspensión de mezcla de reacción que comprende por lo menos un compuesto de Fórmula 3:



O una sal de estos,

B) combinar por lo menos un agente reductor con una suspensión de mezcla de reacción para preparar por lo menos un compuesto de Fórmula 4.

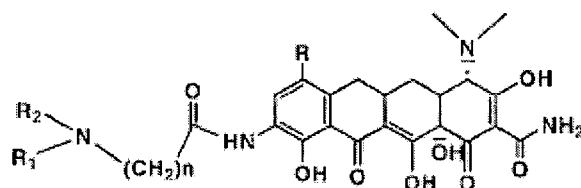


O una sal de estos, y

C) hacer reaccionar por lo menos un compuesto de Fórmula 4 con por lo menos un compuesto de aminoacilo en un medio de reacción escogido en un medio acuoso, y por lo menos un disolvente básico en ausencia de un reactivo base.

[0109] El compuesto de fórmula I preparado mediante este método puede ser tigeciclina.

[0110] Otra modalidad de la presente descripción incluye un método para preparar por lo menos un compuesto de Fórmula 1:



Fórmula 1

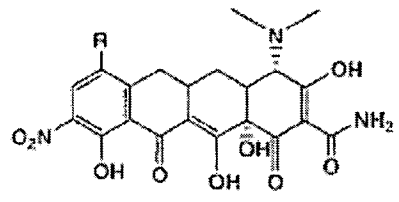
O una sal farmacéuticamente aceptable de este,

En donde  $R_1$  y  $R_2$  son cada uno independientemente escogidos 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  $R_4$  son cada uno independientemente escogidos de hidrógeno y alquilo ( $C_1$ - $C_4$ ) recto y ramificado; y n varía de 1-4,

Que comprende:

A) combinar por lo menos un agente reductor con una suspensión de mezcla de reacción que comprende por lo menos un compuesto de Fórmula 3:

5

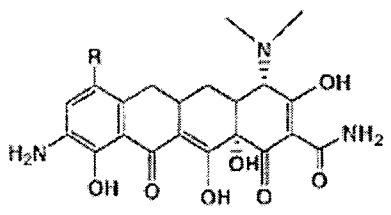


Fórmula 3

O una sal de estos,

10

Para preparar por lo menos un compuesto de Fórmula 4:



Fórmula 4

15

o una sal de ésta, y

B) hacer reaccionar el por lo menos un compuesto de la Fórmula 4 con por lo menos un compuesto de aminoacilo en un medio de reacción escogido de un medio acuoso, y por lo menos un disolvente básico en la ausencia de un reactivo base.

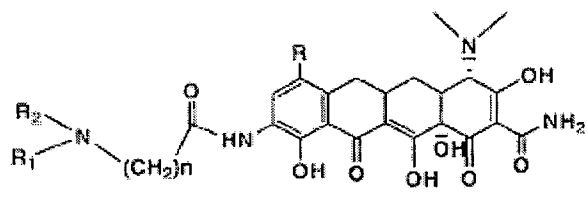
20

[0111] En otra modalidad, el compuesto de la fórmula I preparado mediante el método anterior puede ser tigeciclina.

PURIFICACIÓN

25

[0112] Una modalidad de la presente descripción suministra un método para purificar por lo menos un compuesto de Fórmula 1:



**Fórmula 1**

5 o una sal farmacéuticamente aceptable de éste,

en donde  $R_1$  y  $R_2$  son cada uno independientemente escogidos 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  $R_4$  son cada uno independiente escogidos de  
10 hidrógeno, y alquilo( $C_1-C_4$ ) recto y ramificado; y n varía de 1-4, que comprende:

A) combinar por lo menos un compuesto de Fórmula 1 con por lo menos un disolvente aprótico polar y por lo menos un  
15 disolvente prótico polar para dar una primera mezcla,

B) mezclar la primera mezcla durante por lo menos un período de tiempo tal como de 15 minutos a 2 horas a una temperatura que varía entre 0 °C a 40 °C, y  
20

C) obtener por lo menos un compuesto de Fórmula 1.

[0113] Como se utiliza aquí, el término "obtener" se refiere a aislar un compuesto a un nivel útil de pureza, incluyendo pero  
25 no estando limitado a niveles de pureza mayores de 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, y 99%. El nivel de pureza se puede determinar mediante cromatografía líquida de alta presión.

[0114] En una modalidad, el método para purificar por lo menos un compuesto de Fórmula 1 involucra las etapas de:

5 A) combinar por lo menos un compuesto de Fórmula 1 con por lo menos un disolvente aprótico polar y por lo menos un disolvente prótico polar para dar una primera mezcla,

B) mezclar la primera mezcla durante por un período de tiempo a una temperatura que varía entre 30 °C a 40 °C,

10 C) enfriar la primera mezcla a una temperatura que varía desde 15 °C a 25 °C y permitirle a la mezcla permanecer sin mezclar durante un segundo período de tiempo,

15 D) enfriar la primera mezcla a una temperatura que varía de 0 °C a 6 °C y permitirle a la mezcla permanecer sin mezclar durante un tercer período de tiempo, y

E) obtener el por lo menos un compuesto de Fórmula 1.

20 [0115] En una modalidad, el método puede incluir por lo menos un compuesto de Fórmula 1 donde n es 1, R<sub>1</sub> es hidrógeno, R<sub>2</sub> es t-butilo, y R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> son cada uno metilo. Otra modalidad incluye por lo menos un compuesto de Fórmula 1, donde n es 1, R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub>, junto con N, forman un grupo pirrolidinilo, y R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> son cada uno metilo. El por lo menos un compuesto de Fórmula 1 que se combina con por lo menos un disolvente aprótico polar y por lo menos un disolvente prótico polar se pueden suministrar en una

forma escogida de un sólido, una lechada, una suspensión, y una solución.

[0116] En una modalidad, el por lo menos un disolvente  
5 aprótico polar se puede escoger de acetona, 1,2-dicloroetano, metil acetato, metil etil cetona, metil isobutil cetona, metil cloruro, y etil acetato. En una modalidad adicional, el por lo menos un disolvente aprótico polar se puede escoger de acetona y metil cloruro. En otra modalidad, el por lo menos un disolvente  
10 prótico polar se puede escoger de metanol, etanol, isopropanol, y t-butanol. En una modalidad adicional, el por lo menos un disolvente prótico polar puede ser metanol.

[0117] La combinación de por lo menos un disolvente aprótico  
15 polar y por lo menos un disolvente prótico polar puede incluir acetona y metanol. Otra modalidad suministra una combinación de por lo menos un disolvente aprótico polar, cloruro de metileno, y por lo menos un disolvente prótico polar, metanol. En una modalidad adicional, la combinación de por lo menos un disolvente  
20 aprótico polar y por lo menos un disolvente prótico polar puede incluir metil acetato y metanol. El compuesto de Fórmula 1 puede, por ejemplo, combinarse con volúmenes iguales de por lo menos un disolvente aprótico polar y por lo menos un disolvente prótico polar.

25

[0118] En una modalidad, la primera mezcla puede, por ejemplo, mezclarse durante un primer período de tiempo que varía desde 30 minutos a 2 horas donde la temperatura varía desde 15 °C

a 25 °C, luego durante un segundo período de tiempo que varía desde 30 minutos a 2 horas, donde la temperatura varía desde 0 °C a 2 °C. En una modalidad, el primer período de tiempo y el segundo período de tiempo son cada uno de 1 hora. En otra 5 modalidad, el método puede comprender mezclar la primera mezcla durante por lo menos un período de tiempo que varía desde 30 minutos a 2 horas a una temperatura que varía desde 15 °C a 25 °C, luego filtrar la primera mezcla para obtener un sólido. El método puede comprender además combinar el sólido con por lo 10 menos un disolvente aprótico polar y por lo menos un disolvente prótico polar, tal como a volúmenes iguales, durante un primer período de tiempo que varía de 30 minutos a 2 horas a una temperatura que varía desde 15 °C a 25 °C, y filtrar para obtener un segundo sólido. En una modalidad adicional, estas etapas de 15 combinación y filtración se pueden repetir de dos a quince veces.

[0119] El método para purificar un compuesto de Fórmula 1 puede comprender además obtener un sólido de la primera mezcla, y combinar el sólido con por lo menos un disolvente prótico polar y 20 por lo menos un disolvente aprótico polar para obtener una segunda mezcla. La segunda mezcla puede, por ejemplo, comprender metanol y cloruro de metileno en una proporción en volumen que varía desde 1:5 a 1:15 metanol:cloruro de metileno. En una modalidad, la segunda mezcla puede ser mezclada a una temperatura 25 que varía desde 30 °C a 36 °C y luego ser filtrada para obtener una solución. En una modalidad adicional, la concentración del disolvente prótico polar en la solución se puede reducir a un nivel de menos de 5%, y la solución se puede mezclar, por

ejemplo, a una temperatura que varía desde 0 °C a 6 °C, durante un período de tiempo, por ejemplo, que varía desde 30 minutos a 2 horas antes de filtrar.

5           [0120] En una modalidad, mezclar la primera mezcla puede ocurrir durante un período de tiempo que varía desde 10 a 20 minutos, tal como 15 minutos. En una modalidad, enfriar la primera mezcla a una temperatura que varía desde 15 °C a 25 °C y permitirle a la mezcla permanecer sin mezclar puede ocurrir  
10 durante un segundo período de tiempo que varía desde 30 minutos a 3 horas, tal como de 1 hora a 2 horas. La primera mezcla se puede además enfriar a una temperatura que varía desde 0 °C a 6 °C y se le permite permanecer sin mezclar durante un tercer período de tiempo que varía desde 30 minutos a 2 horas, tal como 1 hora.

15           [0121] Obtener el compuesto de Fórmula 1 puede incluir filtrar cualquier mezcla descrita aquí a través de por lo menos un filtro seleccionado de filtros reductores de pirógeno y filtros clarificantes.

20           [0122] Como se describe aquí, la mezcla se puede llevar a cabo al utilizar un dispositivo de mezcla mecánico, por ejemplo, un mezclador o agitador. La mezcla también se puede efectuar por la solubilidad del compuesto que tiene la Fórmula 1 en el sistema  
25 disolvente. Incrementar la temperatura puede incrementar la solubilidad.

[0123] En una modalidad, cuando por lo menos un compuesto de Fórmula 1 va a ser combinado con por lo menos un disolvente aprótico polar y por lo menos un disolvente prótico polar, el por lo menos un compuesto de Fórmula 1 se puede utilizar en la forma de una sal farmacéuticamente aceptable de éstos. Donde por lo menos un compuesto de Fórmula 1 se obtiene como el producto del método de la invención, el por lo menos un compuesto de Fórmula 1 se puede recuperar en la forma de una sal farmacéuticamente aceptable de éste.

[0124] En otra modalidad, donde un compuesto de Fórmula 1 se obtiene mediante el método de acuerdo con la invención, el compuesto se puede convertir a una sal farmacéuticamente aceptable de éste mediante la adición de un ácido.

[0125] En una modalidad, el por lo menos un compuesto de Fórmula 1 puede ser [4S-(4 $\alpha$ ,12 $\alpha$ )]-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-naftaceno-carboxamida, tal como las sales farmacéuticamente aceptables tales como las sales de HCl. En otra modalidad, el por lo menos un compuesto de Fórmula 1 puede ser [4S-(4 $\alpha$ ,12 $\alpha$ )]-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-naftaceno-carboxamida, tal como las sales farmacéuticamente aceptables tales como sales de HCl.

[0126] Un método para purificar por lo menos un compuesto de Fórmula 1 puede ser un método para purificar tigeciclina, que comprende:

5        A) combinar tigeciclina con por lo menos un disolvente aprótico polar y por lo menos un disolvente prótico polar para dar una primera mezcla,

10        B) mezclar la primera mezcla durante por lo menos un período de tiempo, por ejemplo, que varía desde 15 minutos a 2 horas y a una temperatura que varía de 0 °C a 40 °C, y

         C) obtener tigeciclina.

15        [0127] La tigeciclina que se combina con por lo menos un disolvente aprótico polar y por lo menos un disolvente prótico polar se puede suministrar en una forma escogida de un sólido, una lechada, una suspensión, y una solución. En una modalidad, la tigeciclina obtenida del método puede contener menos de 1% del  
20        epímero C-4 de la tigeciclina o una sal farmacéuticamente aceptable de ésta determinada mediante cromatografía líquida de alta presión (HPLC).

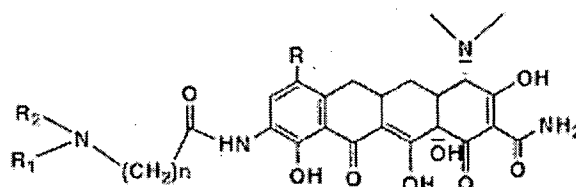
         [0128] El por lo menos un compuesto de Fórmula 1 obtenido  
25        del método puede contener menos de 3.0% de impurezas determinadas mediante HPLC, tal como menos de 1.0% de impurezas, tal como menos de 0.7% de impurezas. En otra modalidad, el por lo menos un compuesto de Fórmula 1 puede contener menos de 2% del epímero C-4

del compuesto de fórmula 1 o una sal farmacéuticamente aceptable de éste, determinada mediante HPLC, tal como menos de 1% del epímero C-4, tal como menos de 0.5% del epímero C-4.

[0129] El método se puede desarrollar con más de 5 gramos del por lo menos un compuesto de Fórmula 1, tal como más de 50 gramos, tal como más de 100 gramos, tal como más de 500 gramos, tal como más de 1 kilogramo, y además tal como más de 10 kilogramos.

[0130] Una modalidad describe un compuesto preparado mediante cualquiera de los métodos descritos aquí, que incluye pero no está limitada a un compuesto de Fórmula 1 y tigeciclina. Otra modalidad incluye una composición que comprende un compuesto preparado mediante cualquiera de los métodos descritos aquí. La composición puede comprender además un portador farmacéuticamente aceptable.

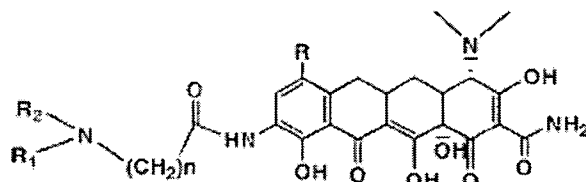
[0131] En una modalidad, la composición puede comprender por lo menos un compuesto de Fórmula 1:



Fórmula 1

o una sal farmacéuticamente aceptable de éste,  
en donde n es 1, R<sub>1</sub> es hidrógeno, R<sub>2</sub> es t-butilo, y R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> son cada uno metilo.

[0132] Una modalidad de la descripción incluye un método para preparar por lo menos un compuesto de Fórmula 1:

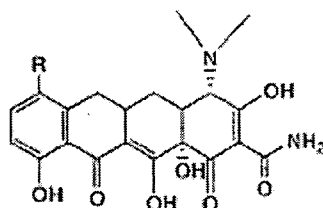


**Fórmula 1**

o una sal farmacéuticamente aceptable de éste,

en donde R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> son cada uno independientemente escogidos de  
10 hidrógeno, alquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>6</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> son cada uno independiente escogidos de  
hidrógeno, y alquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>) recto y ramificado; y n varía de 1-4,  
que comprende:

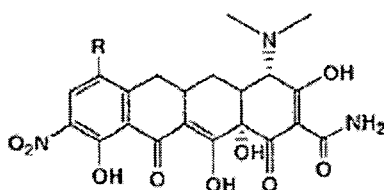
15 A) hacer reaccionar por lo menos un agente nitrante con por  
lo menos un compuesto de Fórmula 2:



**Fórmula 2**

o una sal de éste,

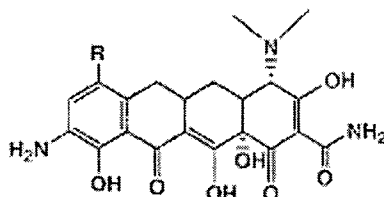
para preparar una mezcla de reacción, tal como una  
25 suspensión de mezcla de reacción, que comprende un intermedio,  
tal como por lo menos un compuesto de Fórmula 3:



**Fórmula 3**

o una sal de éste,

5 B) combinar por lo menos un agente reductor con la suspensión de mezcla de reacción para preparar un segundo intermedio, tal como por lo menos un compuesto de Fórmula 4,

**Fórmula 4**

o una sal de éste,

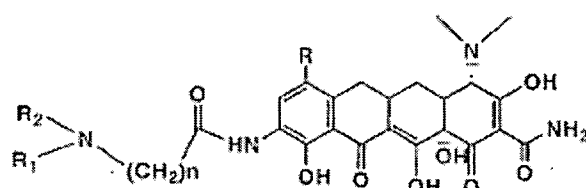
C) hacer reaccionar el segundo intermedio con por lo menos un compuesto de aminoacilo en un medio de reacción para obtener  
15 por lo menos un compuesto de fórmula I. En una modalidad, el medio de reacción se escoge de un medio acuoso, y por lo menos un disolvente básico en ausencia de un reactivo base. Las etapas adicionales pueden incluir, por ejemplo por lo menos una de:

20 D) combinar por lo menos un compuesto de Fórmula 1 con por lo menos un disolvente aprótico polar y por lo menos un disolvente prótico polar para dar una primera mezcla,

E) mezclar la primera mezcla durante por lo menos un período  
25 de tiempo, tal como variando de 15 minutos a 2 horas, a una temperatura, tal como variando de 0 °C a 40 °C, y

F) obtener por lo menos un compuesto de Fórmula 1. En una modalidad, cualquiera de los intermedios de los métodos descritos se puede aislar o precipitar. En otra modalidad, dos o más etapas de cualquiera de los métodos descritos son procedimientos de "un recipiente".

[0133] Otra modalidad de la descripción incluye un método para preparar por lo menos un compuesto de Fórmula 1:

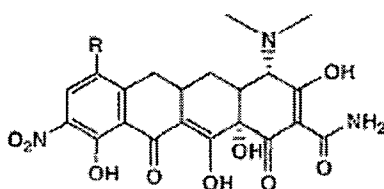


**Fórmula 1**

o una sal farmacéuticamente aceptable de éste,

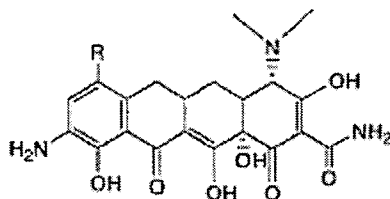
en donde  $R_1$  y  $R_2$  son cada uno independientemente escogidos de hidrógeno, alquilo( $C_1$ - $C_6$ ) de cadena recta y ramificada, y cicloalquilo, o  $R_1$  y  $R_2$  junto con N, forman un heterociclo; R es  $-NR_3R_4$ , donde  $R_3$  y  $R_4$  son cada uno independiente escogidos de hidrógeno, y alquilo( $C_1$ - $C_4$ ) recto y ramificado; y n varía de 1-4, que comprende:

A) combinar por lo menos un agente reductor con una mezcla de reacción, tal como una suspensión de mezcla de reacción, que comprende por lo menos un compuesto de Fórmula 3:



**Fórmula 3**

o una sal de éste, para preparar por lo menos un intermedio,  
tal como un compuesto de Fórmula 4,

**Fórmula 4**

o una sal de éste,

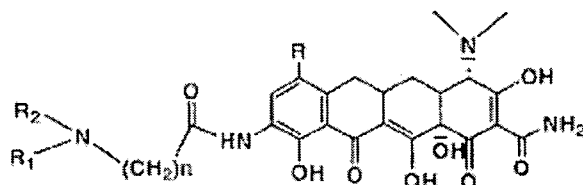
10 B) hacer reaccionar el intermedio con por lo menos un  
compuesto de aminoacilo en un medio de reacción escogido de un  
medio acuoso para obtener el compuesto de Fórmula 1. En una  
modalidad, el medio de reacción se puede escoger de por lo menos  
un disolvente básico en ausencia de un reactivo base. Las etapas  
15 adicionales pueden incluir, por ejemplo, por lo menos una de:

C) combinar por lo menos un compuesto de Fórmula 1 con por  
lo menos un disolvente aprótico polar y por lo menos un  
disolvente prótico polar para dar una primera mezcla,

20 D) mezclar la primera mezcla durante por lo menos un período  
de tiempo, tal como variando de 15 minutos a 2 horas, a una  
temperatura, tal como variando de 0 °C a 40 °C, y

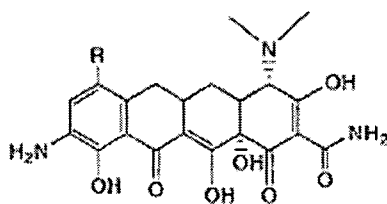
25 E) obtener por lo menos un compuesto de Fórmula 1.

[0134] Una modalidad adicional de la descripción incluye un  
método para preparar por lo menos un compuesto de Fórmula 1:

**Fórmula 1**

5 o una sal farmacéuticamente aceptable de éste,  
 en donde  $R_1$  y  $R_2$  son cada uno independientemente escogidos 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  $R_4$  son cada uno independiente escogidos de  
 10 hidrógeno, y alquilo( $C_1-C_4$ ) recto y ramificado; y n varía de 1-4,  
 que comprende:

A) hacer reaccionar por lo menos un compuesto de Fórmula 4:

**Fórmula 4**

15 o una sal de éste,  
 con por lo menos un compuesto aminoacilo en un medio de  
 20 reacción, por ejemplo, escogido de un medio acuoso, y por lo  
 menos un disolvente básico en ausencia de un reactivo base para  
 obtener el compuesto de Fórmula 1. Las etapas adicionales pueden  
 incluir por lo menos una de:

25 B) combinar por lo menos un compuesto de Fórmula 1 con por  
 lo menos un disolvente aprótico polar y por lo menos un  
 disolvente prótico polar para dar una primera mezcla,

C) mezclar la primera mezcla durante por lo menos un período de tiempo, tal como variando de 15 minutos a 2 horas, a una temperatura, tal como variando de 0 °C a 40 °C, y

5 D) obtener por lo menos un compuesto de Fórmula 1.

[0135] Cualquiera de estos métodos descritos para preparar un compuesto de Fórmula 1 puede ser un método para preparar un compuesto de Fórmula 1, donde n es 1, R<sub>1</sub> es hidrógeno, R<sub>2</sub> es t-butilo, y R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> son cada uno metilo.

10

#### **COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS**

[0136] "Composición farmacéutica" como se utiliza aquí se refiere a una composición medicinal. La composición farmacéutica puede contener por lo menos un portador farmacéuticamente aceptable.

15

[0137] "Excipiente farmacéuticamente aceptable" como se utiliza aquí se refiere a portadores o vehículos farmacéuticos adecuados para la administración de los compuestos suministrados aquí que incluyen cualquiera de tales portadores conocidos por aquellos expertos en la técnica por ser adecuados para el modo particular de administración. Por ejemplo, las soluciones o suspensiones utilizadas para aplicación parenteral, intradérmica, subcutánea, o tópica puede incluir un diluyente estéril (por ejemplo, agua para inyección, solución salina, aceite fijado, y similares); un aceite vegetal de ocurrencia natural (por ejemplo,

20

25

aceite de sésamo, aceite de coco, aceite de maní, aceite de semilla de algodón, y similares); un vehículo graso sintético (por ejemplo, etil oleato, polietilen glicol, glicerina, propilen glicol, y similares, que incluyen otros disolventes sintéticos);  
5 agentes antimicrobianos (por ejemplo, bencil alcohol, metil parabenos, y similares); antioxidantes (por ejemplo, ácido ascórbico, bisulfito de sodio, y similares); agentes quelantes (por ejemplo, ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA) y similares); amortiguadores (por ejemplo, acetatos, citratos,  
10 fosfatos, y similares); y/o agentes para el ajuste de tonicidad (por ejemplo, cloruro de sodio, dextrosa, y similares); o mezclas de éstos. Mediante un ejemplo adicional, donde se administran intravenosamente, los portadores adecuados incluyen solución salina fisiológica, solución salina amortiguada de fosfato (PBS),  
15 y soluciones que contienen agentes espesantes y solubilizantes tales como glucosa, polietilen glicol, polipropilenglicol, y similares, y mezclas de éstos.

[0138] Por vía de un ejemplo no limitante, la tige ciclina se  
20 puede combinar opcionalmente con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables, y se puede administrar oralmente en tales formas como tabletas, cápsulas, polvos dispersables, gránulos, o suspensiones que contienen, por ejemplo, de aproximadamente 0.05 a 5% de agente de suspensión, jarabes que  
25 contienen, por ejemplo, desde aproximadamente 10 a 50% de azúcar, y elixires que contienen, por ejemplo, desde aproximadamente 20 a 50% de etano, y similares, o parenteralmente en la forma de soluciones o suspensiones inyectables estériles que contienen

desde aproximadamente 0.05 a 5% de agente de suspensión en un medio isotónico. Tales preparaciones farmacéuticas pueden contener, por ejemplo, desde aproximadamente 25 a aproximadamente 90% del ingrediente activo en combinación con el portador, más usualmente entre aproximadamente 5% y 60% en peso. Otras formulaciones se discuten en las Patentes U.S. Nos. 5,494,903 y 5,529,990, que se incorporan aquí como referencia.

[0139] El término "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a sales de adición de ácido o sales de adición de base de los compuestos en la presente descripción. Una sal farmacéuticamente aceptable es cualquier sal que retenga la actividad del compuesto padre y no le imparta ningún efecto deletéreo o indeseable al sujeto a quien se administra y en el contexto en el cual se administra. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen complejos de metal y sales tanto de ácidos inorgánicos como orgánicos. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen sales de metal tales como aluminio, calcio, hierro, magnesio, manganeso, y sales de complejo. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen sales de ácido tales como acético, aspártico, alquilsulfónico, arilsulfónico, axetil, bencenosulfónico, benzoico, bicarbónico, bisulfúrico, bitartárico, butírico, calcio edetato, camsílico, carbónico, clorobenzoico, cilexetil, cítrico, edético, edisílico, estólido, esil, esílico, fórmico, fumárico, glucéptico, glucónico, glutámico, glicólico, glicolilarsanílico, hexámico, hexilresorcinólico, hidrabámico, bromhídrico, clorhídrico, yodhídrico, hidroxinaftóico, isetiónico, láctico, lactobiónico,

maléico, málico, malónico, mandélico, metanosulfónico, metilnitrico, metilsulfúrico, músico, mucónico, napsílico, nítrico, oxálico, p-nitrometanosulfónico, pamóico, pantoténico, fosfórico, monohidrogen fosfórico, dihidrogen fosfórico, ftálico, 5 poligalacturónico, propiónico, salicílico, esteárico, succínico, sulfámico, sulfanilico, sulfónico, sulfúrico, tánico, tartárico, teoclico, toluenosulfónico, y similares. Las sales farmacéuticamente aceptables se pueden derivar de amino ácidos, que incluyen pero no están limitados a cisteína. Otras sales 10 aceptables se pueden encontrar, por ejemplo, en Stahl et al., *Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use*, Wiley-VCH; primera edición (Junio 15, 2002).

[0140] En partes diferentes de los ejemplos, y donde se 15 indique otra cosa, todos los números utilizados en la especificación y reivindicaciones van a ser entendidos como modificados en todos los casos por el término "aproximadamente". De acuerdo con esto, a menos que se indique lo contrario, los parámetros numéricos establecidos en esta especificación y las 20 reivindicaciones anexas son aproximaciones que pueden variar dependiendo de las propiedades deseadas buscadas para ser obtenidas por medio de la presente descripción. Por lo menos, y no como un intento para limitar la aplicación de la doctrina de equivalentes al alcance de las reivindicaciones, cada parámetro 25 numérico se debe considerar a la luz del número de dígitos significativos y de aproximaciones redondeadas ordinarias.

[0141] A pesar de que los rangos numéricos y los parámetros que establecen el alcance amplio de la descripción son aproximaciones, los valores numéricos establecidos en los ejemplos específicos se reportan tan exactamente como es posible.

5 Cualquier valor numérico, sin embargo, contiene inherentemente ciertos errores necesariamente resultantes de la desviación estándar encontrada en sus respectivas mediciones de prueba.

[0142] Los siguientes ejemplos pretenden ilustrar la invención de una manera no limitante.

10

**EJEMPLOS**

**NITRACIÓN**

15

[0143] La Minociclina se preparó de acuerdo con el método descrito en la Patente U.S. No. 3,226,436.

[0144] Se desarrollaron análisis HPLC bajo las siguientes condiciones:

20

|               |                                                                                                                                                                                                                                                 |
|---------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Columna:      | Inertsil ODS3 5 µm, 25 x 0.46 cm                                                                                                                                                                                                                |
| Fase móvil:   | 80% A + 20% B, donde<br>A = 90% (0.05 M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> + 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 |
| Tasa de Flujo | 1.0 mL/min                                                                                                                                                                                                                                      |
| Detección     | 250 nm                                                                                                                                                                                                                                          |

**Ejemplo Comparativo 1: Preparación de 9-nitrominociclina**

[0145] Este Ejemplo describe la nitración de minociclina  
5 donde el producto de nitración se aisló.

[0146] 13.44 gramos de minociclina p-clorobencenosulfonato  
(es decir, [4S-(4alfa,12aalfa)]-4,7-Bis(dimetilamino)-  
1,4,4a,5,5a,6,11,12a-octahidro-3,10,12,12a-tetrahidroxi-1,11-  
10 dioxo-2-naftacenocarboxamida p-clorobencenosulfonato) se agregó  
lentamente con agitación 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 la solución se agitó a 0-15°C durante 1-2 h  
hasta que se completó la reacción, determinada mediante HPLC. La  
15 solución que contiene 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-naftacenocarboxamida) se transfirió con  
agitación a 300 g de hielo y agua durante 20 min. El pH del  
20 apagado se ajustó a 5.0-5.5 con 28% de hidróxido de amonio acuoso  
aunque mantiene la temperatura entre 0-8°C. El precipitado se  
filtró y se lavó con agua (2 x 10 mL). El sólido se secó bajo  
vacío bajo una corriente de nitrógeno para dar 9 g de sulfato de  
9-nitrominociclina crudo.

25 [0147] Análisis (área %) mediante HPLC mostró una pureza de  
90% con un contenido de epímero C4 de 1.5%. MS(FAB): m/z 503  
(M+H), 502 (M+). El producto se aisló mediante precipitación en

su punto isoeléctrico de una solución acuosa. El rendimiento molar del sulfato crudo fue del 45%.

[0148] La Tabla 1 de adelante lista los datos para otros 5 procesos de nitración:

Tabla 1

| Nitrominociclina | Impurezas | Minociclina<br>(µg/mg) | Rendimiento molar<br>(%) |
|------------------|-----------|------------------------|--------------------------|
|                  |           |                        |                          |
| A                | 43.15     | 3.62                   | 38                       |
| B                | 27.88     | 5.5                    | 34                       |

[0149] Se puede ver que el aislamiento de la 9-nitrominociclina dio como resultado alta cantidad de impurezas.

Ejemplo Comparativo 2: Preparación de 9-nitrominociclina

[0150] Este Ejemplo describe una nitración de minociclina donde el producto de nitración se aísla.

[0151] Un recipiente de vidrio multi-cuello de 2-L se equipó con un agitador mecánico, termocupla, tubo de adición líquido, línea de nitrógeno, y salida de gas a un lavador cáustico 30% (peso). El recipiente se cargó con ácido sulfúrico 66° Be (1,507 g, 819 mL, 15 moles). La solución se enfrió a 0 - 2°C. La Minociclina.HCl (92.7% de potencia, 311 g, 0.58 moles) se agregó al ácido sulfúrico durante 0.7 horas a 0 - 14 °C con agitación.

Después de la adición, la mezcla se agitó a 0 °C durante 0.5 horas para obtener una solución amarilla. Se agregó ácido nítrico (95.9% de contenido de nitrato, 48 g, 32 mL, 0.73 moles, 1.25 equivalentes mol) se agregó durante 3 horas aunque mantiene la mezcla a 0 - 2 °C. La mezcla se agitó a 0 °C durante 0.3 horas (solución rojo oscuro/negro). Análisis (área %) mediante HPLC mostró: 0% minociclina, 75.6% de 9-nitrominociclina, 8.2% de las impurezas simples más grandes (LSI); tiempo de retención relativo a minociclina (RRT) = 2.08.

[0152] Un recipiente de vidrio multi-cuello de 22-L se equipó con un agitador mecánico, termocupla, y un condensador con protección de nitrógeno. El recipiente 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 entonces a 0 - 5°C. La mezcla de reacción de 9-nitrominociclina se transfirió al recipiente de 22-L durante 2 horas a 0 - 39°C para producir una suspensión amarilla. La temperatura de la suspensión se mantuvo a 34 - 39°C durante 2 horas luego se enfrió a 20 - 34°C y se agitó a 20 - 34 °C durante 14.6 horas.

[0153] Una solución de isopropanol 3,028 g (3,857 mL) y heptanos 660 g (965 mL) se preparó y se mantuvo a 20 - 25°C (4:1, IPA:heptanos en volumen). La suspensión se filtró en un embudo Büchner de 30 cm de diámetro utilizando un papel de filtro Whatman #1 bajo vacío y protección de nitrógeno. La torta húmeda resultante se transfirió a un recipiente Erlenmeyer de vidrio de 4-L, equipado con un agitador mecánico y protección de nitrógeno.

La torta se suspendió al agregar 1,608 mL de la solución de IPA/heptanos preparada durante 0.5 horas a 23 - 26°C.

[0154] La suspensión se filtró de nuevo como se describió  
5 anteriormente. La torta húmeda se resuspendió dos veces más como  
anteriormente (total de tres resuspensiones). Después de la  
última filtración, la torta se mantuvo bajo vacío bajo protección  
de nitrógeno durante 0.2 horas. El producto se secó a 40°C bajo  
23 - 11 mmHg de vacío durante 48 horas a una pérdida en secado  
10 (LOD, 80°C, 1 hora, >49 mmHg vacío) valor de 1.54. El peso del  
sulfato de 9-nitrominociclina obtenido fue de 380.10 g,  
concentración HPLC = 76.3% (como la sal de bisulfato), impurezas  
totales = 34.6%, impureza simple más grande (LSI) 9.46% (RRT =  
0.94). El rendimiento de la minociclina.HCl = 86%. El rendimiento  
15 corregido para la concentración del producto y el material de  
partida = 71%.

[0155] Se puede ver que asilar el compuesto de 9-  
nitrominociclina dio como resultado un producto que tiene un  
20 porcentaje grande de impurezas.

### **Ejemplo 1**

[0156] La Tabla 2 de adelante subraya los experimentos de  
25 nitración conducidos utilizando el procedimiento subrayado en el  
Ejemplo Comparativo 2, donde las siguientes variables se  
modificaron: tiempo de adición de ácido nítrico; temperatura de  
reacción; equivalentes molares del ácido nítrico (con relación a

minociclina HCl); y tasa de agitación. De acuerdo con los métodos descritos aquí, ninguna de las reacciones fueron apagadas o trabajadas para aislar el producto. La herramienta analítica sola utilizada fue análisis de HPLC.

00194

Tabla 2

| Tiempo<br>de<br>Adición<br>HNO <sub>3</sub><br>(hrs) | Temp. de<br>reacción<br>(°C) <sup>1</sup> | Equiv.<br>Mol.<br>HNO <sub>3</sub> | Mino<br>(Área<br>%) | 9-Nitro<br>(Área<br>%) | Tot.<br>Imp.<br>(Área<br>%) | RRT<br>0.44<br>(Área<br>%) | RRT<br>0.51<br>(Área<br>%) | RRT<br>0.57<br>(Área<br>%) | RRT<br>1.23<br>(Área<br>%) |
|------------------------------------------------------|-------------------------------------------|------------------------------------|---------------------|------------------------|-----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| 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> Solamente la temperatura de baño se monitoreó en esas reacciones debido al tamaño del recipiente.

<sup>2</sup> La Reacción fue de 50% en peso de la concentración de minociclina original.

<sup>3</sup> La Agitación fue vigorosa comparada con todos los otros experimentos.

<sup>4</sup> Se agregó HNO<sub>3</sub> como 50% en peso de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

[0157] Se puede ver que a pesar de las varias condiciones intentadas, la cantidad de la minociclina de partida estuvo presente en una cantidad menos del 10% y bajo ciertas condiciones, fue sustancialmente removida.

5

### Ejemplo 2

[0158] También se desarrollaron experimentos que modificaron la reacción de nitración, el apagado de la reacción, y el trabajo de la reacción de nitración. Los experimentos fueron conducidos utilizando el procedimiento subrayado en el Ejemplo Comparativo 2, modificando las siguientes variables: tiempo de adición de ácido nítrico; temperatura de reacción; equivalentes molares del ácido nítrico (con relación a la minociclina HCl); temperatura del apagado; composición de la solución de apagado; tiempo de adición de la mezcla de reacción a la solución de apagado; y método de lavado de la torta aislada. Los datos se muestran en la Tabla 3, adelante. La herramienta analítica sola utilizada fue análisis de HPLC.

20

Tabla 3

| Tiempo de Adición HNO <sub>3</sub> (hrs) | Temp. de reacción (°C) <sup>1</sup> | Equiv. Mol. HNO <sub>3</sub> | Concentración (sal de di H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , %) | Tot. Imp. (%) | LSI (%) | Comp. Apagado <sup>2</sup> | Temp. Apagado (°C) | Tiempo Agregado de Apagado (hrs) | Método de Lavado <sup>3</sup> | Rendimiento (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> Solamente se monitoreó la temperatura del baño en estas reacciones debido al tamaño del recipiente

<sup>2</sup> Cuando se utilizó IPA como el apagado, se agregaron entonces heptanos para obtener la composición de la mezcla de apagado original.

<sup>3</sup> Método de lavado 1: la torta húmeda se lavó sobre un filtro con 4:1 IPA:hep. (vol.). Método de lavado 2: la torta húmeda se suspendió tres veces con 4:1 IPA:hep. (vol.). Método de lavado #2 utilizó 20% más de solución de lavado que el método #1.

<sup>4</sup> El rendimiento se corrigió para la concentración del producto y el material de partida.

<sup>5</sup> El apagado se inició a 0°C inmediatamente entonces se calentó a 34°C y se mantuvo a 34°C por el resto del apagado.

[0159] Se puede ver de los datos de la Tabla 3 que el  
5      rendimiento fue de por lo menos el 50%.

Ejemplo 3

[0160] Este Ejemplo muestra los resultados de variar la  
10      cantidad de ácido nítrico (en equivalentes) necesaria para la

etapa de nitración. El ácido nítrico se tituló a 89.5% y la cantidad utilizada se corrigió de acuerdo con esto.

[0161] Se desarrollaron tres ensayos. El ensayo 1 utilizó 1.25 equivalentes de ácido nítrico, el Ensayo 2 utilizó 1.09 equivalentes, y el Ensayo 3 utilizó 1.00 equivalentes de ácido nítrico.

[0162] La prueba de completamiento de HPLC del Ensayo 1 no mostró señal de la minociclina mientras la prueba de completamiento para el Ensayo 2 mostró 2.5% de material de partida no reaccionado. Ambas reacciones se hidrogenaron y luego se convirtieron a la sal de clorhidrato de aminominociclina utilizando el procedimiento SLP.

[0163] El producto hidrogenado 1 (del Ensayo 1) mostró un contenido de minociclina de 0.37%; Concentración = 83.0%, total imp. = 3.20%; imp. Simples = 0.52%; contenido de efímero = 1.1%.

[0164] El producto 2 hidrogenado (del Ensayo 2) mostró un contenido de minociclina de 1.6%; Concentración = 84.2%; total imp. = 4.00%; imp. Simples = 0.35%; contenido de efímero = 1.0%.

[0165] Ensayo 3: Concentración = 83.0%; total imp. = 5.0%; imp. Simples = 2.7%; contenido de efímero = 1.1%.

### REDUCCIÓN

[0166] Los análisis de HPLC se desarrollaron bajo las siguientes condiciones:

|               |                                                                                                                                                                                                                         |
|---------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Columna:      | Inertsil ODS3 5 $\mu$ m, 25 x 0.46 cm                                                                                                                                                                                   |
| Fase móvil:   | 80% A + 20% B, donde<br>A = 90% (0.05 M $\text{KH}_2\text{PO}_4$ + 5 mL trietilamina/L fosfato + $\text{H}_3\text{PO}_4$ a pH 6)/ 10% de Acetonitrilo ajustado a pH 6.0 con $\text{H}_3\text{PO}_4$<br>B = Acetonitrilo |
| Tasa de Flujo | 1.0 mL/min                                                                                                                                                                                                              |
| Detección     | 250 nm                                                                                                                                                                                                                  |

### 5 Ejemplo 1

[0167] Este Ejemplo describe una reacción de hidrogenación donde la 9-nitrominociclina intermedia no se aisló.

10 [0168] 10.1 gramos de minociclina p-clorobencenosulfonato se agregó lentamente con agitación a 27 mL de ácido sulfúrico concentrado. La solución se enfrió a 0-2°C. Se agregó lentamente  
 ácido nítrico (0.6 mL, 90%) y la solución se agitó a 0-2°C durante 1 - 2 h hasta que se completó la reacción tal como se  
 15 determino mediante HPLC. Después se completó la nitración, la solución que contiene el sulfato de 9-nitrominociclina intermedio se transfirió con agitación a 150 mL de isopropanol y 1200 mL de metanol aunque mantiene la temperatura por debajo de 10-15°C. La  
 solución se hidrogenó a 26-28°C a 40 psi durante 3 h en la  
 20 presencia de 10% de Pd sobre catalizador de carbono, que tuvo 50% de humedad. Después de que se completó la hidrogenación, el

catalizador se filtró y la solución se vertió lentamente en 250 mL de isopropanol con agitación a 0 - 5°C. El sólido (3.4g) se filtró. Pureza cruda mediante HPLC (área %) fue de 90%. El efímero C<sub>4</sub> estuvo presente en una cantidad de 0.9%). MS(FAB): m/z 5 473 (M+H), 472 (M+).

## **Ejemplo 2**

[0169] Este Ejemplo describe una reacción de hidrogenación 10 donde el intermedio de 9-nitrominociclina no se aisló.

[0170] 84.3 gramos de p-clorobencenosulfonato de minociclina se agregó lentamente con agitación a 368 g de ácido sulfúrico concentrado. La solución se enfrió a 10-15°C. Se agregó 15 lentamente ácido nítrico (6.0 mL, vapores). La solución se agitó a 10-15°C durante 1 a 2 h hasta que se completó la reacción, determinada mediante HPLC. Después de que se completó la nitración, la solución que contiene el sulfato de 9-nitrominociclina intermedio se transfirió con agitación a 0.3 kg 20 de metanol aunque mantiene la temperatura por debajo de 10 - 15°C. La solución se hidrogenó a 26-28°C a 50 psi durante 2-3 h en la presencia de 10% de Pd sobre catalizador de carbono, que tuvo 50% de humedad. Después de que se completó la hidrogenación, el catalizador se filtró y la solución se vertió lentamente en 25 0.6 kg de isopropanol y 0.3 Kg de n-heptano con agitación a 0-5°C. El sólido se filtró.

[0171] El sólido húmedo se disolvió en 100 g de agua a 0-5°C. La mezcla se agitó y la fase orgánica se separó y se descartó. A la fase orgánica se agregó 14.4 g de HCl concentrado. El pH de la solución se ajustó a  $4.0 \pm 0.2$  con hidróxido de amonio. 100 mg de sulfito de sodio se agregó y la solución se sembró con 100 mg de 9-aminominociclina. La mezcla se agitó durante 4 h a 0 - 5°C y el producto se filtró y se secó para dar 28.5 g de sólido. La pureza mediante HPLC (área %) fue de 96.5%, con 0.9% de epímero C4.

10 MS(FAB): m/z 473 (M+H), 472 (M+). Rendimiento: 54.2%.

### **Ejemplo Comparativo 1**

[0172] Este Ejemplo describe una reacción de hidrogenación donde se aisló el intermedio 9-nitrominociclina.

15

[0173] 52.0 kg de minociclina.HCl (92.4% de potencia) se cargó a 4.8 partes (251 kg) de ácido sulfúrico 66° Be a 0 a 15°C en un recipiente de 300 galones y agitado para efectuar la remoción del HCl. 7.48 kg de ácido nítrico, vapores 100% (95.9% de contenido de nitrato, 1.26 equivalentes) se cargó durante 3 horas y 20 minutos.

20

[0174] El análisis de HPLC indicó > 1% de minociclina permaneció. De acuerdo con esto, 0.31 kg de ácido nítrico, vapores 100% (95.5% de contenido de nitrato, 0.05 equivalentes) se agregaron. El análisis HPLC indica aún > 1% de minociclina restante. Se agrega otros 0.74 kg de ácido nítrico, 100% de

25

vapores (95.5% de contenido de nitrato, 0.12 equivalentes). Como la prueba de HPLC indicó una vez más > 1% de minociclina permaneció, otros 1.11 kg de ácido nítrico, vapores 100% (95.5% de contenido de nitrato, 0.19 equivalentes) se agregaron, después 5 de lo cual < 1% de minociclina permaneció.

[0175] La mezcla de reacción de nitración se transfirió a una solución de 21.5 partes IPA / 3.3 partes de heptano (1120 kg IPA / 171 kg de heptano) a 0 a 36 °C. La suspensión se filtró 10 (tiempo de filtración largo) lavado con IPA/heptano 4:1 y secado a NMT 40°C a un LOD de NMT 6%, rendimiento 70.9 kg de sal de sulfato (97% de rendimiento crudo) para uso en reacción de reducción.

### 15 Ejemplo 3

[0176] Este Ejemplo describe una reacción de hidrogenación donde no se aísla el intermedio de 9-nitrominociclina.

20 [0177] 25.0 kg de minociclina.HCl (94.4% de potencia) se cargaron a 7.3 partes (183 kg) de ácido sulfúrico 66° Be de 5 a 15 °C en un recipiente de 100 galones y se agitó para efectuar la remoción de HCl. 2.5015 kg de ácido nítrico, 85% (86.6% de contenido de nitrato, 1.25 equivalentes) se agregaron al 25 recipiente durante 78 minutos a 9 a 15°C.

[0178] El análisis HPLC indicó > 1% de minociclina permaneció. Otros 0.261 kg de ácido nítrico, 85% (86.6% de

contenido de nitrato, 0.13 equivalentes) se agregaron. Como el HPLC una vez de nuevo indicó > 1% de minociclina permaneció, otros 0.261 kg de ácido nítrico, 85% (86.6% de contenido de nitrato, 0.13 equivalentes) se agregaron. Como el HPLC aún indicó > 1% de minociclina permanecía, otros 0.174 kg de ácido nítrico, 85% (86.6% de contenido de nitrato, 0.09 equivalentes) se agregaron. Después de lo cual pareció que la reacción alcanzó un nivel a 1.7% de minociclina como material de partida.

[0179] La mezcla de reacción de nitración se transfirió a 4.2 partes (106 kg) de metanol a -20 a 10°C. El baño apagado se ajustó a 4 a 10°C y se utilizó como está en la reacción de reducción.

#### **Ejemplo Comparativo 2**

[0180] Este Ejemplo describe una reacción de hidrogenación donde se aísla el intermedio de 9-nitrominociclina.

[0181] 104 kg de minociclina.HCl (90.3% de potencia) cargada a 4.8 partes (502 kg) de ácido sulfúrico 66°Be a 0 - 10°C en un recipiente de 300 galones y agitada para efectuar la remoción del HCl. 15.2 kg de vapores de ácido nítrico (100.4%, 1.25 equivalentes) se cargaron durante 3 horas a 0 - 6°C, 100 rpm. Como la prueba de HPLC indicó que > 1% minociclina permanecía, otros 0.69 kg de vapores de ácido nítrico (100.4%, 0.06 equivalentes), se agregaron, después de lo cual la minociclina <

1%. La mezcla de reacción se transfirió a una solución de 21.5 partes de IPA / 3.3 partes de heptano a 0-36°C.

[0182] La suspensión se filtró (tiempo de filtración largo), se lavó con IPA/heptano 4:1 y se secó a NMT 40°C a un LOD de NMT 6%, produciendo 140 kg de sal de sulfato (95% de rendimiento crudo) para uso en reacción de reducción.

#### **Ejemplo 4**

[0183] Este Ejemplo describe una reacción de hidrogenación donde se aisló el intermedio de 9-nitrominociclina.

[0184] 104 kg de minociclina.HCl (90% de potencia) cargada a 7.3 partes (763 kg) de ácido sulfúrico 66°Be a 5- 15°C y agitada para efectuar la remoción del HCl. 14.9 kg de vapores de ácido nítrico (100%, 1.25 equivalentes) se cargaron durante 1 hora a 5- 15°C, 120 rpm. Como el análisis HPLC indicaba que > 1% minociclina permanecía, se agregaron otros 0.69 kg de vapores de ácido nítrico (100%, 0.06 equivalentes), después de lo cual la minociclina < 1%.

[0185] La mezcla de nitración se transfirió a 4.2 partes (440 kg) de metanol a -10 a -20°C. El baño apagado se ajustó a - 10°C y se utilizó como está en la reacción de reducción.

#### **Ejemplo Comparativo 3**

[0186] Este Ejemplo describe una reacción de hidrogenación donde se aisló el intermedio de 9-nitrominociclina. Las proporciones de los disolventes/reactivos son relativas a la carga inicial de la minociclina antes de la reacción de nitración.

[0187] La mezcla de reacción de sulfato de 9-nitrominociclina del Ejemplo Comparativo 4 se apagó en 2240 kg (21.5 partes) de isopropanol y 342 kg (3.3 partes) de heptano, durante 1 hora, aunque mantiene la temperatura de tanda de 0 a 36°. La suspensión resultante se agitó de 30 a 36°C durante 2 horas, enfriando luego y agitando de 19 a 25°C durante 1 hora. La mitad de la suspensión se filtró, se lavó con 3 x 205 kg IPA/heptano (4:1) v/v y se secó a NMT 40°C a un LOD de NMT 6%. La filtración y el secado tomaron 16 días (durante 7 de estos días la torta húmeda se operaba en vacío bajo nitrógeno durante un corte programado de la planta) y se produjeron 58 kg de sal de sulfato. La segunda mitad de la suspensión fue puesta en tambores y la disponibilidad del filtro pendiente refrigerada. Ésta se refrigeró durante 12 días, luego se cargó de nuevo al recipiente y se agitó de 0 a 6°C durante 2 días, luego se ajustó de 19 a 25°C, se filtró, se lavó con 3 x 205 kg IPA/heptano (4:1) v/v y se secó a NMT 40°C a un LOD de NMT 6%. La filtración y el secado tomaron 6 días y rindieron 82 kg de sal de sulfato.

[0188] Ambos sub-lotes 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 de 19 a 25°C y se redujeron a

sulfato de 9-aminominociclina utilizando 70 psi de gas de hidrógeno y 2.74 kg (0.026 partes) de Paladio sobre Carbono, humedad 10% (p/p). La reacción de hidrogenación tomo 10.5 horas y no dio como resultado material de partida detectable.

5

[0189] La mezcla de reacción de sulfato de 9-aminominociclina se filtró para remover el catalizador y se apagó en una solución de 1660 kg (16 partes) IPA / 710 (6.8 partes) heptano de 0 a 27°C, durante 1 hora. La mezcla resultante se  
10 ajustó a 19 a 25°C y se agitó durante 1 hora.

[0190] La suspensión de sulfato de 9-aminominociclina se filtró sobre un filtro Nutsche, se lavó con 2 x 162 kg (1.5 partes cada una) IPA / heptano (4:1) v/v y se secó a 40°C a un  
15 LOD de menos de 4%. La filtración, lavado y secado tomaron 10 días y dieron 94.0 kg de sulfato de 9-aminominociclina. Después de la filtración, se observaron sólidos en los licores madre. Estos se filtraron, lavados con 113 kg de IPA / heptano (4:1) v/v y secados a 40 °C a un LOD de menos de 4%. 24.1 kg se recuperaron  
20 y se retuvieron como un lote separado. El rendimiento del crudo total del sulfato de 9-aminominociclina de la minociclina fue de 84%.

[0191] Los 94.0 kg "1<sup>er</sup> cultivo" del sulfato de 9-aminominociclina seco y 0.084 kg (0.0008 partes) de sulfito de sodio se disolvieron en 538 kg (5.17 partes) de agua para inyección, USP y enfriadas de 0 a 6°C. 0 kg de ácido clorhídrico, 20°Be se requirieron para llevar el pH de la solución de sulfato

de 9-aminominociclina a 1.1 +/- 0.1 en razón a que el pH inicial era de 1.16. 48.3 kg (0.46 partes) de ácido clorhídrico, se agregó reactivo a la solución de 9-aminominociclina, formando 9-aminominociclina HCl. 56 kg (0.54 partes) de hidróxido de amonio, 5 28% y 4.0 kg (0.039 partes) de ácido clorhídrico, se agregó reactivo a la solución para obtener un pH de tanda de 4.0 +/- 0.2.

[0192] La tanda fue entonces agitada durante 90 minutos a 0 10 a 6°C aunque asegurando que el pH permaneciera a 4.0 +/- 0.2. La lectura final fue de 4.05 unidades de pH. La tanda se filtró en un filtro Nutsche, se lavó con 2 x 33 kg (0.3 partes cada una) de agua para inyección (pH llevado a 4.0) pre-enfriada a 2 a 8°C, seguida por 2 x 26.1 kg (0.25 partes de acetona) pre-enfriada a 2 15 a 8°C) y secada a NMT 40°C a un contenido de humedad de NMT 7.0%. 43.2 kg de 9-aminominociclina HCl se aislaron, un 40% de rendimiento de minociclina HCl.

[0193] Procesando los 24.1 kg del "2<sup>do</sup> cultivo" del sulfato 20 de 9-aminominociclina seco a través del cambio de sal procedieron de manera similar a procesar como se describió en los cuatro párrafos previos utilizando cantidades proporcionales de reactivos. Un adicional de 9.9 kg de 9-Aminominocicllina HCl se recuperó representando un incremento adicional de rendimiento de 25 9.2%. El rendimiento de tanda total incluyendo ambos cultivos fue de 53.1%.

#### Ejemplo 5

[0194] Este Ejemplo describe una reacción de hidrogenación donde el intermedio de 9-nitrominociclina no se aisló. Las proporciones de los disolventes/reactivos son relativas a la carga inicial de la minociclina antes de la reacción de nitración.

[0195] La mezcla de reacción del sulfato de 9-nitrominociclina del Ejemplo 7 se transfirió a 440 kg (4.2 partes) de metanol, durante 90 minutos, aunque mantiene la temperatura de tanda a -20 a -10°C y la tasa de agitación a 130 RPM.

[0196] La tanda de apagado se ajustó a 4 a 10°C y se redujo a sulfato de 9-aminominociclina utilizando 50 psig de gas hidrógeno y 52 kg (0.5 partes) de Paladio sobre Carbono, humedad 10% (p/p). La reacción de hidrogenación tomó 5 horas y no dio como resultado material de partida detectable. La mezcla de reacción de sulfato de 9-aminominociclina se filtró para remover el catalizador y se apagó en una solución de 1241 kg (12 partes) IPA / 537 kg (5.2 partes) heptano a 17 a 23 °C, durante 30 minutos. La mezcla resultante fue entonces enfriada a -18 a -12°C y agitada durante 1 hora.

[0197] La suspensión de sulfato de 9-aminominociclina resultante se filtró sobre un filtro Nutsche en dos porciones y se lavó con un total de 3.6 partes de IPA / heptano (2:1) v/v pre-enfriado a 0 a 6°C y 506 kg (4.9 partes) de heptano frío. La

filtración y el lavado tomaron 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 5 0 a 6°C y la capa orgánica superior separada como desperdicio.

[0198] 25.7 kg (0.3 partes) de ácido clorhídrico, 20°Be se agregaron a la solución de sulfato de 9-aminominociclina a 0 a 6°C para la conversión a 9-aminominociclina HCl. Se agregó 10 hidróxido de amonio, 28% a la mezcla de reacción para obtener un pH de tanda de 4.0 +/- 0.2; esto tomó 49.5 kg (0.48 partes). 0.15 kg de sulfito de sodio (0.0014 partes) se agregaron a la mezcla de reacción.

15 [0199] La tanda se sembró con 5 g de 9-aminominociclina HCl y se agitó durante 3 horas aunque mantiene el pH a 4.0 +/- 0.2 utilizando hidróxido de amonio, 28% (tomadas 0.05 partes). La tanda se filtró sobre un filtro Nutsche, se lavó con 1 parte de agua para inyección, (llevada a un pH de 4.0) pre-enfriada a 2 a 20 8°C, seguida por 0.2 partes de isopropanol (pre-enfriada a 2 a 8°C) y secada a NMT 50°C a un LOD de NMT 10.0% y a un contenido de humedad de NMT 8.0%.

[0200] 63.1 kg de 9-Aminominociclina HCl se aislaron, un 59% 25 de rendimiento de minociclina HCl.

[0201] La Tabla 4 de adelante lista los Datos Comparativos.

Tabla 4

| Tanda                                                                                                                      | Balanza (kg de minociclina HCl) | Concentración | Rendimiento corregido de concentración | Impurezas totales | Impurezas más grandes simples | Epímero | Tiempo de ciclo <sup>1</sup> |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|---------------|----------------------------------------|-------------------|-------------------------------|---------|------------------------------|
| (Ejemplo 3)                                                                                                                | 30 kg                           | 84.1%         | 40.3%                                  | 4.49%             | 2.76%                         | 2.76%   | 8 días                       |
| (Ejemplo Comp. 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 Comp. 2 o 3)                                                                                                      | 104 kg                          | 86.4%         | 48%                                    | 10.79%            | 0.63%                         | 3.18%   | 33 días <sup>3</sup>         |
|                                                                                                                            |                                 | 87.8%         |                                        | 9.31%             | 0.57%                         | 2.46%   |                              |
| (Ejemplo 4 o 5)                                                                                                            | 104 kg                          | 87.7%         | 57%                                    | 3.5%              | 1.2%                          | 0.72%   | 14 días                      |
| <sup>1</sup> El tiempo del ciclo es de la minociclina.HCl a 9-aminominociclina HCl.                                        |                                 |               |                                        |                   |                               |         |                              |
| <sup>2</sup> Rendimiento combinado de 1 <sup>er</sup> y 2 <sup>do</sup> cultivos                                           |                                 |               |                                        |                   |                               |         |                              |
| <sup>3</sup> No incluye el corte de 7 días de la planta que ocurrió durante el proceso, incluye el tiempo del 2do cultivo. |                                 |               |                                        |                   |                               |         |                              |

[0202] La Tabla 4 indica que la hidrogenación de la mezcla de reacción sin el aislamiento da como resultado un producto con una cantidad inferior de impurezas y el epímero C<sub>4</sub>.

ACILACIÓN

[0203] Los análisis HPLC se desarrollaron bajo las siguientes condiciones:

|               |                                                                                                                                                        |
|---------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Columna:      | Luna C8 5 µm, 15 x 0.46 cm                                                                                                                             |
| Fase móvil:   | 80% (0.05 M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> + 10 mL trietilamina/L fosfato + H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> a pH 6.2)/ 20% Acetonitrilo + 0.5 g NaEDTA |
| Tasa de Flujo | 1.0 mL/min                                                                                                                                             |
| Detección     | 250 nm                                                                                                                                                 |

### Ejemplo 1

#### Clorhidrato de N-t-Butilglicina

5           [0204] A una mezcla de t-butil amina (1.57 L) y tolueno  
(1.35 L) a 45-50 °C se agrega t-butil bromoacetato (420 mL). La  
mezcla se agita durante 1 h a 50-60 °C, la temperatura se  
incrementa a 75 °C durante 1 h. Después de 2 h a 75 °C, la mezcla  
se enfría a  $-12 \pm 3$  °C y se deja asentar durante 1 h. El sólido se  
10 recolecta mediante filtración, y el filtrado se concentra  
mediante destilación (30-40 °C, 25-35 mm de Hg) a un volumen de  
825 mL. El concentrado resultante se enfría a 20-25 °C y 6N de  
HCl (1.45 kg) se agrega. Después de 3 h, las fases se separan y  
la fase acuosa se concentra mediante destilación (30-40 °C, 25-  
15 35 mm de Hg) a un volumen de 590 mL. Se agrega isopropanol (2.4  
L) y la mezcla se concentra mediante destilación (15-20 °C, 10-20  
mm de Hg) a un volumen de 990 mL. La suspensión resultante se  
enfria a  $-12 \pm 3$  °C durante 30 min. y se deja asentar durante 1 h.  
El sólido se recolecta mediante filtración, se lava con i-PrOH, y  
20 se seca ( $45 \pm 3$  °C, 10 mm Hg) durante 24 h para lograr (407.9 g,  
86%) del producto deseado.

### Ejemplo 2

#### Clorhidrato de Cloruro de Ácido de N-t-Butilglicina

25

[0205] A una mezcla de clorhidrato de N-t-butilglicina  
molido (250.0 g), tolueno (1.14 L), y DMF (7.1 g) se agrega  
tionil cloruro (143 mL) durante 20 min. La mezcla se lleva a 80-

85 °C y se calienta con agitación durante 3 h. Después de enfriar a 20 °C, el sólido se recolecta mediante filtración bajo N<sub>2</sub>, se lava con tolueno, y se seca (40 °C, 10 mm Hg) durante 16 h para lograr el producto deseado (260.4 g, 93.8%). Pureza mediante área

5 HPLC %: 98.12%

### Ejemplo 3

#### Tigeciclina

10

[0206] A una mezcla de 9-aminominciclina•HCl (140.0 g) y agua fría (0-4 °C) (840 mL) se agrega clorhidrato de cloruro de ácido N-t-butilglicina (154.0 g) durante 15 min con agitación. La mezcla se agita a 0-4 °C durante 1-3 h. Se agrega hidróxido de amonio (126 g, 30%) para llevar el pH a 7.2 aunque mantiene la temperatura a 0-10 °C. Se agrega metanol (930 mL) y CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (840 mL) y la mezcla se agita a 20-25 °C durante 1 h, aunque mantiene el pH a 7.2 mediante la adición de hidróxido de amonio (13.5 g, 30%). Las fases se separan, y los sólidos se combinan con la capa orgánica. La capa acuosa se extrae con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1 x 840 mL, 3 x 420 mL) y el pH de la mezcla se ajusta a 7.2 durante cada extracción. A las capas orgánicas combinadas se agrega metanol (200 mL) para lograr una solución. La solución se lava con agua (2x140 mL), luego se seca sobre sulfato de sodio (140 g) con agitación durante 30 min. La mezcla se filtra y el filtrado se concentra mediante destilación (20 °C, 15-25 mm Hg) a un volumen de 425 mL. A esta mezcla se agrega CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1.4 L) y la destilación se repite dos veces. La suspensión resultante se

enfria a 0-2 °C y se agita durante 1 h. El sólido se recolecta mediante filtración, se lava con 0-5 °C CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 x 150 mL), y se seca (65-70 °C, 10 mm Hg) durante 24 h para lograr el producto deseado (120.0 g, 75%). Pureza mediante área HPLC %: 98.9% y  
5 epímero C-4 0.12%.

### Ejemplo 3A

#### Tigeciclina

10 [0207] A una mezcla de 9-aminominciclina•HCl (100.0 g) y agua fría (0-4 °C) (600 mL) se agrega clorhidrato de cloruro de ácido N-t-butilglicina (110.0 g) durante 50 min con agitación. La mezcla se agita bien a 0-4 °C durante 1.5 h. Se agrega hidróxido  
15 de amonio (112 g, 28%) para llevar el pH a 7.2 aunque mantiene la temperatura a 0-5 °C. Cloruro de metileno (600 mL), luego metanol (440 mL) se agregaron y la mezcla se agitó a 0-5 °C durante 30 min, aunque mantiene el pH a 7.2 mediante la adición de hidróxido de amonio (10.0 g, 28%). La mezcla se calentó a 20-25 °C durante  
20 15 min. Se 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 agrega metanol (144 mL) para lograr una solución. La solución se lavó con agua (2x100 mL), luego se  
25 secó sobre sulfato de sodio (100 g) con agitación durante 30 min. La mezcla se filtró y el filtrado se concentra mediante destilación (20 °C, 80-120 mm Hg) a un volumen de 400 mL. A esta mezcla se agregó CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1.0 L) y la destilación se repitió dos

veces. La suspensión resultante se enfría a 0-2 °C y se agitó durante 1 h. El sólido se recolectó mediante 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 h, luego 3-5 mm Hg durante 16 h) para lograr el producto deseado (82.4 g, 71.7%). Pureza mediante área HPLC %: 98.5% y epímero C-4 0.28%.

#### Ejemplo 4

##### 10      Clorhidrato de Cloruro de Ácido N-t-Butilglicina

[0208] Se disolvió t-Butilamina (88 g) en 300 mL de tolueno. La mezcla se calentó a 45-50 °C y 117.5 g de t-butilbromoacetato se agregaron durante 1 h aunque mantiene la temperatura a 50-60 °C. La mezcla recalentó a 75 °C durante 2 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 que fue bromohidrato de t-butilamina se descartó. El filtrado se enfrió a 10-12 °C y se burbujeó gas HCl durante 0.5 h. La mezcla se agitó durante 3 h a 10-12 °C, luego el producto se recolectó mediante filtración y se lavó con tolueno frío. El producto se secó bajo vacío a 40-50 °C para dar 107 g de clorhidrato de N-t-butilglicina. MS: m/z 187 (M+).

25      [0209] Clorhidrato de N-t-butilglicina (7 g) del material preparado como se describió anteriormente se agregó a 35 mL de tolueno. Se agregó cloruro de tionilo (11.6 mL) y la suspensión se calentó a 75-80 °C durante 1 h. La suspensión se enfrió a 20

°C y el sólido se recolectó mediante filtración y se lavó con 2x15 mL de tolueno. El sólido resultante se secó bajo vacío a 40 °C para lograr 4.4 g (65% de rendimiento) del producto, que es protegido de la humedad y utilizado inmediatamente en la siguiente etapa.

### Ejemplo 5

#### Tigeciclina

10

[0210] Se agregó 9-Aminominciclina (10.00 g) en forma de porciones a 60 mL de agua a 0-5 °C. Se agregó clorhidrato de cloruro de ácido t-butilglicina (10.98 g) en forma de porciones manteniendo la temperatura a 0-5 °C. Después de agitar durante 15 40-60 min., 30% de hidróxido de amonio se agregó gota a gota a la mezcla de reacción aunque mantiene la temperatura a 0-5 °C para ajustar el pH a 7.2. A la solución se agregó 83 mL de metanol seguido por 60 mL de cloruro de metileno. Después de agitar durante 15 min., las fases se separaron. La fase acuosa se 20 extrajo con 4 x 40 mL de cloruro de metileno ajustando el pH a 7.2 antes de cada extracción. A los orgánicos combinados se agregó 10 mL de metanol, y la solución se secó sobre sulfato de sodio. Después de filtrar, la solución se concentró para dar una suspensión (peso neto 51 g). La suspensión se agitó a 5-10 °C 25 durante 1 h luego se filtró. El sólido se lavó con 2 x 10 mL de cloruro de metileno frío, luego se secó para dar 8.80 g del producto (76.8% de rendimiento). Pureza mediante área HPLC %: 98.4% y epímero C-4 0.1%. MS(FAB): m/z 586 (M+H); 585 (M+).

**Ejemplo 6**Clorhidrato de Cloruro de Ácido N-t-Butilglicina

5

[0211] Se disolvió t-Butilamina (1.5 g) en 1.35 mL de tolueno. La mezcla se calentó a 45-50 °C y 548 g de t-butilbromoacetato se agregaron durante 1 h aunque mantiene la temperatura a 50-60 °C. La mezcla recalentó a 75 °C durante 3 h. 10 La mezcla de reacción se enfrió entonces a 12 - 15 °C y se agitó durante 1 h. Los sólidos se filtraron y se lavaron con tolueno frío. El sólido que fue bromohidrato de t-butilamina se descartó. El filtrado se concentró a ~ 800 mL al destilar el disolvente. El concentrado se enfrió a 25 °C y 900 mL de 6N de HCl se agregaron 15 a la mezcla. Después de agitar durante 3 h a 20 a 25 °C, las fases se separaron. La fase orgánica se descartó y la fase acuosa se concentró a un volumen de 600 mL. Se agregó isopropanol (2.4 L) al concentrado. La suspensión se enfrió a -12 a -9 °C y se mantuvo durante 0.5 h. El producto se recolectó mediante 20 filtración, se lavó con isopropanol frío, luego se secó bajo vacío a 40-50 °C para dar 408 g del sólido. Pureza mediante NMR > 95%. MS: m/z 187 (M+).

[0212] Clorhidrato de N-t-butilglicina (250 g) proveniente 25 del material preparado como se describió anteriormente se agregó a 1.3 L de tolueno y 7.5 mL de DMF. Se agregó cloruro de tionilo (143 mL) y la suspensión se calentó a 80-85 °C durante 3-4 h. La suspensión se enfrió a 20 °C y el sólido se recolectó mediante

filtración y se lavó con 2x250 mL de tolueno. El sólido se secó en vacío a 40 °C para lograr 260 g (82% de rendimiento) del producto. Pureza mediante área HPLC %: 98.2%.

5

### Ejemplo 7

#### Tigeciclina

[0213] Se agregó 9-Aminominciclina (140.0 g) en forma de  
10 porciones a 840 mL de agua a 0-4 °C. Se agregó clorhidrato de  
cloruro de ácido t-butilglicina (154 g) durante 15 min con buena  
agitación aunque mantiene la temperatura a 0-4 °C. La solución se  
agitó durante 1-3 h. El pH de la mezcla se ajustó a 7.2±0.2 con  
hidróxido de amonio al 30% aunque mantiene la temperatura a 0-10  
15 °C. Metanol (930 mL) y 840 mL de cloruro de metileno se agregaron  
a la solución, la cual se agitó durante 1 h 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 aproximadamente 500 mL. La  
20 suspensión resultante se enfrió a 0-2 °C durante 1 h. El sólido  
se filtró y se secó para dar 120 g del producto (75% de  
rendimiento). Pureza mediante área HPLC %: 98%, epímero C-4 0.1%.  
MS(FAB): m/z 586 (M+H); 585 (M+).

25

### Ejemplo 8

#### Clorhidrato de Acido Pirrolidinilacético

[0214] Se disolvió pirrolidina (14.2) en 40 mL de metil t-butil éter. La solución se enfrió a 0 a -5 °C. Se agregó bencil bromoacetato (22.9 g) gota a gota con agitación. La suspensión blanca espesa se agitó durante 0.5 h a 0-5 °C. El sólido se  
5 filtró y se lavó con metil t-butil éter. El filtrado se concentró para dar 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 catalizador Pd/C (50% de humedad). La solución se hidrogenó a 40 psi durante 6 h. El catalizador se filtró y se  
10 lavó con metanol. El filtrado se concentró para dar 11.8 g de ácido pirrolidinil acético como un aceite incoloro. 15.8 g de ácido pirrolidinil acético se suspendieron en 15 mL de metil-t-butil éter. Se agregó acetonitrilo (15 mL) y la suspensión se enfrió a 0-5 °C. Se agregó HCl etereal (120 mL, 1.0 M) con  
15 agitación. El precipitado blanco resultante se filtró, se lavó con metil t-butil éter, y se secó para dar 15 g de clorhidrato de ácido pirrolidinil acético. Pureza mediante área GC/MS %: 98%. MS: m/z 129 (M+).

20

### Ejemplo 9

[4S-(4 $\alpha$ ,12 $\alpha$ )]-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-naftaceno-carboxamida

25

[0215] Se suspendió ácido pirrolidinilacético (7.7 g) en 7 mL de acetonitrilo. Después de enfriar a 0-5 °C, 5.3 mL de cloruro de tionilo se agregaron lentamente con agitación. La

suspensión se calentó a 55 °C. La solución oscura se mantuvo a 55 °C durante 0.5 h y luego se enfrió a temperatura ambiente para lograr el clorhidrato de cloruro de pirrolidinilacetilo. Se preparó clorhidrato de 9-Aminominocicina (5.0 g), como se describió en el Ejemplo 4 anterior, se suspendió en 5.0 mL de agua. La suspensión se enfrió a -15 °C. A esta suspensión se agregó gota a gota la solución del clorhidrato de cloruro de pirrolidinilacetilo preparada como se describió anteriormente, manteniendo la temperatura por debajo de 22 °C. La mezcla de reacción oscura se agitó a 22-25 °C durante 3 h. Se 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 6x15 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Los extractos orgánicos se agruparon y se concentraron a 40 °C. Se agregó etanol anhidro (10 mL) al concentrado, y la suspensión se agitó a 5-7 °C durante 1 h. El sólido se filtró y se secó en vacío a 40 °C para lograr 3.5 g del producto. Pureza mediante área HPLC %: 98.7%, epímero C-4 0.4%. MS(FAB): m/z 586 (M+H); 585 (M+).

### Ejemplo 10

#### Tigeciclina

[0216] Se agregó 9-Aminominociclina (4.0 g) en forma de porciones a 10 mL de acetonitrilo y 5 mL de DMPU a 10-15 °C. Se agregó clorhidrato de cloruro de ácido t-Butilglicina (4.4 g) en forma de porciones manteniendo la temperatura a 10-15 °C. Después de agitar durante 2 h, 10 mL de MeOH y 17 mL de agua se agregaron

lentemente a la mezcla de reacción manteniendo la temperatura entre 10-17 °C. Se agregó hidróxido de amonio (30%) gota a gota a la mezcla de reacción, manteniendo la temperatura a 5-8 °C, para ajustar el pH a 7.2. A la solución se agregó 15 mL de cloruro de metileno. Después de agitar durante 15 min., las fases se separaron. La fase acuosa se extrajo con 2x20 mL de cloruro de metileno, ajustando el pH a 7.2 antes de cada extracción. A los orgánicos combinados se agregó 700 mg de Norit CA-1 (carbón vegetal) y 10 g de sulfato de sodio, luego la mezcla se filtró. La torta se lavó con 2x20 mL de cloruro de metileno. La solución se concentró y la suspensión resultante se agitó a 5-8 °C durante 16 h. Después de filtrar, el sólido se lavó con 2 x 10 mL de cloruro de metileno frío, luego se secó para dar 2.3 g del producto (50% de rendimiento). Pureza mediante área HPLC %: 95.2%, epímero C-4 0.5%. MS(FAB): m/z 586 (M+H); 585 (M+).

Ejemplo 11-19

Tigeciclina

20

[0217] Los Ejemplos 11-19 siguieron el procedimiento del Ejemplo 10 con modificación de disolvente como se indica adelante.

| Ejemplo | Disolvente                     | Rendimiento | Resultados <sup>1</sup>                     |
|---------|--------------------------------|-------------|---------------------------------------------|
| 11      | DMPU                           | 50%         | Pureza:95.2%, epímero C-4:0.5%,<br>sm:3.35% |
| 12      | DMPU-H <sub>2</sub> O<br>(1:1) | 48%         | Pureza:98.1%, epímero C-4:0.5%,<br>sm:0.7%  |

<sup>1</sup> Pureza evaluada mediante área HPLC. sm = material de partida 9-Aminominociclina

|    |                                 |                                      |                                                                                          |
|----|---------------------------------|--------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------|
| 13 | DMPU-MeCN                       | Rendimiento<br>60-72%,<br>balanza 6g | Requirió trabajo extensivo                                                               |
| 14 | THF                             | --                                   | Reacción "no fue hasta el fin".                                                          |
| 15 | MeCN                            | --                                   | "reacción incompleta"                                                                    |
| 16 | CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> | --                                   | "reacción incompleta"                                                                    |
| 17 | THF-H <sub>2</sub> O<br>(6:1)   | --                                   | La reacción no fue exitosa                                                               |
| 18 | NMP                             | --                                   | Reacción "trabaja bien a escala<br>pequeña, "lleva hasta que se complete<br>la reacción" |
| 19 | DMF <sup>2</sup>                | 58%                                  | Impureza desconocida: 1.5%                                                               |

### Ejemplo 20

#### Clorhidrato de Cloruro de Ácido N-t-Butilglicina

5

[0218] A un recipiente multi-cuello de 5-L con un agitador mecánico, termocupla, condensador con una línea de nitrógeno a 30% (peso) lavador cáustico, y se agregó un embudo de adición con presión equilibrada de 250 mL al clorhidrato de N-t-butilglicina molido (436 g, 2.60 moles, d(0.5) = 103 µm), tolueno (1,958 g, 2,263 mL), y N,N-dimetilformamida (13.6 g, 14.4 mL, 0.19 moles). Se agregó cloruro de tionilo (405 g, 248 mL, 3.40 moles) a la suspensión blanca apagada, utilizando un embudo adicional de 250 mL durante 33 min a 20 - 23 °C. La suspensión se calentó lentamente a 80 °C durante 1 hora, luego agitada a 80 °C durante 3 horas. Después de 3 horas la reacción se completó mediante cromatografía de capa delgada (< 2% de material de partida). La suspensión amarillo-naranja se enfrió a 20 °C durante 32 min.,

<sup>2</sup> La mezcla de reacción se apagó con isopropanol-etil acetato, luego se particionó entre agua y CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. La fase orgánica se concentró, luego se diluyó con tolueno antes del aislamiento del producto.

luego se agitó a 15 - 20 °C durante 32 min. El sólido se recolectó mediante filtración en vacío sobre un embudo Büchner de 15 cm utilizando un papel Whatman #42. La torta se lavó con tres porciones de tolueno (272 g, 314 mL cada lavado) a 20 - 25 °C. La  
5 torta húmeda se secó con succión durante 20 minutos bajo protección de nitrógeno. El producto se secó en un horno con un vacío de 23 mm de Hg y 38 °C durante 21.2 horas para producir una pérdida al secado de 1.23%. El peso del cloruro de t-butilaminoacetilo HCl obtenido = 462 g, concentración GC = 91.0%,  
10 identificación IR = positiva. El rendimiento del ácido t-butilaminoacético HCl = 96%. El rendimiento corregido para concentración del producto y material de partida = 87%.

### Ejemplo 21

15

#### Clorhidrato de Cloruro de Ácido N-t-Butilglicina

[0219] A un recipiente multi-cuello de 5-L con un agitador mecánico, termocupla, condensador con una línea de nitrógeno a  
20 25% (peso) lavador cáustico, y un embudo adicional de presión equilibrante 250 mL al se agregó el 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). Se agregó cloruro de tionilo (422 g, 259 mL, 3.54 moles)  
25 a la suspensión blanca apagada, utilizando un embudo de adición de 250 mL durante 19 min a 19 - 22 °C. La suspensión se calentó lentamente a 79 °C durante 7.1 horas, luego se agitó a 79 - 82 °C durante 44 horas. La reacción se revisó a las 3 horas y se

encontró que estaba incompleta mediante cromatografía de capa delgada (TLC). Un adicional de 26 mL (42 g, 0.35 moles) de cloruro de tionilo se agregó. Después de un total de 27 horas, la reacción estaba aún incompleta mediante TLC y se agregaron 26 mL adicionales (42 g, 0.35 moles) de cloruro de tionilo. Después de un total de 44 horas, a 79-82 °C, la reacción se completó mediante TLC (<4% de partida de ácido t-butilaminoacético HCl). La suspensión café oscura se enfrió a 25 °C durante 17 min., luego se agitó a 21 - 25 °C durante 37 min. El sólido se recolectó mediante filtración en 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 con succión durante 16 minutos bajo protección de nitrógeno. El producto se secó en un horno con un vacío de 23 mm Hg y 38 °C durante 26.1 horas para producir una pérdida al secado de 0.75%. El peso del cloruro de t-butilaminoacetilo HCl obtenido = 395 g, concentración GC = 89.5%, identificación IR = positiva. El rendimiento del ácido t-butilaminoacético HCl = 79%. El rendimiento corregido para concentración del producto y material de partida = 71%.

### Ejemplo 22

#### Tigeciclina

[0220] Se disolvió 9-Aminominciclina HCl (43.0 kg) en 258 kg (6.0 partes de agua) para inyección a 0 a 6 °C. Cloruro de ácido de N-t-Butilglicina HCl (47.3 kg, 1.1 partes, 3.01

equivalentes) se agregaron a la solución en tanda lentamente aunque mantiene la temperatura de tanda a 0 a 6 °C. La mezcla de reacción se agitó durante 1 h y se determinó que tenía 0.2% de material de partida (cloruro de ácido de N-t-Butilglicina  
5 adicional HCl no se requirió). La mezcla de reacción GAR-936 se llevó entonces a un pH de 7.2 +/- 0.2 utilizando 32 kg (0.7 partes) de hidróxido de amonio, 28%, y 2 kg de reactivo de ácido clorhídrico (para reajustar sobre corrección). El pH inicial igualó 0.42 y el pH final igualó 7.34. Cloruro de metileno (342  
10 kg, 8 partes) y 148 kg (3.4 partes) de metanol se agregaron a la mezcla de reacción a 0 a 7°C. En razón a que el pH fue de 7.09, no se requirió ajuste. La tanda se calentó a 19 a 25 °C. Se agregó metanol (83 kg, 1.9 partes) y la fase orgánica inferior se dividió. El producto permaneció en la fase acuosa se extrajo  
15 entonces en una fase orgánica utilizando 1 x 342 kg (8 partes) y 3 x 172 kg (4 partes) de cloruro de metileno aunque mantiene el pH a 7.2 +/- 0.2 con hidróxido de amonio, 28%. Se agregó metanol (49 kg, 1.14 partes) a la solución de cloruro de metileno/metanol resultante, la cual se lavó con 2 x 43 kg (1 parte) de agua para  
20 inyección antes de ser secada con 43 kg (1 parte) de sulfato de sodio. Tres destilaciones en vacío fueron entonces desarrolladas para remover el metanol con cincelados de 568 kg (13.2 partes) de cloruro de metileno agregadas antes de la segunda y tercera destilación. El nivel residual del metanol en el licor madre fue  
25 de 0.21%. La tanda se filtró, se lavó con 2 x 60 kg (1.4 partes) de cloruro de metileno pre-enfriado (0 a 6°C). El material crudo resultante no se secó, sino se aisló como una torta húmeda (72.5 kg, 38.2 kg de peso seco calculado como pérdida al secado),

logrando un 77% de rendimiento de la 9-aminominociclina HCl. Los resultados analíticos de la torta húmeda: minociclina = 1.26%, impurezas más grandes simples = 0.37%, epímero C-4 = 0.50%.

5

### Ejemplo 23

#### Tigeciclina

[0221] Se disolvió 9-Aminominociclina HCl (61.0 kg) en 258  
10 kg (6.0 partes de agua) para inyección a 0 a 6 °C. Cloruro de  
ácido de N-t-Butilglicina HCl (67.1 kg, 1.1 partes, 3.01  
equivalentes) se agregaron a la solución de tanda lentamente  
aunque mantiene la temperatura de tanda a 0 a 6 °C. La mezcla de  
reacción se agitó durante 3.5 h y se determinó que tenía 0.13% de  
15 material de partida (cloruro de ácido de N-t-Butilglicina  
adicional HCl no se requirió). La mezcla de reacción se llevó  
entonces a un pH de 7.2 +/- 0.2 utilizando 45 kg (0.7 partes) de  
hidróxido de amonio, 28%. El pH inicial igualó 0.82 y el pH final  
igualó 7.07. Cloruro de metileno (485 kg, 8 partes) y 210 kg (3.4  
20 partes) de metanol se agregaron a la mezcla de reacción a 0 a  
6°C. En razón a que el pH estaba aún en el rango (7.04), no se  
requirió ajuste. La tanda se calentó a 19 a 25 °C. Se agregó  
metanol (118 kg, 1.9 partes) y la fase orgánica inferior se  
dividió. El producto permaneció en la fase acuosa se extrajo  
25 entonces en la fase orgánica utilizando 1 x 485 kg (8 partes) y 3  
x 244 kg (4 partes) de cloruro de metileno aunque mantiene el pH  
a 7.2 +/- 0.2 con hidróxido de amonio, 28%. Se agregó metanol (70  
kg, 1.14 partes) a la solución de cloruro de metileno/metanol

resultante, la cual se lavó con 2 x 61 kg (1 parte) de agua para inyección antes de ser secada con 61 kg (1 parte) de sulfato de sodio. Tres destilaciones en vacío fueron entonces desarrolladas para remover el metanol con cincelados de 805 kg (13.2 partes) de 5 cloruro de metileno agregadas antes de la segunda y tercera destilación. El nivel residual del metanol en el licor madre fue de 0.05%. La tanda se filtró y se lavó con 2 x 85 kg (1.4 partes) de cloruro de metileno pre-enfriado (0 a 6°C). El material crudo 10 resultante no se secó, sino se aisló como una torta húmeda (103 kg, 53.4 kg de peso seco calculado de la pérdida de sequedad), logrando un rendimiento del 76% de 9-aminominociclina HCl.

#### **Ejemplo Comparativo 24**

##### 15 Monoclorhidrato de Tigeciclina

##### *Ejemplo 24A: 9-cloroacetamidominociclina*

[0222] Se enfrió cloruro de metileno (1.3 L) a 0-2 °C en un recipiente de fondo redondeado de 3-L ajustado con un agitador 20 mecánico, un termómetro y un embudo de adición de 1-L. Se agregó clorhidrato de 9-aminominociclina recristalizado (400 g) en forma de porciones con agitación. Se agregó trietilamina (428 mL) durante 10 min., aunque mantiene la temperatura entre 0-2 °C. La mezcla de reacción se agitó durante 10 min., y se enfrió a -22 25 °C. Una solución de 280 g de anhídrido cloroacético se agregó entonces en 540 ml de cloruro de metileno a tal proporción que la temperatura no alcanzó por encima de 5 °C. Un adicional de 132 ml de cloruro de metileno se utilizó para enjuagar el embudo

adicional. La mezcla de reacción se ensayó mediante HPLC 15 min después de iniciar la adición de anhídrido. Cuando la cantidad del material de partida presente era menos del 2%, la reacción se apagó con 680 mL de solución de bicarbonato de sodio 0.05M. La 5 mezcla se agitó durante 15 min, luego se transfirió a un embudo separatorio de 5-L. A las fases se les permitió separarse. La fase del cloruro de metileno se separó y se lavó con un adicional de 680 mL de solución de bicarbonato de sodio 0.05M. La solución de cloruro de metileno se agregó gota a gota en 17 L de una 10 mezcla 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 min., y luego se le permitió asentarse durante 10 min. El sobrendante se decantó y el precipitado se filtró a través de un embudo fritado de porosidad gruesa. El sólido se lavó con 2 L de 10:1 de n- 15 heptano:isopropanol. El sólido se secó a 40°C bajo vacío para lograr 550 g del producto crudo.

#### *Ejemplo 24B: Tigeciclina*

[0223] Se agregó 9-cloroacetamidominociclina cruda (100 g) a 20 temperatura ambiente (25-28 °C) lentamente con agitación eficiente de 500 mL de t-butilamina en un recipiente de fondo redondeado de dos cuellos de 1 L ajustado con un agitador y termómetro. Se agregó yoduro de sodio (10 g) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 7.5 h. La 25 reacción se monitoreó mediante HPLC y cuando <2% el material de partida permaneció, 100 ml de metanol se agregaron y el disolvente se suprimió sobre un evaporador rotatorio a 40 °C. Al residuo se le agregó 420 mL de metanol y 680 mL de agua. La

solución se enfrió a 0-2 °C y se ajustó a un pH de 7.2 con HCl concentrado (91 ml) para dar un volumen de mezcla de reacción de 1300 mL. Este 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® lavado 5 (CG161cd) (860 g) a la solución y la mezcla se agitó durante 30 min., ajustando el pH a 4.0-4.2. La resina se filtró y la solución acuosa gastada se ensayó mediante HPLC para 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 10 agitó durante 15 min., ajustando el pH a 4.0-4.2. La resina se filtró y el filtrado se ensayó para el producto. La extracción de la resina se repitió 3 veces más con 4.8 L de 20% de metanol en agua. Todos los extractos de la resina y la solución acuosa gastada del anterior se agruparon y el pH se ajustó a 7.0-7.2 con 15 hidróxido de amonio 30%. La solución acuosa se extrajo con 6x2.8 L de cloruro de metileno, ajustando el pH a 7.0-7.2 entre extracciones. El extracto de cloruro de metileno agrupado se filtró a través de 250 g de sulfato de sodio anhidro, se concentró a 500 mL y se enfrió a 0-3 °C. Después el producto se 20 cristalizó, la suspensión se agitó durante 1 h a 0-3 °C. Los sólidos se filtraron, se lavaron con 2x50 mL de cloruro de metileno frío y se secaron a 40 °C bajo vacío para lograr 26 g del sólido.

25 *Ejemplo 24C: Monoclorhidrato de Tigeciclina*

[0224] Se disolvió tigeciclina (49 g, 0.084 moles) en forma de porciones en 500 mL de agua para inyección con agitación. La solución se filtró a través de un embudo de porosidad medio y se

lavó con 420 mL de agua par inyección. La solución se enfrió a 0-2 °C y 5.6 mL de HCl concentrado se agregaron gota a gota aunque mantiene la temperatura entre 0-2 °C. El pH inicial fue de 8.0 y el pH final fue de 6.0. La solución se liofilizó al congelar la muestra a -30 °C y se liofilizó a -15 °C. La temperatura de estante se elevó a 21 °C durante 2 h. El sólido resultante (49.6 g) se molió y se almacenó a 4-5 °C. Análisis Elemental: C (52.92% teoría, 51.75% encontrado); H(6.73% teoría, 6.75% encontrado); N(10.65% teoría, 10.32% encontrado); Cl(5.4% teoría, 5.5% encontrado).

### **Ejemplo Comparativo 25**

#### Monoclorhidrato de Tigeciclina

15

##### *Ejemplo 25A: 9-cloroacetamidominociclina*

[0225] Se enfrió cloruro de metileno (325 mL) a -5 a 0°C y se agregó clorhidrato de 9-Aminominociclina (100 g) en forma de porciones durante 10 min. Se agregó trietilamina (77.6 g) aunque mantiene la temperatura a -10 a -5 °C. Una solución de anhídrido cloroacético 97% (70 g) en cloruro de metileno (133 mL) se preparó al agitar a 20-25 °C y agregar a la mezcla de reacción de 45 min aunque mantiene la temperatura de mezcla a -10 a -2 °C. El recipiente que contiene la solución de anhídrido cloroacético se enjuagó con 31 mL de cloruro de metileno y el enjuague se agregó a la mezcla de reacción. Después de agitar durante 30 min., la reacción se evaluó mediante HPLC para determinar si la reacción estaba completa. Se agregó bicarbonato de sodio acuoso (185 mL,

25

0.05M) durante 30 min aunque mantiene la temperatura de la mezcla de reacción a 0 a 5 °C. Después de agitar durante 10 min., las capas se separaron y se agregó sulfato de sodio (15 g) a la capa orgánica. La mezcla se agitó durante 15 min a 0 a 5 °C y se  
5 filtró. La torta resultante se enjuaguó con cloruro de metileno (2 x 38 mL) y los filtrados combinados se transfirieron en 4.19 L de 10:1 heptano:isopropanol durante 20 min, seguido por 15 mL de enjuague de cloruro de metileno del recipiente de filtrado. La suspensión resultante se agitó durante 15 min., a 20 a 25 °C,  
10 luego se filtro. La torta fue Enjuagado con 680 mL de heptano:isopropanol en proporción 10:1 y secado durante 24 h a 37 hasta 40°C (5 a 10 mm de Hg). La pureza por porcentaje de área HPLC: 78.1.

#### 15 Ejemplo 25B: Tigeciclina

[0226] Se agrego 9-cloroacetamidominociclina (100 g) con agitación vigorosa a 483 mL de t-butilamina a entre 0-10°C en un frasco de fondo redondo con múltiples cuellos de 2 L con  
20 agitador, termómetro y condensador. Se agrego yoduro de sodio (16 g) y la mezcla de reacción fue agitada entre 33 a 38°C durante 4 h. La mezcla de reacción fue ensayada mediante HPLC para completarla, y luego se enfrió entre 5 a 10°C. Se agrego metanol (300 mL) durante 10 minutos, y luego la solución de reacción fue  
25 concentrada mediante destilación (10 a 17°C, 68 mm Hg) hasta 350 mL. Una segunda porción de metanol (600 mL) se agrego al concentrado, y la mezcla fue concentrada mediante destilación a 350 mL. Se agrego metanol (46 mL) y agua fría (565 mL) mientras

se mantenía la temperatura de reacción por debajo de 30°C. La solución fue enfriada entre 0 a 5°C y el pH ajustado a 4.0 con 100 mL de HCl 20°Be. La solución fue trasferida a un frasco con múltiples cuellos de 5 L con un enjuague de 500 mL de agua, y luego se diluyo con 1 L de agua. Después de agitar durante 1 h entre 0 a 5°C, se agrego resina Amberchrom® (CG161)<sup>3</sup> de lavado y la suspensión resultante fue agitada durante 30 min entre 20 a 25°C. La suspensión fue filtrada y el ponqué húmedo resultante fue agregado de 340 mL de una solución de agua:metanol en proporción de 5:1. El filtrado fue puesto a un lado. Después de agitar durante 30 minutos entre 20 a 25°C, la suspensión fue filtrada y el ponqué húmedo resultante fue agregado a una segunda porción de 340 mL de una solución de agua:metanol en una concentración de 5:1. Este segundo filtrado fue puesto aparte. Esta suspensión fue filtrada y el ponqué húmedo resultante fue agregado a una tercera porción de 340 mL de una solución de agua :metanol en una concentración de 5:1. Después de filtrar, el tercer filtrado fue combinado con el primero y segundo filtrados y se enfrió entre 0 a 5°C. El pH fue ajustado a 7,0 con 11 mL de hidróxido de amonio de 28%. La solución fue agitada entre 0 a 5°C durante 16 h, se ajusto el pH a 7,0 según fuera necesario, y entre 22 a 25°C durante 1 h se ajusto el pH a 7,0 según sea necesario. La solución acuosa fue extraída con cloruro de metileno (5x980 mL), se ajusto el pH a 7,0 por cada extracción.

---

<sup>3</sup> resina Amberchrom® (CG161M) de lavado fue preparada mediante agregar 183 g de resina Amberchrom® (CG161M) filtrada y homogenizada a 340 mL de una solución de agua :metanol en concentración de 5:1. Después de agitar durante 1h entre 22 a 25°C la suspensión fue filtrada para dar un ponqué húmedo que fue secado mediante succión. El ponqué húmedo fue agitado en 340 mL de una solución de agua :metanol 5.1 durante 1 h a 20°C, y luego filtrado. El proceso fue repetido una vez más para proporcionar la resina de lavado.

Las fases orgánicas combinadas fueron transferidas a un embudo de separación y la capa acuosa fue separada. La capa orgánica fue combinada con 100 g de sulfato de sodio y se agito durante 1 h entre 20 a 25°C. La suspensión fue filtrada a través de una almohadilla de celita y el ponqué fue enjuagado con 250 mL de cloruro de metileno. El filtrado fue concentrado por destilación (-5 a 5°C, 150 mm Hg) hasta 150 mL, y luego se enfrió a entre 0 a 5°C durante 1 h. La suspensión resultante fue filtrada y el ponqué fue lavado con cloruro de metileno entre 0 a 5°C (2x30 mL). El ponqué húmedo fue agitado en cloruro de metileno (335 mL) y metanol (37 mL) entre 26 a 32°C hasta que se obtuvo una solución. La solución fue filtrada a través de celita, se enjuago la celita con cloruro de metileno (2 x 15 mL), y se concentro mediante destilación (-5 a 5°C, 150 mm Hg) hasta 54 mL. El procedimiento de concentración fue repetido dos veces, primero agregando 335 mL de cloruro de metileno y reduciendo el volumen entre 55 a 70 mL, y luego agregando 254 mL de cloruro de metileno y reduciendo el volumen entre 90 a 105 mL. La suspensión resultante fue agitada durante 1 h entre 0 a 5°C, luego se filtro y se lavo con cloruro de metileno (2 x 25 mL) a 10°C. El sólido fue secado entre 35 a 40°C durante 16 h, luego entre 45 a 50°C durante 27 h. La pureza mediante el porcentaje de área HPLC:97.7%, epímero C-4 1.23%.

## **PURIFICACIÓN**

### **Ejemplo 1**

#### **Tigeciclina**

[0227] Una mezcla de tigeciclina cruda (110.0 g) y acetato de metilo (1.65 L) se agito y se calentó entre 30 a 35°C, y se agrego metanol (550 mL) durante 15 minutos. Después de mantener  
5 entre 30 a 35°C, la solución caliente fue filtrada sobre tierra infusorial (36 g) y el ponqué fue lavado con acetato de metilo (2 x 106 g). El filtrado fue concentrado mediante destilación (20°C, 150 mm Hg) hasta 550 mL. Se agrego acetato de metilo (1.1 L) y la suspensión resultante fue concentrada mediante destilación (20°C,  
10 150 mm Hg) hasta 550 mL. Esta etapa fue repetida, y luego el concentrado fue enfriado entre 0 a 4°C durante 1 h. El sólido resultante fue recolectado mediante filtración y se lavo con acetato de metilo (2x150 mL) entre 0 a 5°C. El sólido fue secado bajo vacío (65 a 70°C, 10 mm Hg) durante 100 h para proporcionar  
15 98.0 g (rendimiento de 89.1%) del producto deseado. La pureza mediante el porcentaje de área HPLC: 98.8% y epímero C-4 0.55%.

### Ejemplo 2

#### Tigeciclina

20

[0228] Se agrego una porción amplia de 9-aminominciclina•HCl (140.0 g) ha 840 mL de agua entre 0 a 4°C. Se agrego hidroccloruro de cloruro de ácido t-butilglicina (154 g) durante 15 minutos con buena agitación mientras se mantuvo la temperatura entre 0 a 4°C.  
25 La solución fue agitada durante 1 a 3 h. El pH de la mezcla fue ajustado a 7,2±0.2 con 30% de hidróxido de amonio mientras se mantuvo la temperatura entre 0 a 10°C. Se agregaron Metanol (930 mL) y 840 mL de cloruro de metileno a la solución, la cual fue

agitada durante 1 h entre 20 a 25°C. Las fases fueron separadas. La fase acuosa fue extraída con 3x600 mL de cloruro de metileno, y las fases orgánicas fueron combinadas, secadas, y concentradas a un volumen de aproximadamente 500 mL. La suspensión resultante fue enfriada entre 0 a 2°C durante 1 h. El sólido fue filtrado y secado para proporcionar 120 g de producto (rendimiento 75%). La pureza por porcentaje de área HPLC:98%, epímero C-4 0.1%. MS(FAB): m/z 586 (M+H); 585 (M<sup>+</sup>).

10

### Ejemplo 3

#### Tigeciclina

[0229] La tigeciclina (15.00 g) preparada según se describió en el Ejemplo 2 fue agregada a 113 mL de acetona y 113 mL de metanol. La suspensión fue agitada entre 20 a 25°C durante 1 h, y luego enfriada entre 0 a 2°C. Después de agitar durante 1 h, la suspensión fue filtrada y lavada para proporcionar 12.55 g de producto (rendimiento 83.7%). Pureza mediante porcentaje de área HPLC >99%, epímero C-4 0.4%.

20

### Ejemplo 4

#### Tigeciclina

[0230] La tigeciclina (105 g) preparada según se describió en el Ejemplo 2 fue agregada a 800 mL de acetona y 800 mL de metanol. La suspensión fue agitada y se calentó entre 30 a 35°C durante 15 minutos, y luego se enfrió entre 20 a 25°C. Después de mantenerla entre 20 a 25°C durante 1 h, la suspensión fue enfriada entre 0 a

4°C y se mantuvo durante 1 h. El sólido fue filtrado, lavado y secado para proporcionar 83 g de producto (rendimiento 79%). La pureza mediante el porcentaje de área HPLC: >99%, epímero C-4: 0.4%.

5

### Ejemplo 5

#### Tigeciclina

[0231] A un frasco de múltiples cuellos de 1 L, equipado con  
10 agitador mecánico y protección de nitrógeno, se agrego 94.3 g de  
tigeciclina cruda húmeda, <sup>4</sup>metanol (305 g, 386 mL), y acetona  
(291 g, 368 mL). La mezcla fue agitada entre 16 a 23°C durante 4  
horas. La suspensión fue filtrada en un embudo Büchner de 9 cm  
con papel #1 Whatman. El ponqué húmedo fue lavado con metanol (87  
15 g, 110 mL) entre 20 a 25°C. El ponqué húmedo fue secado con  
succión y con protección de nitrógeno durante 0.1 h. El ponqué  
húmedo (75.3 g) fue transferido de nuevo al frasco de múltiples  
cuellos de 1 L y una solución de metanol (233 g, 295 mL) y  
acetona (244 g, 309 mL) se agrego. La suspensión fue agitada  
20 entre el 15 a 20°C durante 5.5 horas. La suspensión fue filtrada  
en un embudo Büchner de 9 cm con papel #1 Whatman. El ponqué  
húmedo fue lavado con metanol (70 g, 88 mL) entre 18 a 24°C. El  
ponqué húmedo fue secado con succión y protección con nitrógeno  
durante 0.1 h. El ponqué húmedo (59.0 g) fue transferido de nuevo  
25 al frasco de múltiples cuellos de 1 L y una solución de metanol  
(195 g, 247 mL) y acetona (187 g, 236 mL). La suspensión fue

---

<sup>4</sup> La tigeciclina cruda fue preparada a partir de la minociclina•HCl obtenida del proveedor Interchem.

agitada entre 18 a 24°C durante 3 horas. La suspensión fue filtrada en un embudo Büchner de 9 cm con papel #1 Whatman. El ponqué húmedo fue lavado con metanol (55 g, 70 mL) entre 20 a 25°C. El ponqué húmedo fue secado con succión y protección de nitrógeno durante 0.1 h. El ponqué húmedo (48.9 g) fue muestreado para un análisis de cromatografía líquida a alta presión (HPLC) (impurezas totales =0.62%, minociclina =0.17%, epímero C-4=0.35%, otras impurezas únicas más grandes =0.05%).

[0232] El ponqué húmedo (48.9 g) fue transferido a un frasco de múltiples cuellos de 2 L con una instalación de destilación por vacío. Al ponqué húmedo se le agrego una solución premezclada de metanol (90 g, 114 mL) y diclorometano (1,023 g, 772 mL). La suspensión fue agitada entre 15 a 20°C para obtener una solución roja. La solución fue destilada hasta 160 mL entre 13 a 17°C con un vacío de 330 mmHg durante 0.8h para proporcionar una suspensión naranja. Al frasco de 2 L se agrego diclorometano (818 g, 617 mL) y la suspensión fue redestilada hasta 183 mL entre 6 a 13°C con un vacío de 817 mm de Hg durante 0.7 h. Se agrego diclorometano (635 g, 479 mL) y la suspensión fue redestilada hasta 183 mL entre 6 a 7°C con un vacío de 817 mm de Hg durante 0.6 horas. La suspensión naranja resultante fue enfriada entre 0 a 5°C y mantenida entre 0 a 5°C, con agitación, durante 2 horas. La suspensión fue filtrada en un embudo Büchner de 7 cm con papel #1 Whatman. El ponqué húmedo fue lavado con dos porciones de 69 g (52 mL) de diclorometano a 0°C. El ponqué húmedo fue secado con succión, bajo protección con nitrógeno, durante 5 min. Una muestra del ponqué húmedo (48,7 g) fue sometida a análisis HPLC

(impurezas totales = 0.49%, minociclina= 0.12%, epímero C-4 =0.32%, otras impurezas =0%.) El ponqué húmedo fue entonces secado a 25°C con un vacío <10 mmHg durante 57,5 horas con un nivel de diclorometano de 2.2%, dando 32.3 g de tigeciclina 5 (rendimiento 34.2%).

[0233] Este procedimiento fue seguido usando Tigeciclina cruda que había sido preparada a partir de la Minociclina•HCl obtenida de los proveedores Hovione y Nippon Kayaku. Una comparación de 10 las impurezas presentes en la tigeciclina obtenida del proceso anterior usando cada fuente de material de partida de Minociclina•HCl se da en las tablas 1 y 2. Estas tablas indican que el proceso suministra un buen rendimiento de Tigeciclina con un bajo nivel de impurezas.

15

TABLA 1

| Fuente de Minociclina•H Cl | Etapas de procesamiento de Tigeciclina | (%) de impurezas totales en la Tigeciclina final | Minociclina•H Cl recuperada (%) | Epímero C-4 en la Tigeciclina final (%) |
|----------------------------|----------------------------------------|--------------------------------------------------|---------------------------------|-----------------------------------------|
| Nippon Kayaku Crudo        | Crudo                                  | 0.71                                             | 0.33                            | 0.26                                    |
| Nippon Kayaku Purificado   | Purificado                             | 0.26                                             | 0.13                            | 0.13                                    |
| Interchem Crudo            | Crudo                                  | 0.66                                             | 0.17                            | 0.29                                    |
| Fuente de Minociclina•H Cl | Etapas de procesamiento de Tigeciclina | (%) de impurezas totales en la Tigeciclina final | Minociclina•H Cl recuperada (%) | Epímero C-4 en la Tigeciclina final (%) |

238

|                         |            |                               |      |            |
|-------------------------|------------|-------------------------------|------|------------|
|                         |            | <b>Tigeciclin<br/>a final</b> |      | <b>(%)</b> |
| Interchem<br>purificado | Purificado | 0.38                          | 0.10 | 0.15       |
| Hovione crudo           | Crudo      | 0.64                          | 0.18 | 0.32       |
| Hovione<br>purificado   | Purificado | 0.39                          | 0.13 | 0.14       |

5

TABLA 2

| Ensayo                                | Nippon Kayaku    | Interchem        | Hovione          |
|---------------------------------------|------------------|------------------|------------------|
| Descripción                           | Polvo<br>naranja | Polvo<br>naranja | Polvo<br>naranja |
| Rendimiento<br>(g)                    | 28.5             | 32.3             | 36.4             |
| Resistencia<br>(%) <sup>1</sup>       | 100              | 99.6             | 99.6             |
| Impurezas<br>totales (%) <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]      |
| Minociclina<br>(%)                    | 0.13             | 0.10             | 0.13             |
| Epímero (%)                           | 0.13             | 0.15             | 0.14             |
| Diclorometano<br>(%)                  | 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<br>Isopropilo (%)             | 0.002            | Brl <sup>7</sup> | Brl              |
| Tolueno (ppm)                         | Brl <sup>8</sup> | Brl              | Brl              |
| N,N-dimetil-<br>formamida<br>(ppm)    | Brl <sup>9</sup> | Brl              | Brl              |
| Agua (KF, %)                          | 1.32             | 0.72             | 0.51             |
| Residuo en la<br>ignición (%)         | 0.039            | 0.005            | 0.014            |
| IR                                    | Positivo         | Positivo         | Positivo         |

|                                                           |             |             |             |
|-----------------------------------------------------------|-------------|-------------|-------------|
| Rotación<br>especifica <sup>1</sup><br>(°)                | -219.4      | -213.4      | -218.7      |
| Critalinidad                                              | Se conforma | Se conforma | Se conforma |
| Rendimiento<br>(%)                                        | 21          | 26          | 24          |
| Rendimiento<br>(corregido,<br>%) <sup>10</sup>            | 24          | 30          | 27          |
| Rendimiento de<br>Mino (%)                                | 10          | 12          | 13          |
| Rendimiento de<br>Mino<br>(corregido,<br>%) <sup>10</sup> | 11          | 13          | 14          |

1. En una base anhidrosa, libre de disolvente. 2. Excluyendo el epímero. 3. Impureza única más grande (LSI) excluyendo epímero C-4 y minociclina. Tiempo de retención relativa (RRT) relativo al GAR-936. 4. brl: límite de informe inferior, 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. Corregido en cuanto a la resistencia del material de partida y del producto.

10

**Ejemplo 6**

Tigeciclina

[0234] El ponqué húmedo de tigeciclina cruda (72.5 kg, 38.2 kg en peso seco<sup>5</sup>) fue agitado y suspendido en 191 kg (5 partes) de acetona y 191 kg (5 partes) de metanol. La suspensión fue entonces calentada entre 30 a 36°C, enfriada inmediatamente entre 19 a 25°C, y mantenida entre 19 a 25°C durante dos horas. La suspensión fue entonces enfriada entre 0 a 6°C, y mantenida entre 0 a 6°C durante 1 hora. Después de filtrar y lavar con 2x34 kg (0.9 partes) de acetona/metanol (1:1), el ponqué húmedo fue

<sup>5</sup> El peso seco calculado de la pérdida en datos en seco.

entonces ensayado en cuanto a minociclina (0.23%), 9-aminominociclina (0%), y en cuanto a la impureza única más grande diferente al epímero C-4 (0.09%). El contenido de epímero C-4 fue de 1.12%. Con base en los datos analíticos una resuspensión  
5 adicional no fue llevada a cabo. Al ponqué húmedo se le agrego 440 kg (11.5 partes) de cloruro de metileno y 39.3 kg (1.0 partes) de metanol y la mezcla fue calentada entre 30 a 36°C para su disolución. La solución de tanda fue filtrada mediante pirógeno de 0.3 micrones reduciendo a filtros de clarificación de  
10 0.2 micrones. Tres destilaciones en vacío fueron entonces llevadas a cabo para remover el metanol, con marcos de cloruro de metileno (440 kg y 339 kg, respectivamente) antes de la segunda y tercera destilaciones. El nivel de metanol residual fue de 0.3%. la tanda fue enfriada entre 0 a 6°C y se agito durante 1 hora. La  
15 tanda fue filtrada, lavada por 2x42.1 kg (1.1 partes) de cloruro de metileno pre enfriado (-13 a -7°C) y secado a no más de 60°C hasta una perdida en el secado <2.5%. El material fue molido para dar 22.3 kg de tigeciclina (rendimiento 58%). La pureza por porcentaje de área HPLC: 98.2%, epímero C-4:1.55%, Minociclina  
20 0.1%, 9-aminominociclina 0%, otra impureza más grande única =0.08%.

### Ejemplo 7

#### Tigeciclina

25

[0235] El ponqué de tigeciclina cruda (103.5 kg, 53.4 kg peso seco<sup>6</sup>) fue agitado y suspendido en 191 kg (5.1 partes) de acetona

---

<sup>6</sup> Peso en seco calculado de la perdida en los datos en seco.

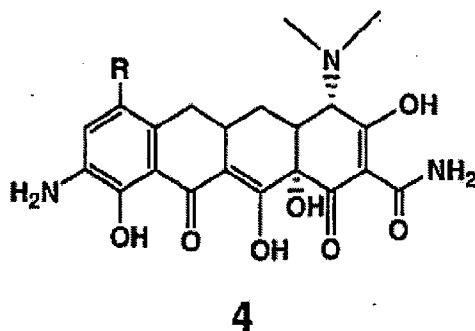
y 191 kg (5.1 partes) de metanol. La suspensión fue entonces calentada entre 30 a 36°C, y enfriada inmediatamente entre 19 a 25°C, y mantenida entre 19 a 25°C durante dos horas. La suspensión fue entonces enfriada entre 0 a 6°C y mantenida entre 0 a 6°C durante 1 hora. Después de filtrar y lavar con 2 x 34 kg (0.9 partes) de acetona/metanol (1:1), el ponqué húmedo fue entonces ensayado en cuanto a contenidos de minociclina (0.12%), 9-aminominociclina (0%), y e impurezas únicas más grandes diferentes a epímero C-4 (0.13%). El contenido de epímero C-4 fue de 0.37%. Con base en los datos analíticos, una resuspensión adicional no fue llevada a cabo. Al ponqué húmedo se le agregaron 440 kg (11.7 partes) de cloruro de metileno y 55.7 kg (1.0 partes) de metanol y la mezcla fue calentada entre 30 a 36°C para su disolución. La solución de la tanda fue filtrada mediante reducir con pirógeno de 0.3 micrones y filtros de clarificación de 0.2 micrones. Tres destilaciones en vacío fueron llevadas a cabo entonces para remover el metanol, con marcos de cloruro de metileno (624 kg y 481 kg, respectivamente) antes de la segunda y tercera destilaciones. El nivel de metanol residual fue de 1.07%. La tanda fue enfriada entre 0 a 6°C y se agito durante 1 hora. La tanda fue filtrada, lavada con 3x59,7kg (1.1 partes cada una) de cloruro de metileno pre enfriado (-13 a -7°C) y secado a no más de 60°C hasta una perdida en el secado <2.5%. El material fue molido para dar 31.7 kg de Tigeciclina en una primera tanda. Una segunda tanda consistió del producto residual en el cristalizador suministrando 2.5 kg adicionales. Ambas tandas representan un rendimiento del 64% de Tigeciclina cruda.

[0236] Aunque la invención ha sido descrita mediante la discusión de las modalidades de la invención y ejemplos no limitativos de ella, una persona versada en la técnica puede, luego de leer la especificación y las reivindicaciones, visualizar otras 5 modalidades y variaciones que también están dentro del alcance propuesto de la invención y por lo tanto el alcance de la invención solo debe ser construido y definido por el alcance de las reivindicaciones adjuntas.

10

LO QUE SE REIVINDICA ES:

1. Un método para preparar por lo menos un compuesto de  
Fórmula 4,



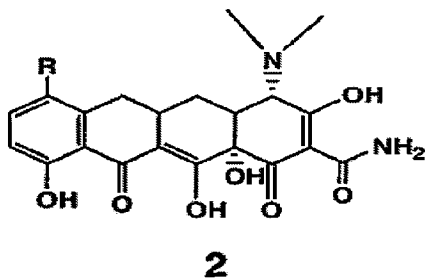
10 o una sal de este,

En donde  $R = -NR_3R_4$ , en donde  $R_3$  y  $R_4$  son cada uno  
independientemente escogidos entre hidrógeno, y alquilo  
con 1 a 4 carbonos de cadena recta o ramificada,

15

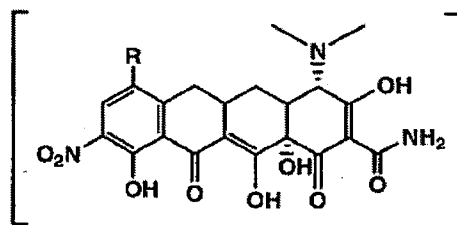
Comprende:

Combinar por lo menos un agente de reducción con una mezcla  
en suspensión de reacción que comprende un intermedio  
20 preparado de una reacción entre por lo menos un agente de  
nitración y por lo menos un compuesto de la Fórmula 2,



o una sal de este.

2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el intermedio es un compuesto de la Fórmula 3 o una sal de este.



3

3. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde el por lo menos un agente de reducción se suministra en la presencia de por lo menos un catalizador.
4. El método de acuerdo con la reivindicación 3, en donde el por lo menos un catalizador es escogido entre óxidos de metal de tierras raras, Catalizadores que contienen metal del grupo VIII, y catalizadores que contienen sales de metal del grupo VIII.
5. El método de acuerdo con la reivindicación 4, en donde el por lo menos un catalizador es escogido entre Catalizadores que contienen metal del grupo VIII.
6. El método de acuerdo con la reivindicación 5, en donde el catalizador que contiene metal del grupo VIII comprende paladio.

7. El método de acuerdo con la reivindicación 6, en donde el catalizador que contiene metal del grupo VIII es paladio sobre carbón.

5 8. El método de acuerdo con la reivindicación 7, en donde el paladio sobre carbón está en forma húmeda.

10 9. El método de acuerdo con la reivindicación 7 o la reivindicación 8, en donde el catalizador de paladio sobre carbón está presente en una cantidad que varía entre 0.1 partes a 1 parte, con relación a la cantidad del por lo menos un compuesto de la Fórmula 2 presente antes de la reacción con el por lo menos un agente de nitración.

15 10. El método de acuerdo con una cualquiera de la reivindicaciones 1 a 9, en donde el por lo menos un agente de reducción es hidrógeno.

20 11. El método de acuerdo con la reivindicación 10, en donde el hidrógeno se suministra a una presión que varía entre 1 a 75 psi.

25 12. El método de acuerdo con la reivindicación 10, en donde el hidrógeno se suministra a una presión que varía entre 1 a 50 psi.

13. El método de acuerdo con una cualquiera de la reivindicaciones 1 a 12, en donde antes de combinar, la mezcla de reacción se combina con un disolvente comprende por lo menos un alcohol que tiene 1 a 8 carbonos.

5

14. El método de acuerdo con la reivindicación 13, en donde el por lo menos un alcohol que tiene 1 a 8 carbonos es escogido entre metanol y etanol.

10 15. El método de acuerdo con una cualquiera de la reivindicaciones 1 a 14, en donde el combinar se lleva a cabo a una temperatura que varía entre 0°C a 50°C.

15 16. El método de acuerdo con la reivindicación 15, en donde el combinar se lleva a cabo a una temperatura que varía entre 20°C a 40°C.

20 17. El método de acuerdo con la reivindicación 16, en donde el combinar se lleva a cabo a una temperatura que varía entre 26°C a 28°C.

25 18. El método de acuerdo con una cualquiera de la reivindicaciones 1 a 17, en donde el por lo menos un agente de nitración es escogido entre sales de nitrato y ácido nítrico.

19. El método de acuerdo con una cualquiera de la reivindicaciones 1 a 18, en donde el por lo menos un

compuesto de la Fórmula **2** es una sal escogida entre sales clorhídricas, bromhídricas, yodhídricas, fosfóricas, nítricas, sulfúricas, acéticas, benzoicas, cítricas, de cisteína, fumáricas, glicólicas, maléicas, succínicas, tartáricas, sulfatos, y clorobencenosulfonatos.

20. El método de acuerdo con una cualquiera de la reivindicaciones 1 a 19, en donde después de combinar, la mezcla de reacción contiene el por lo menos un compuesto de la Fórmula **2** en una cantidad menor a 2% según se determinó por cromatografía líquida de alto rendimiento.

21. El método de acuerdo con una cualquiera de la reivindicaciones 1 a 19, en donde después de combinar, la mezcla de reacción contiene el por lo menos un compuesto de la Fórmula **2** en una cantidad menor a 1% según se determinó por cromatografía líquida de alto rendimiento.

22. El método de acuerdo con una cualquiera de la reivindicaciones 1 a 21, en donde después de combinar, la mezcla de reacción se agrega a un sistema disolvente que comprende a un alcohol de cadena ramificada con 1 a 8 carbonos y un hidrocarburo con 1 a 8 carbonos.

23. El método de acuerdo con la reivindicación 22, en donde el alcohol de cadena ramificada con 1 a 8 carbonos es isopropanol.

24. El método de acuerdo con la reivindicación 22 o la reivindicación 23, en donde el hidrocarburo con 1 a 8 carbonos es escogidos entre hexano, heptano, y octano.
- 5 25. El método de acuerdo con una cualquiera de la reivindicaciones 22 a 24, en donde después de combinar, la mezcla de reacción se agrega al sistema disolvente a una temperatura que varía entre 0°C a 50°C.
- 10 26. El método de acuerdo con una cualquiera de la reivindicaciones 22 a 24, en donde después de combinar, la mezcla de reacción se agrega al sistema disolvente a una temperatura que varía entre 0°C a 10°C.
- 15 27. El método de acuerdo con una cualquiera de la reivindicaciones 1 a 26, que comprende adicionalmente aislar el por lo menos un compuesto de la Fórmula 4 como una composición sólida.
- 20 28. El método de acuerdo con la reivindicación 27, en donde el por lo menos un compuesto de la Fórmula 4 se aísla como una sal.
- 25 29. El método de acuerdo con la reivindicación 28, en donde el por lo menos un compuesto de la Fórmula 4 se aísla como una sal en la presencia de sulfito de sodio.

30. El método de acuerdo con una cualquiera de la reivindicaciones 27 a 29, en donde la composición sólida contiene un epímero C<sub>4</sub> de Fórmula **4** en una cantidad menor a 10% según se determinó por cromatografía líquida de alto rendimiento.

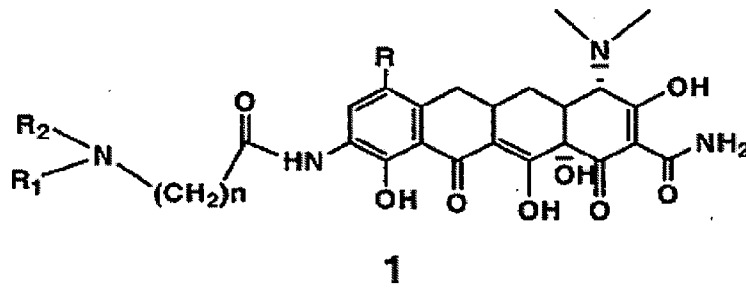
31. El método de acuerdo con la reivindicación 30, en donde la composición sólida contiene un epímero C<sub>4</sub> de Fórmula **4** en una cantidad menor a 1% según se determinó por cromatografía líquida de alto rendimiento.

32. El método de acuerdo con la reivindicación 30, en donde la composición sólida contiene un epímero C<sub>4</sub> de Fórmula **4** en una cantidad menor a 0.5% según se determinó por cromatografía líquida de alto rendimiento.

33. El método de acuerdo con una cualquiera de la reivindicaciones 27 a 32, en donde la composición sólida contiene el por lo menos un compuesto de la Fórmula **2** en una cantidad menor a 2% según se determinó por cromatografía líquida de alto rendimiento.

34. El método de acuerdo con una cualquiera de la reivindicaciones 1 a 33, en donde el por lo menos un compuesto de la Fórmula **2** está presente en la mezcla de reacción en una cantidad de por lo menos 1 gramo.

35. Un método para preparar por lo menos un compuesto de la  
Fórmula 1,

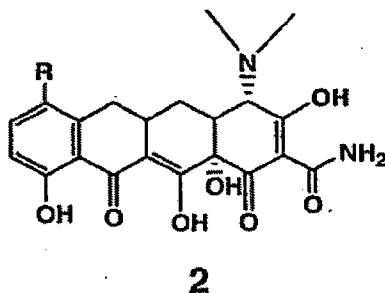


o una sal farmacéuticamente aceptable de este,

en donde  $R_1$  y  $R_2$  son cada uno independientemente escogidos  
entre hidrógeno, alquilo con 1 a 6 carbonos de cadena  
recta y ramificada, y cicloalquilo, o  $R_1$  y  $R_2$ , juntos con  
N, forman un heterociclo; R es  $-NR_3R_4$ , en donde  $R_3$  y  $R_4$   
son cada uno independientemente escogidos entre  
hidrógeno, y alquilo con 1 a 4 carbonos de cadena recta o  
ramificada; y n varía entre 1-4,

Comprende:

(a) combinar por lo menos un agente de reducción con una  
mezcla en suspensión de reacción comprende un intermedio  
preparado de una reacción entre por lo menos un agente de  
nitración y por lo menos un compuesto de la Fórmula 2,



o una sal de este, para formar un segundo intermedio; y

(b) hacer reaccionar adicionalmente el segundo intermedio en la mezcla de reacción para preparar el por lo menos un compuesto de la Fórmula 1.

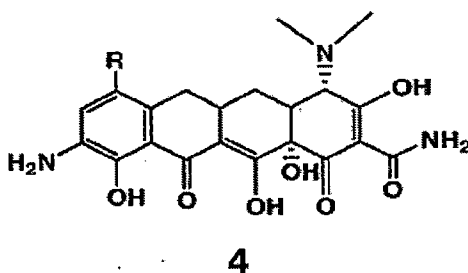
5

36. El método de acuerdo con la reivindicación 35, en donde  $R_1$  es hidrógeno,  $R_2$  es t-butilo,  $R_3$  es metilo,  $R_4$  es metilo, y n es 1.

10 37. El método de acuerdo con la reivindicación 35, en donde el por lo menos un compuesto de la Fórmula 1 es tigeciclina.

15 38. El método de acuerdo con la reivindicación 35, en donde el por lo menos un compuesto de la Fórmula 1 es hidrocloreuro de tigeciclina.

20 39. El método de acuerdo con una cualquiera de la reivindicaciones 33 a 38, en donde el segundo intermedio en la suspensión es por lo menos un compuesto de la Fórmula 4,



25

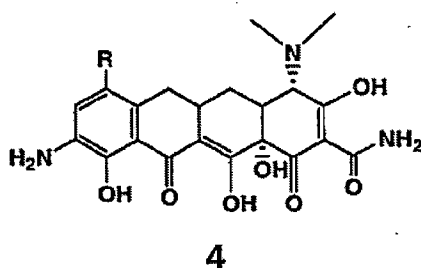
o una sal de este.

40. El método de acuerdo con una cualquiera de la reivindicaciones 35 a 39, en donde el hacer reaccionar adicionalmente en (b) comprende asilar el segundo intermedio.

5

41. El método de acuerdo con la reivindicación 40, en donde antes de la acilación, el segundo intermedio se aísla como una sal.

10 42. Un método para preparar por lo menos un compuesto de la Fórmula 4 o una sal de este,



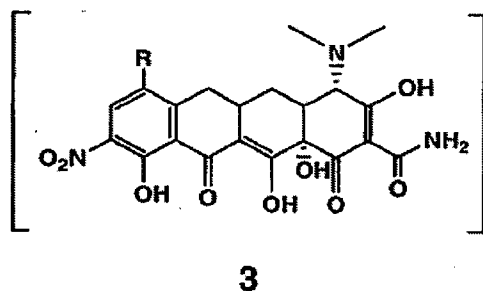
15

en donde  $R = -NR_3R_4$ , en donde  $R_3$  y  $R_4$  son cada uno independientemente escogidos entre hidrógeno, y un alquilo con 1 a 4 carbonos de cadena recta o ramificada,

20

comprende:

reducir un intermedio de Fórmula 3 o una sal de este,

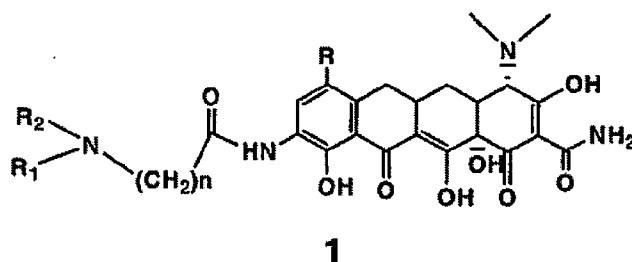


25

en donde el intermedio de Fórmula 3 está presente en una mezcla en suspensión de reacción.

43. El método de acuerdo con la reivindicación 42, en donde la reducción comprende combinar por lo menos un agente de reducción con la mezcla de reacción.

44. Un método para preparar por lo menos un compuesto de la Fórmula 1,

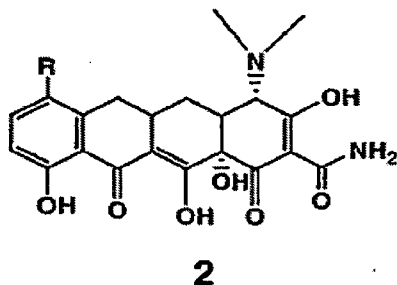


o una sal farmacéuticamente aceptable de este,

en donde  $R_1$  y  $R_2$  son cada uno independientemente escogidos entre hidrógeno, un alquilo con 1 a 4 carbonos de cadena recta o ramificada, y cicloalquilo, o  $R_1$  y  $R_2$ , juntos con N, forman un heterociclo; R es  $-NR_3R_4$ , en donde  $R_3$  y  $R_4$  son cada uno independientemente escogidos entre hidrógeno, y alquilo con 1 a 4 carbonos de cadena recta o ramificada; y n varía entre 1-4,

Comprende:

- (a) hacer reaccionar por lo menos un agente de nitración con por lo menos un compuesto de la Fórmula 2 o una sal de este para preparar una mezcla de reacción,



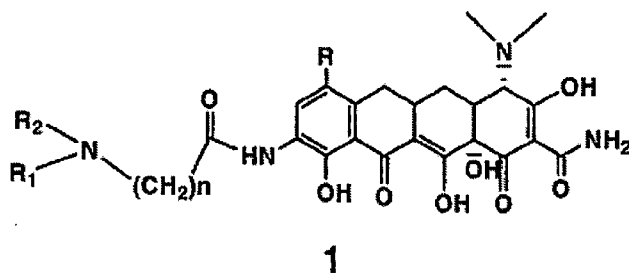
- 10 (b) sin aislar ninguno de los sólidos de la mezcla de reacción, combinar por lo menos un agente de reducción con la mezcla de reacción para preparar un intermedio; y
- (c) preparar el por lo menos un compuesto de la Fórmula 1 a partir del intermedio.

- 15 45. El método de acuerdo con la reivindicación 44, en donde  $R_1$  es hidrógeno,  $R_2$  es t-butilo,  $R_3$  es metilo,  $R_4$  es metilo, y n es 1.

- 20 46. El método de acuerdo con la reivindicación 44, en donde el por lo menos un compuesto de la Fórmula 1 es tigeciclina.

- 25 47. El método de acuerdo con la reivindicación 46, en donde el por lo menos un compuesto de la Fórmula 1 es hidrocloreuro de tigeciclina.

48. Un método para preparar por lo menos un compuesto de la  
Fórmula 1,

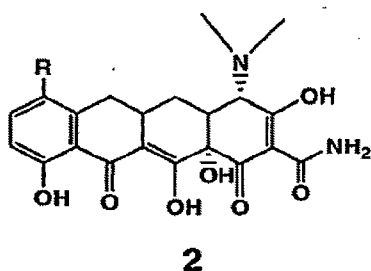


o una sal farmacéuticamente aceptable de este,

en donde  $R_1$  y  $R_2$  son cada uno independientemente escogidos  
entre hidrógeno, un alquilo con 1 a 4 carbonos de cadena  
recta o ramificada, y cicloalquilo, o  $R_1$  y  $R_2$ , juntos con  
N, forman un heterociclo; R es  $-NR_3R_4$ , en donde  $R_3$  y  $R_4$   
son cada uno independientemente escogidos entre  
hidrógeno, y alquilo con 1 a 4 carbonos de cadena recta o  
ramificada; y n varía entre 1-4,

comprende:

(a) combinar por lo menos un catalizador que contiene metal  
del grupo VIII en la presencia de hidrógeno con una  
mezcla en suspensión de reacción preparado de una  
reacción entre por lo menos un agente de nitración y por  
lo menos un compuesto de la Fórmula 2 o una sal de este,



en donde el por lo menos un catalizador que contiene metal del grupo VIII está presente en una cantidad que varía entre 0.1 partes a 1 parte con relación a la cantidad del por lo menos un compuesto de la Fórmula **2** presente antes de la reacción con el por lo menos un agente de nitración.

49. El método de acuerdo con la reivindicación 48, en donde  $R_1$  es hidrógeno,  $R_2$  es t-butilo,  $R_3$  es metilo,  $R_4$  es metilo, y  $n$  es 1.

50. El método de acuerdo con la reivindicación 48, en donde el por lo menos un compuesto de la Fórmula 1 es tigeciclina.

51. El método de acuerdo con la reivindicación 50, en donde el por lo menos un compuesto de la Fórmula 1 es hidrocloreuro de tigeciclina.

52. Un compuesto o una sal de este preparado por el método de acuerdo con una cualquiera de la reivindicaciones 1 a 51.

53. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 52, en donde  $R_1$  es hidrógeno,  $R_2$  es t- butilo,  $R_3$  es metilo,  $R_4$  es metilo, y  $n$  es 1.

54. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 53, en donde el por lo menos un compuesto de la Fórmula 1 es tigeclina.

55. Una composición que comprende un compuesto o una sal de este preparado por el método de acuerdo con una cualquiera de la reivindicaciones 1 a 51.

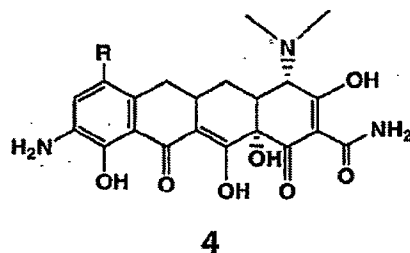
56. La composición de acuerdo con la reivindicación 55, que comprende adicionalmente por lo menos un portador farmacéuticamente aceptable.

57. La composición de acuerdo con la reivindicación 56, en donde  $R_1$  es hidrógeno,  $R_2$  es t- butilo,  $R_3$  es metilo,  $R_4$  es metilo, y  $n$  es 1.

58. La composición de acuerdo con la reivindicación 57, en donde el por lo menos un compuesto de la Fórmula 1 es tigeclina.

59. Una composición comprende:

por lo menos un compuesto de la Fórmula 4,



o una sal de este,

en donde R es  $-NR_3R_4$ , en donde  $R_3$  y  $R_4$  son cada uno independientemente escogidos entre hidrógeno, y alquilo con 1 a 4 carbonos de cadena recta o ramificada, en donde un epímero  $C_4$  de Fórmula 4 está presente en una cantidad menor a 10%, según se determinó por cromatografía líquida de alto rendimiento.

60. La composición de acuerdo con la reivindicación 59, en donde  $R_1$  es hidrógeno,  $R_2$  es t-butilo,  $R_3$  es metilo,  $R_4$  es metilo, y n es 1.

**TIGECICLINA Y MÉTODOS PARA PREPARAR 9-AMINOMINOCICLINA**

**RESUMEN:** Se describen métodos para preparar y purificar  
5 tetraciclinas, tal como tigeciclina. También se describen  
composiciones de tetraciclina, tal como composiciones de  
tigeciclina, preparadas por estos métodos.

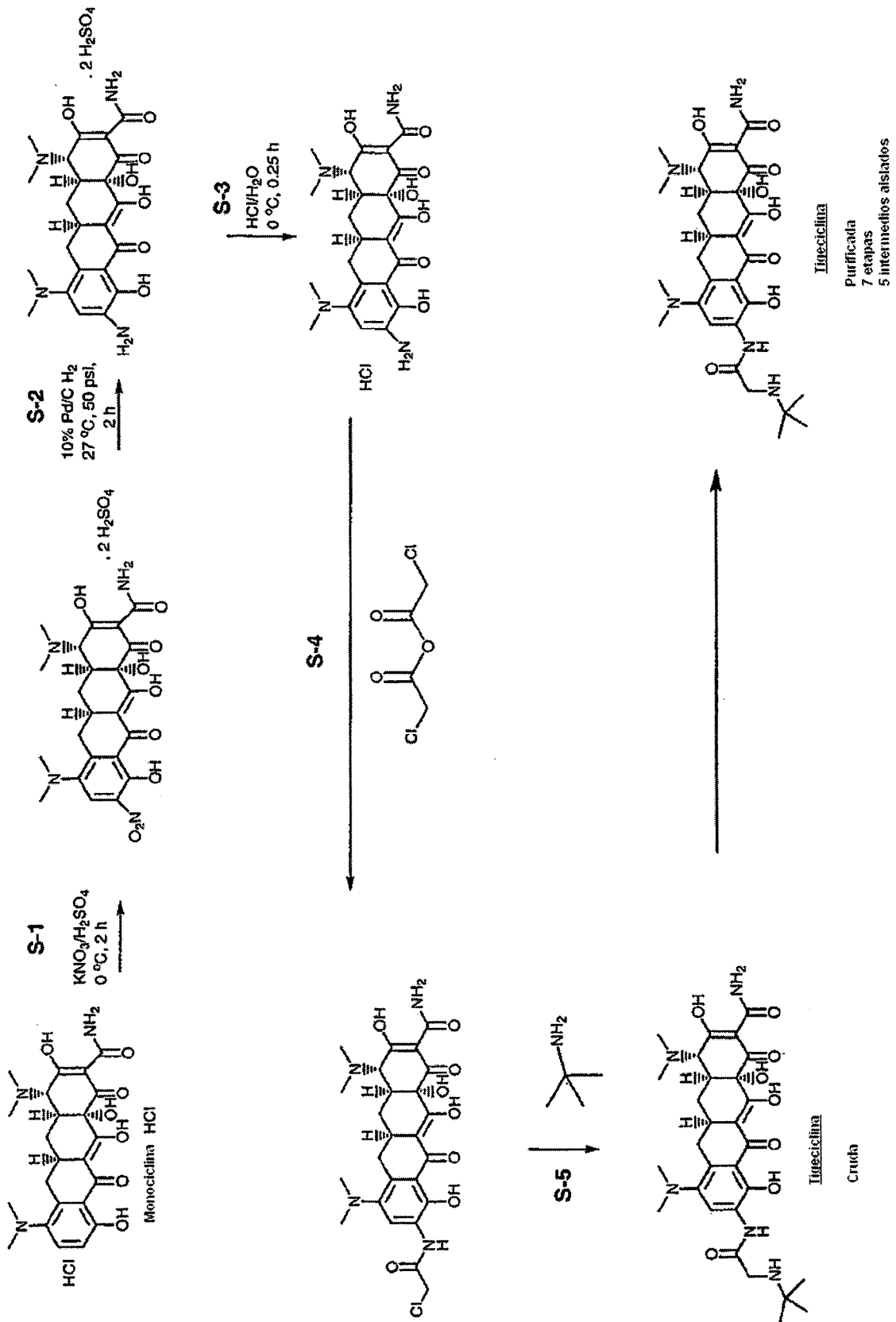


Fig. 1

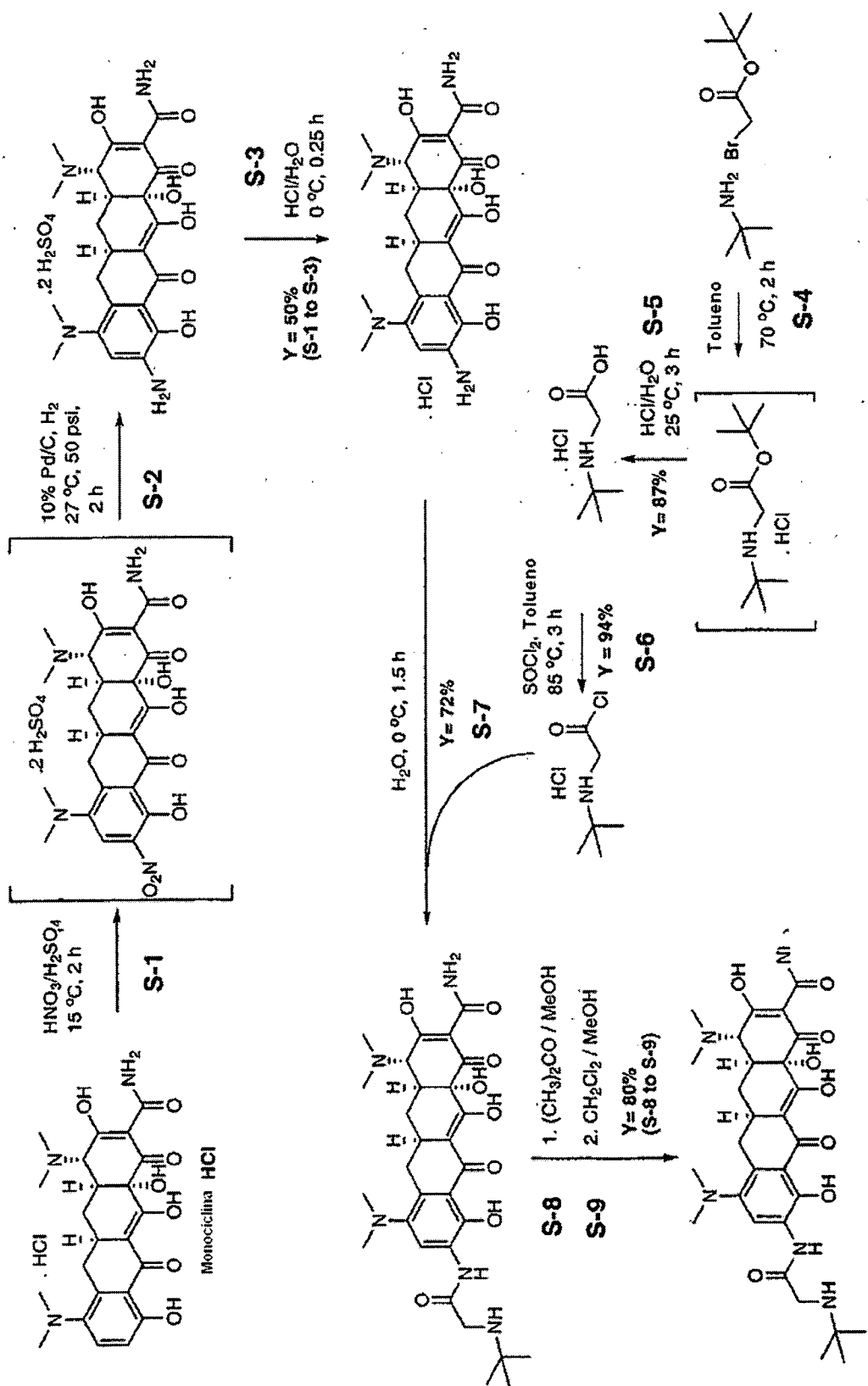


Fig. 2

Tigecyclina  
28% de rendimiento general  
9 etapas  
4 intermedios aislados



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 LLP  
901 New York Avenue  
Washington, DC 20001-4413  
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

|                                                                      |                                                                        |
|----------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------|
| Date of mailing (day/month/year)<br>01 September 2006 (01.09.2006)   |                                                                        |
| Applicant's or agent's file reference<br>1142-381-304                | IMPORTANT NOTIFICATION                                                 |
| International application No.<br>PCT/US2006/020536                   | 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 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<br>or PCT receiving Office | Date of receipt<br>of priority document |
|--------------------------|--------------------------|-------------------------------------------------------|-----------------------------------------|
| 27 May 2005 (27.05.2005) | 60/685,146               | 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 89 65

Telephone No. +41 22 338 97 20

Facsimile No. +41 22 338 82 70

Form PCT/IB/304 (October 2005)

1/CYXUQLA00

# PATENT COOPERATION TREATY

RDP Act GXP mcm  
20252

From the INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

## PCT

To:

FINNEGAN, HENDERSON, FARABOW,  
GARRETT & DUNNER, L.L.P.  
Attn. Mcdonell, 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  
(day/month/year)

07/11/2006

Applicant's or agent's file reference

1142.0381-304

**FOR FURTHER ACTION**

See paragraphs 1 and 4 below

International application No.

PCT/US2006/020536

International filing date  
(day/month/year)

25/05/2006

Applicant

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) 338.82.70

**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 **19 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 19 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. 5818 Patentlaan 2  
NL-2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Sandrine Parrichel

①

DKT  
npl

11/07/06

Form PCT/ISA/220 (October 2005)

(See notes on accompanying sheet)

Article 19 due: 01-07-07 Written Opinion due: 03-07-07 IDS due: 02-07-07

## PCT

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

|                                                        |                                                                                                  |                                                         |
|--------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|
| Applicant's or agent's file reference<br>1142.0381-304 | <b>FOR FURTHER ACTION</b><br>see Form PCT/ISA/220<br>as well as, where applicable, item 5 below. |                                                         |
| International application No.<br>PCT/US2006/020536     | International filing date (day/month/year)<br>25/05/2006                                         | (Earliest) Priority Date (day/month/year)<br>27/05/2005 |
| Applicant<br>WYETH                                     |                                                                                                  |                                                         |

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 4 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

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 PAS, CASTANER J: "GAR-936,<br>Tetracycline Antibiotic"<br>DRUGS OF THE FUTURE,<br>vol. 26, 2001, pages 851-858, XP002400050 | 52-60                 |
| A         | page 851, column 1, paragraph SYNTHESIS                                                                                            | 1-51                  |
| X         | US 5 675 030 A (KRISHNAN ET AL)<br>7 October 1997 (1997-10-07)                                                                     | 52-60                 |
| A         | the whole document                                                                                                                 | 1-51                  |
|           | -----<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                                                                                                                               | Date of mailing of the international search report |
| 20 October 2006                                                                                                                                                                         | 07/11/2006                                         |
| Name and mailing address of the ISA/<br>European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2<br>NL - 2280 HV Rijswijk<br>Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,<br>Fax: (+31-70) 340-3016 | Authorized officer<br><br>GRENOUILLAT, N           |

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                                                       | 1-60                  |
| A         | SUM P-E ET AL: "GLYCYLCYCLINES. 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 | 1-60                  |
| 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                                    | 1-60                  |

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

### Information on patent family members

International application No

PCT/US2006/020536

| Patent document<br>cited in search report | Publication<br>date | Patent family<br>member(s) | Publication<br>date |
|-------------------------------------------|---------------------|----------------------------|---------------------|
| US 5675030                                | A                   | 07-10-1997                 | NONE                |

## 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 latter 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.**

# PATENT COOPERATION TREATY

00259

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 below

International application No.

PCT/US2006/020536

International filing date (day/month/year)

25.05.2006

Priority date (day/month/year)

27.05.2005

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC

INV. C07C231/02 C07C237/26 A61K31/65 A61P31/00

Applicant

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 opinion

see form  
PCT/ISA/210

Authorized Officer

GRENOUILLAT, N

Telephone No. +49 89 2399-8914



**WRITTEN OPINION OF THE  
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.  
PCT/US2006/020536

**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:

**WRITTEN OPINION OF THE  
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.  
PCT/US2006/020536

---

**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 | 1-51  |
|                               | No: Claims  | 52-60 |
| Inventive step (IS)           | Yes: Claims | 1-51  |
|                               | No: Claims  | 52-60 |
| Industrial applicability (IA) | Yes: Claims | 1-60  |
|                               | No: Claims  |       |

2. Citations and explanations

**see separate sheet**

---

**Box No. VI Certain documents cited**

---

1. Certain published documents (Rules 43bis.1 and 70.10)

and / or

2. Non-written disclosures (Rules 43bis.1 and 70.9)

**see form 210**

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 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 52 to 60 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 52 to 54 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 and characterized (see D1 and D2), therefore the subject-matter of claims 55-60 is not new in the sense of Article 33(2) PCT.

2. The document D1 is regarded as being the closest prior art to the subject-matter of claim 1, 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,
- reduction of this 9-nitro derivative with  $\text{H}_2$  over Pd/C in 2-methoxyethanol/2N  $\text{H}_2\text{SO}_4$  to provide 9-aminominocycline,
- acylation of 9-aminominocycline 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.

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 expression "reaction mixture slurry" was considered to relate to a reaction mixture in which no compounds are isolated) .

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 derivates in a purer form and more specially contaminated with a less amount of the C4-epimer.

According to comparatives examples 1 and 2 using the method described in D1 (see pages 50-55 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 49 of this application), the isolated aminominocycline derivate (4) is contaminated with 0.9% of the C4-epimer.

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-aminominocyclines. Therefore the subject matter of claim 1 appears to be novel and inventive.

Claims 2-51 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, 35 and 44 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 and 35 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-nitrominocycline derivate (compound 3). Therefore the term "intermediate" using in claims 1 and 35 without precisising the nature of this intermediate, renders the scope of the claims broader than justified by the description.

Likewise claims 35 and 44 claim the formation of a second intermediate resulting of reaction of a reducing agent with the intermediate of formula 3. According to the description of the complete reaction scheme described in this application, the only intermediate formed seems to be the 9-aminomincycline derivate (compound 4). Therefore the term "intermediate" using in claims 35 and 44 without precisig the nature of this intermediate, renders the scope of the claims broader than justified by the description.

- 3.2 Claims 20, 21, 30-33 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 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.
- 3.3 In claim 48 and in the description on page 20 paragraph [079], the second step concerning the acylation is missing.
- 3.4 The units psi employed in claims 11 and 12 and on pages 15, 49 and 54 is not recognized in international practice used, contrary to the requirements of Rule 10.1(d) 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

IN THE INTERNATIONAL BUREAU OF WIPO

Applicant: Wyeth

International Application No.: PCT/US2006/020536  
International Filing Date: 25 May 2006  
Publication No.: WO 2006/130500 A3  
Publication Date: 7 December 2006

VIA FACSIMILE (011.41.22.338.82.70)  
CONFIRMATION VIA INTERNATIONAL FEDERAL EXPRESS

International Bureau of WIPO  
PCT Operations Division  
34, Chemin des Colombettes  
1211 Geneva 20, Switzerland

REQUEST TO CORRECT ERRORS IN PUBLISHED APPLICATION

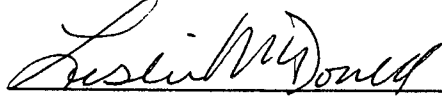
The published international application is inconsistent with the application as filed. Please correct applicant Wyeth's address to Five Giralda Farms, inventor Sylvain Daigneault's address to Laval, Quebec H7R 1G6, inventor Joseph James McCauley's name to Joseph James McCauley, III and his address to Plattsburgh, New York. Further, please delete "XX" from inventor Michel Bernatchez's address.

To assist in the correction, please find enclosed a marked-up copy of the cover page of the published application indicating the corrections, and a copy of the PCT Request as filed.

Please republish the application with the corrections, and notify the appropriate receiving offices.

Respectfully submitted,

Date: 19 November 2007

  
Leslie A. McDonell, Agent of Record  
Reg. No. 34,872  
Finnegan, Henderson, Farabow  
Garrett & Dunner, LLP  
901 New York Avenue, NW  
Washington, D. C. 20001-4413

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau



(43) International Publication Date  
7 December 2006 (07.12.2006)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 2006/130500 A3

(51) International Patent Classification:

C07C 231/02 (2006.01) A61K 31/65 (2006.01)  
C07C 237/26 (2006.01) A61P 31/00 (2006.01)

(21) International Application Number:

PCT/US2006/020536

(22) International Filing Date: 25 May 2006 (25.05.2006)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:

60/685,146 27 May 2005 (27.05.2005) US

(71) Applicant (for all designated States except US): WYETH  
[US/US]; Five Hiralda Farms, Madison, NJ 07940 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): KRISHNAN,  
Lalitha [US/US]; 2 Sonia Court, Suffern, NY 10901  
(US). SUM, Phaik-eng [US/US]; 16 Chamberlain Court,  
Pomona, NY 10970 (US). DAIGNEAULT, Sylvain  
[CA/CA]; 201 Des Peupliers, Laval, ~~XX~~H7R 1G6  
(CA). BERNATCHEZ, Michel [CA/CA]; 3990, Boul.  
Gouin-est, Montreal-nord, Quebec ~~XX~~H1H 1C6 (CA).  
PILCHER, Anthony, Scott [US/US]; 178 Arbor Lane,  
Colchester, VT 05446 (US). HORNE, Jeffrey, Marshall

[US/US]; Po Box 288, 3 East Street, Mooers, NY 12958  
(US). TUPER, Adam, Joseph [US/US]; 10 Oakwood  
Drive, Rouses Point, NY 12979 (US). MCCAULEY, ~~III~~  
Joseph, James [US/US]; 73 Beekman Street, Playfitts-  
burgh, NY 12901 (US). MICHAUD, Adam, P. [US/US];  
3 Pomfret Lane, Essex Junction, VT 05452 (US).

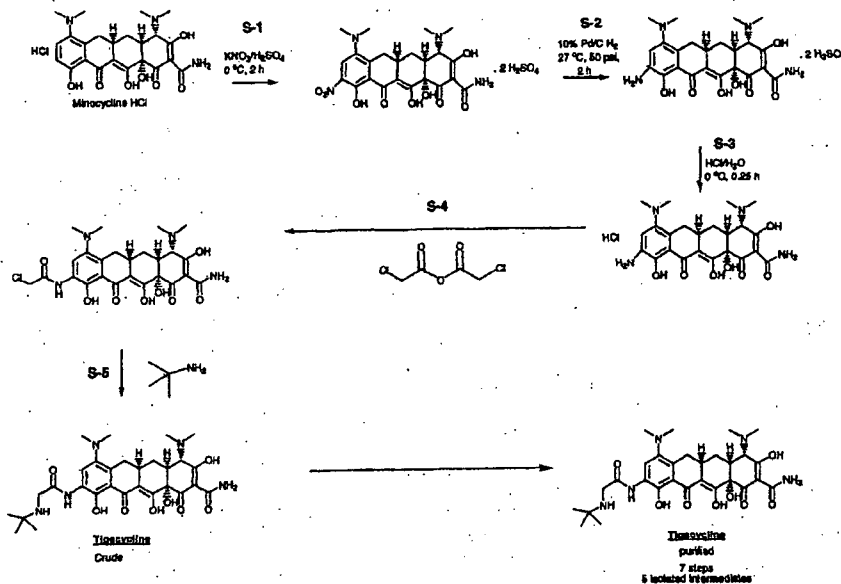
(74) Agent: MCDONELL, Leslie, A.; FINNEGAN, HEN-  
DERSON, FARABOW, GARRETT & DUNNER LLP, 901  
New York Avenue, Washington, DC 20001-4413 (US).

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

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every  
kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH,  
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,  
ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),  
European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,  
FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT,

[Continued on next page]

(54) Title: TIGECYCLINE AND METHODS OF PREPARING 9-AMINOMINOCYCLINE



(57) Abstract: Methods of preparing and purifying tetracyclines, such as tigecycline, are disclosed. Also disclosed are tetracycline compositions, such as tigecycline compositions, prepared by these methods.

WO 2006/130500 A3

# PCT

## REQUEST

The undersigned requests that the present international application be processed according to the Patent Cooperation Treaty.

For receiving Office use only

International Application No.

International Filing Date

Name of receiving Office and "PCT International Application"

Applicant's or agent's file reference (if desired) (12 characters maximum) 1142.381-304

**Box No. I TITLE OF INVENTION**  
TIGECYCLINE AND METHODS OF PREPARING 9-AMINOMINOCYCLINE

**Box No. II APPLICANT** ☐ This person is also inventor

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

Wyeth  
Five Giralda Farms  
Madison, New Jersey 07940  
United States of America

Telephone No.

Facsimile No.

Teleprinter No.

Applicant's registration No. with the Office

State (that is, country) of nationality:  
USA

State (that is, country) of residence:  
USA

This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☒ all designated States except the United States of America ☐ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

**Box No. III FURTHER APPLICANT(S) AND/OR (FURTHER) INVENTOR(S)**

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

Lalitha Krishnan  
2 Sonia Court  
Suffern, New York 10901  
United States of America

This person is:

☐ applicant only

☒ applicant and inventor

☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

Applicant's registration No. with the Office

State (that is, country) of nationality:  
USA

State (that is, country) of residence:  
USA

This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☒ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

☒ Further applicants and/or (further) inventors are indicated on a continuation sheet.

**Box No. IV AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE; OR ADDRESS FOR CORRESPONDENCE**

The person identified below is hereby/has been appointed to act on behalf of the applicant(s) before the competent International Authorities as:

☒ agent

☐ common representative

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)

Leslie A. McDonell  
Finnegan, Henderson, Farabow, Garrett & Dunner, L.L.P.  
901 New York Avenue  
Washington, D. C. 20001-4413  
United States of America

Telephone No.

202.408.4000

Facsimile No.

202.408.4400

Teleprinter No.

Agent's registration No. with the Office  
34,872

☐ Address for correspondence: Mark this check-box where no agent or common representative is/has been appointed and the space above is used instead to indicate a special address to which correspondence should be sent.

Express Mail Label No.

Date of Deposit:

By:

EW68495603205

25 May 2006

Michelle A. Dickson

| Continuation of Box No. III FURTHER APPLICANT(S) AND/OR (FURTHER) INVENTOR(S)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                                                                                                                                                                                                             |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| If none of the following sub-boxes is used, this sheet should not be included in the request.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)<br><b>Phaik-Eng Sum</b><br><b>16 Chamberlain Court</b><br><b>Pomona, New York 10970</b><br><b>United States of America</b>      | This person is:<br><input type="checkbox"/> applicant only<br><input checked="" type="checkbox"/> applicant and inventor<br><input type="checkbox"/> inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)<br><br>Applicant's registration No. with the Office |
| State (that is, country) of nationality:<br><b>USA</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | State (that is, country) of residence:<br><b>USA</b>                                                                                                                                                                                                                        |
| This person is applicant for the purposes of: <input type="checkbox"/> all designated States <input type="checkbox"/> all designated States except the United States of America <input checked="" type="checkbox"/> the United States of America only <input type="checkbox"/> the States indicated in the Supplemental Box                                                                                                                             |                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)<br><b>Sylvain Daigneault</b><br><b>201 Des Peupliers</b><br><b>Laval, Quebec H7R 1G6</b><br><b>Canada</b>                       | This person is:<br><input type="checkbox"/> applicant only<br><input checked="" type="checkbox"/> applicant and inventor<br><input type="checkbox"/> inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)<br><br>Applicant's registration No. with the Office |
| State (that is, country) of nationality:<br><b>Canadian</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | State (that is, country) of residence:<br><b>Canada</b>                                                                                                                                                                                                                     |
| This person is applicant for the purposes of: <input type="checkbox"/> all designated States <input type="checkbox"/> all designated States except the United States of America <input checked="" type="checkbox"/> the United States of America only <input type="checkbox"/> the States indicated in the Supplemental Box                                                                                                                             |                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)<br><b>Michel Bernatchez</b><br><b>3990, boul. Gouin-est, Montreal-nord</b><br><b>Quebec H1H 1C6</b><br><b>Canada</b>            | This person is:<br><input type="checkbox"/> applicant only<br><input checked="" type="checkbox"/> applicant and inventor<br><input type="checkbox"/> inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)<br><br>Applicant's registration No. with the Office |
| State (that is, country) of nationality:<br><b>Canadian</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | State (that is, country) of residence:<br><b>Canada</b>                                                                                                                                                                                                                     |
| This person is applicant for the purposes of: <input type="checkbox"/> all designated States <input type="checkbox"/> all designated States except the United States of America <input checked="" type="checkbox"/> the United States of America only <input type="checkbox"/> the States indicated in the Supplemental Box                                                                                                                             |                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)<br><b>Anthony Scott Pilcher</b><br><b>178 Arbor Lane</b><br><b>Colchester, Vermont 05446</b><br><b>United States of America</b> | This person is:<br><input type="checkbox"/> applicant only<br><input checked="" type="checkbox"/> applicant and inventor<br><input type="checkbox"/> inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)<br><br>Applicant's registration No. with the Office |
| State (that is, country) of nationality:<br><b>USA</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | State (that is, country) of residence:<br><b>USA</b>                                                                                                                                                                                                                        |
| This person is applicant for the purposes of: <input type="checkbox"/> all designated States <input type="checkbox"/> all designated States except the United States of America <input checked="" type="checkbox"/> the United States of America only <input type="checkbox"/> the States indicated in the Supplemental Box                                                                                                                             |                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| <input checked="" type="checkbox"/> Further applicants and/or (further) inventors are indicated on another continuation sheet.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                                                                                                                                                                                                                                                             |

Continuation of Box No. III FURTHER APPLICANT(S) AND/OR (FURTHER) INVENTOR(S)

If none of the following sub-boxes is used, this sheet should not be included in the request.

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |  |                                                                                                                                                                                                                         |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)<br><b>Jeffrey Marshall Horne</b><br><b>PO Box 288, 3 East Street</b><br><b>Mooers, New York 12958</b><br><b>United States of America</b> |  | This person is:<br><input type="checkbox"/> applicant only<br><input checked="" type="checkbox"/> applicant and inventor<br><input type="checkbox"/> inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.) |
| State (that is, country) of nationality:<br><b>USA</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |  | State (that is, country) of residence:<br><b>USA</b>                                                                                                                                                                    |
| This person is applicant for the purposes of: <input type="checkbox"/> all designated States <input type="checkbox"/> all designated States except the United States of America <input checked="" type="checkbox"/> the United States of America only <input type="checkbox"/> the States indicated in the Supplemental Box                                                                                                                                      |  |                                                                                                                                                                                                                         |
| Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)<br><b>Adam Joseph Tuper</b><br><b>10 Oakwood Drive</b><br><b>Rouses Point, New York 12979</b><br><b>United States of America</b>         |  | This person is:<br><input type="checkbox"/> applicant only<br><input checked="" type="checkbox"/> applicant and inventor<br><input type="checkbox"/> inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.) |
| State (that is, country) of nationality:<br><b>USA</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |  | State (that is, country) of residence:<br><b>USA</b>                                                                                                                                                                    |
| This person is applicant for the purposes of: <input type="checkbox"/> all designated States <input type="checkbox"/> all designated States except the United States of America <input checked="" type="checkbox"/> the United States of America only <input type="checkbox"/> the States indicated in the Supplemental Box                                                                                                                                      |  |                                                                                                                                                                                                                         |
| Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)<br><b>Joseph James McCauley III</b><br><b>73 Beekman Street</b><br><b>Plattsburgh, New York 12901</b><br><b>United States of America</b> |  | This person is:<br><input type="checkbox"/> applicant only<br><input checked="" type="checkbox"/> applicant and inventor<br><input type="checkbox"/> inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.) |
| State (that is, country) of nationality:<br><b>USA</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |  | State (that is, country) of residence:<br><b>USA</b>                                                                                                                                                                    |
| This person is applicant for the purposes of: <input type="checkbox"/> all designated States <input type="checkbox"/> all designated States except the United States of America <input checked="" type="checkbox"/> the United States of America only <input type="checkbox"/> the States indicated in the Supplemental Box                                                                                                                                      |  |                                                                                                                                                                                                                         |
| Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)<br><b>Adam P. Michaud</b><br><b>3 Pomfret Lane</b><br><b>Essex Junction, Vermont 05452</b><br><b>United States of America</b>            |  | This person is:<br><input type="checkbox"/> applicant only<br><input checked="" type="checkbox"/> applicant and inventor<br><input type="checkbox"/> inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.) |
| State (that is, country) of nationality:<br><b>USA</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |  | State (that is, country) of residence:<br><b>USA</b>                                                                                                                                                                    |
| This person is applicant for the purposes of: <input type="checkbox"/> all designated States <input type="checkbox"/> all designated States except the United States of America <input checked="" type="checkbox"/> the United States of America only <input type="checkbox"/> the States indicated in the Supplemental Box                                                                                                                                      |  |                                                                                                                                                                                                                         |
| <input type="checkbox"/> Further applicants and/or (further) inventors are indicated on another continuation sheet.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |  |                                                                                                                                                                                                                         |

| <b>Box No. V DESIGNATIONS</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                                                                                                                      |                                                |                                       |                                             |                                                     |                                                |                               |                                            |                                                                                                                          |                                                |                                             |                                                                                                                                      |                         |                                            |                                                                                                        |   |                                           |                                                                                |   |  |  |  |          |  |  |  |  |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------------|-----------------------------------------------------|------------------------------------------------|-------------------------------|--------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------|---------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|--------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|---|-------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|---|--|--|--|----------|--|--|--|--|
| <p>The filing of this request constitutes under Rule 4.9(a), the designation of all Contracting States bound by the PCT on the international filing date, for the grant of every kind of protection available and, where applicable, for the grant of both regional and national patents. However,</p> <p><input type="checkbox"/> DE Germany is not designated for any kind of national protection</p> <p><input type="checkbox"/> JP Japan is not designated for any kind of national protection</p> <p><input type="checkbox"/> KR Republic of Korea is not designated for any kind of national protection</p> <p><input type="checkbox"/> RU Russian Federation is not designated for any kind of national protection</p> <p><i>(The check-boxes above may only be used to exclude (irrevocably) the designations concerned if, at the time of filing, the international application contains in Box No. VI a priority claim to an earlier national application filed in the particular State concerned, in order to avoid the ceasing of the effect, under the national law, of this earlier national application. See the Notes to Box No. V as to the consequences of such national law provisions in these States).</i></p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |                                                                                                                                      |                                                |                                       |                                             |                                                     |                                                |                               |                                            |                                                                                                                          |                                                |                                             |                                                                                                                                      |                         |                                            |                                                                                                        |   |                                           |                                                                                |   |  |  |  |          |  |  |  |  |
| <b>Box No. VI PRIORITY CLAIM</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                                                                                                                      |                                                |                                       |                                             |                                                     |                                                |                               |                                            |                                                                                                                          |                                                |                                             |                                                                                                                                      |                         |                                            |                                                                                                        |   |                                           |                                                                                |   |  |  |  |          |  |  |  |  |
| <p>The priority of the following earlier application(s) is hereby claimed:</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th rowspan="2" style="width: 20%;">Filing date of earlier application (day/month/year)</th> <th rowspan="2" style="width: 20%;">Number of earlier application</th> <th colspan="3" style="width: 60%;">Where earlier application is:</th> </tr> <tr> <th style="width: 20%;">national application: country or Member of WTO</th> <th style="width: 20%;">regional application: regional Office</th> <th style="width: 20%;">international application: receiving Office</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>item (1)<br/>27 May 2005</td> <td>60/685,146</td> <td>USA</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>item (2)</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>item (3)</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p><input type="checkbox"/> Further priority claims are indicated in the Supplemental Box.</p> <p>The receiving Office is requested to prepare and transmit to the International Bureau a certified copy of the earlier application(s) (only if the earlier application was filed with the Office which for the purposes of this international application is the receiving Office) identified above as:</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> all items    <input type="checkbox"/> item (1)    <input type="checkbox"/> item (2)    <input type="checkbox"/> item (3)    <input type="checkbox"/> other, see Supplemental Box</p> <p><i>* Where the earlier application is an ARIPO application, indicate at least one country party to the Paris Convention for the Protection of Industrial Property or one Member of the World Trade Organization for which that earlier application was filed (Rule 4.10(b)(ii)).</i></p> |                                                                                                                                      |                                                |                                       |                                             | Filing date of earlier application (day/month/year) | Number of earlier application                  | Where earlier application is: |                                            |                                                                                                                          | national application: country or Member of WTO | regional application: regional Office       | international application: receiving Office                                                                                          | item (1)<br>27 May 2005 | 60/685,146                                 | USA                                                                                                    |   |                                           | item (2)                                                                       |   |  |  |  | item (3) |  |  |  |  |
| Filing date of earlier application (day/month/year)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | Number of earlier application                                                                                                        | Where earlier application is:                  |                                       |                                             |                                                     |                                                |                               |                                            |                                                                                                                          |                                                |                                             |                                                                                                                                      |                         |                                            |                                                                                                        |   |                                           |                                                                                |   |  |  |  |          |  |  |  |  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                                                      | national application: country or Member of WTO | regional application: regional Office | international application: receiving Office |                                                     |                                                |                               |                                            |                                                                                                                          |                                                |                                             |                                                                                                                                      |                         |                                            |                                                                                                        |   |                                           |                                                                                |   |  |  |  |          |  |  |  |  |
| item (1)<br>27 May 2005                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 60/685,146                                                                                                                           | USA                                            |                                       |                                             |                                                     |                                                |                               |                                            |                                                                                                                          |                                                |                                             |                                                                                                                                      |                         |                                            |                                                                                                        |   |                                           |                                                                                |   |  |  |  |          |  |  |  |  |
| item (2)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |                                                                                                                                      |                                                |                                       |                                             |                                                     |                                                |                               |                                            |                                                                                                                          |                                                |                                             |                                                                                                                                      |                         |                                            |                                                                                                        |   |                                           |                                                                                |   |  |  |  |          |  |  |  |  |
| item (3)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |                                                                                                                                      |                                                |                                       |                                             |                                                     |                                                |                               |                                            |                                                                                                                          |                                                |                                             |                                                                                                                                      |                         |                                            |                                                                                                        |   |                                           |                                                                                |   |  |  |  |          |  |  |  |  |
| <b>Box No. VII INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |                                                                                                                                      |                                                |                                       |                                             |                                                     |                                                |                               |                                            |                                                                                                                          |                                                |                                             |                                                                                                                                      |                         |                                            |                                                                                                        |   |                                           |                                                                                |   |  |  |  |          |  |  |  |  |
| <p>Choice of International Searching Authority (ISA) (if two or more International Searching Authorities are competent to carry out the international search, indicate the Authority chosen; the two-letter code may be used):</p> <p>ISA / EPO .....</p> <p>Request to use results of earlier search; reference to that search (if an earlier search has been carried out by or requested from the International Searching Authority):</p> <p>Date (day/month/year)                      Number                      Country (or regional Office)</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                                                                                      |                                                |                                       |                                             |                                                     |                                                |                               |                                            |                                                                                                                          |                                                |                                             |                                                                                                                                      |                         |                                            |                                                                                                        |   |                                           |                                                                                |   |  |  |  |          |  |  |  |  |
| <b>Box No. VIII DECLARATIONS</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                                                                                                                      |                                                |                                       |                                             |                                                     |                                                |                               |                                            |                                                                                                                          |                                                |                                             |                                                                                                                                      |                         |                                            |                                                                                                        |   |                                           |                                                                                |   |  |  |  |          |  |  |  |  |
| <p>The following declarations are contained in Boxes Nos. VIII (i) to (v) (mark the applicable check-boxes below and indicate in the right column the number of each type of declaration):</p> <table style="width: 100%;"> <tr> <td style="width: 15%;"><input type="checkbox"/> Box No. VIII (i)</td> <td style="width: 65%;">Declaration as to the identity of the inventor</td> <td style="width: 20%; text-align: right;">:</td> </tr> <tr> <td><input type="checkbox"/> Box No. VIII (ii)</td> <td>Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for and be granted a patent</td> <td style="text-align: right;">:</td> </tr> <tr> <td><input type="checkbox"/> Box No. VIII (iii)</td> <td>Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to claim the priority of the earlier application</td> <td style="text-align: right;">:</td> </tr> <tr> <td><input type="checkbox"/> Box No. VIII (iv)</td> <td>Declaration of inventorship (only for the purposes of the designation of the United States of America)</td> <td style="text-align: right;">:</td> </tr> <tr> <td><input type="checkbox"/> Box No. VIII (v)</td> <td>Declaration as to non-prejudicial disclosures or exceptions to lack of novelty</td> <td style="text-align: right;">:</td> </tr> </table>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                                                                                                                      |                                                |                                       |                                             | <input type="checkbox"/> Box No. VIII (i)           | Declaration as to the identity of the inventor | :                             | <input type="checkbox"/> Box No. VIII (ii) | Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for and be granted a patent | :                                              | <input type="checkbox"/> Box No. VIII (iii) | Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to claim the priority of the earlier application | :                       | <input type="checkbox"/> Box No. VIII (iv) | Declaration of inventorship (only for the purposes of the designation of the United States of America) | : | <input type="checkbox"/> Box No. VIII (v) | Declaration as to non-prejudicial disclosures or exceptions to lack of novelty | : |  |  |  |          |  |  |  |  |
| <input type="checkbox"/> Box No. VIII (i)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | Declaration as to the identity of the inventor                                                                                       | :                                              |                                       |                                             |                                                     |                                                |                               |                                            |                                                                                                                          |                                                |                                             |                                                                                                                                      |                         |                                            |                                                                                                        |   |                                           |                                                                                |   |  |  |  |          |  |  |  |  |
| <input type="checkbox"/> Box No. VIII (ii)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for and be granted a patent             | :                                              |                                       |                                             |                                                     |                                                |                               |                                            |                                                                                                                          |                                                |                                             |                                                                                                                                      |                         |                                            |                                                                                                        |   |                                           |                                                                                |   |  |  |  |          |  |  |  |  |
| <input type="checkbox"/> Box No. VIII (iii)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to claim the priority of the earlier application | :                                              |                                       |                                             |                                                     |                                                |                               |                                            |                                                                                                                          |                                                |                                             |                                                                                                                                      |                         |                                            |                                                                                                        |   |                                           |                                                                                |   |  |  |  |          |  |  |  |  |
| <input type="checkbox"/> Box No. VIII (iv)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | Declaration of inventorship (only for the purposes of the designation of the United States of America)                               | :                                              |                                       |                                             |                                                     |                                                |                               |                                            |                                                                                                                          |                                                |                                             |                                                                                                                                      |                         |                                            |                                                                                                        |   |                                           |                                                                                |   |  |  |  |          |  |  |  |  |
| <input type="checkbox"/> Box No. VIII (v)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | Declaration as to non-prejudicial disclosures or exceptions to lack of novelty                                                       | :                                              |                                       |                                             |                                                     |                                                |                               |                                            |                                                                                                                          |                                                |                                             |                                                                                                                                      |                         |                                            |                                                                                                        |   |                                           |                                                                                |   |  |  |  |          |  |  |  |  |

| Box No. IX CHECK LIST; LANGUAGE OF FILING                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                        |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|
| <p>This international application contains:</p> <p>(a) on paper, the following number of sheets:</p> <p>request (including declaration sheets) : 5</p> <p>description (excluding sequence listing and/or tables related thereto) : 77</p> <p>claims : 9</p> <p>abstract : 1</p> <p>drawings : 3</p> <p>Sub-total number of sheets : 95</p> <p>sequence listing : </p> <p>tables related thereto : </p> <p>(for both, actual number of sheets if filed on paper, whether or not also filed in electronic form; see (c) below)</p> <p>Total number of sheets : 95</p> <p>(b) <input type="checkbox"/> only in electronic form (Section 801(a)(i))</p> <p>(i) <input type="checkbox"/> sequence listing</p> <p>(ii) <input type="checkbox"/> tables related thereto</p> <p>(c) <input type="checkbox"/> also in electronic form (Section 801(a)(ii))</p> <p>(i) <input type="checkbox"/> sequence listing</p> <p>(ii) <input type="checkbox"/> tables related thereto</p> <p>Type and number of carriers (diskette, CD-ROM, CD-R or other) on which are contained the</p> <p><input type="checkbox"/> sequence listing: .....</p> <p><input type="checkbox"/> tables related thereto: .....</p> <p>(additional copies to be indicated under items 9(ii) and/or 10(ii), in right column)</p> | <p>This international application is accompanied by the following item(s) (mark the applicable check-boxes below and indicate in right column the number of each item):</p> <p>1. <input checked="" type="checkbox"/> fee calculation sheet : 1</p> <p>2. <input type="checkbox"/> original separate power of attorney : </p> <p>3. <input type="checkbox"/> original general power of attorney : </p> <p>4. <input type="checkbox"/> copy of general power of attorney; reference number, if any: ..... : </p> <p>5. <input type="checkbox"/> statement explaining lack of signature : </p> <p>6. <input type="checkbox"/> priority document(s) identified in Box No. VI as item(s): ..... : </p> <p>7. <input type="checkbox"/> translation of international application into (language): ..... : </p> <p>8. <input type="checkbox"/> separate indications concerning deposited microorganism or other biological material : </p> <p>9. <input type="checkbox"/> sequence listing in electronic form (indicate type and number of carriers)</p> <p>(i) <input type="checkbox"/> copy submitted for the purposes of international search under Rule 13ter only (and not as part of the international application) : </p> <p>(ii) <input type="checkbox"/> (only where check-box (b)(i) or (c)(i) is marked in left column) additional copies including, where applicable, the copy for the purposes of international search under Rule 13ter : </p> <p>(iii) <input type="checkbox"/> together with relevant statement as to the identity of the copy or copies with the sequence listing mentioned in left column : </p> <p>10. <input type="checkbox"/> tables in electronic form related to sequence listing (indicate type and number of carriers)</p> <p>(i) <input type="checkbox"/> copy submitted for the purposes of international search under Section 802(b-quater) only (and not as part of the international application) : </p> <p>(ii) <input type="checkbox"/> (only where check-box (b)(ii) or (c)(ii) is marked in left column) additional copies including, where applicable, the copy for the purposes of international search under Section 802(b-quater) : </p> <p>(iii) <input type="checkbox"/> together with relevant statement as to the identity of the copy or copies with the tables mentioned in left column : </p> <p>11. <input type="checkbox"/> other (specify): ..... : </p> | <p>Number of items</p> |
| <p>Figure of the drawings which should accompany the abstract: 1</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | <p>Language of filing of the international application: English</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                        |
| <p><b>Box No. X SIGNATURE OF APPLICANT, AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE</b></p> <p>Next to each signature, indicate the name of the person signing and the capacity in which the person signs (if such capacity is not obvious from reading the request).</p> <p style="font-family: cursive; font-size: 1.2em;">Mary K. Ferguson #51,675<br/>for Leslie A. McDonnell</p> <p>Leslie A. McDonnell, Reg. No. 34,872</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                        |

| For receiving Office use only                                                                                                                      |                                                                                                             |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>1. Date of actual receipt of the purported international application:</p>                                                                       | <p>2. Drawings:</p> <p><input type="checkbox"/> received:</p> <p><input type="checkbox"/> not received:</p> |
| <p>3. Corrected date of actual receipt due to later but timely received papers or drawings completing the purported international application:</p> |                                                                                                             |
| <p>4. Date of timely receipt of the required corrections under PCT Article 11(2):</p>                                                              |                                                                                                             |
| <p>5. International Searching Authority (if two or more are competent): ISA /</p>                                                                  | <p>6. <input type="checkbox"/> Transmittal of search copy delayed until search fee is paid</p>              |

| For International Bureau use only                                      |
|------------------------------------------------------------------------|
| <p>Date of receipt of the record copy by the International Bureau:</p> |

# PCT

## FEE CALCULATION SHEET

Annex to the Request

For receiving Office use only

International Application No.

Date stamp of the receiving Office

Applicant's or agent's  
file reference

1142.381-304

Applicant  
WYETH

### CALCULATION OF PRESCRIBED FEES

1. TRANSMITTAL FEE . . . . . 300.00 [T]

2. SEARCH FEE . . . . . 1,925.00 [S]

International search to be carried out by EPO  
(If two or more International Searching Authorities are competent to carry out the international search, indicate the name of the Authority which is chosen to carry out the international search.)

3. INTERNATIONAL FILING FEE

Where items (b) and/or (c) of Box No. IX apply, enter Sub-total number of sheets } 95  
Where items (b) and (c) of Box No. IX do not apply, enter Total number of sheets }

[i1] first 30 sheets . . . . . 1,086.00 [i1]

[i2] 65 x 12.00 = 780.00 [i2]  
number of sheets fee per sheet  
in excess of 30

[i3] additional component (only if a sequence listing and/or tables  
related thereto are filed in electronic form under Section 801(a)(i),  
or both in that form and on paper, under Section 801(a)(ii)):

400 x                      =                      [i3]  
fee per sheet

Add amounts entered at i1, i2 and i3 and enter total at I . . . . . 1,866.00 [I]

(Applicants from certain States are entitled to a reduction of 75% of the international filing fee. Where the applicant is (or all applicants are) so entitled, the total to be entered at I is 25% of the international filing fee.)

4. FEE FOR PRIORITY DOCUMENT (if applicable) . . . . . 20.00 [P]

5. TOTAL FEES PAYABLE . . . . . 4,111.00  
TOTAL

Add amounts entered at T, S, I and P, and enter total in the TOTAL box

### MODE OF PAYMENT (Not all modes of payment may be available at all receiving Offices)

☒ authorization to charge deposit account (see below) ☐ postal money order ☐ cash ☐ coupons  
☐ cheque ☐ bank draft ☐ revenue stamps ☐ other (specify):

### AUTHORIZATION TO CHARGE (OR CREDIT) DEPOSIT ACCOUNT (This mode of payment may not be available at all receiving Offices)

☒ Authorization to charge the total fees indicated above.  
☒ (This check-box may be marked only if the conditions for deposit accounts of the receiving Office so permit) Authorization to charge any deficiency or credit any overpayment in the total fees indicated above.  
☒ Authorization to charge the fee for priority document.

Receiving Office: RO/ US

Deposit Account No.: 06-0916

Date: 25 May 2006

Name: Leslie A. McDonell

Signature: Mary K. Ferguson for Leslie A. McDonell

Message Confirmation Report

NOV-19-2007 01:03 PM MON

WorkCentre M20 Series

Machine ID : FINNEGAN HENDERSON

Serial Number : RYU260046.....

Fax Number :

Name/Number : 2250011420381\*0030401141223388270#  
Page : 9  
Start Time : NOV-19-2007 01:00PM MON  
Elapsed Time : 02'48"  
Mode : STD ECM  
Results : O.K

LAW OFFICES  
FINNEGAN, HENDERSON, FARABOW, GARRETT & DUNNER, L.L.P.  
55 Cambridge Parkway, Suite 700  
Cambridge, Massachusetts 02142

Telephone  
617.452.1600

Facsimile  
617.452.1666

FACSIMILE TRANSMITTAL

TO

Firm: International Bureau of WIPO  
PCT Operations Division  
34, chemin des Colombettes  
1211 Geneva 20, Switzerland  
  
Fax No. 011.41.22.338.82.70

Date: 19 November 2007

Subject: REQUEST TO CORRECT ERRORS IN PUBLISHED APPLICATION  
Ref. No.: PCT International Application No. PCT/US2006/020536  
Agent Reference No. 1142-381-304

FROM

Name: Leslie A. McDonell  
Fax # Verified by: A. Amison

# Pages (Incl. this): 9

KINDLY ACKNOWLEDGE RECEIPT OF THIS COMMUNICATION BY RETURN FACSIMILE

If there is a problem with this transmission, notify fax room at (202) 408-4174 or the sender at the number above.

This facsimile is intended only for the individual to whom it is addressed and may contain information that is privileged, confidential, or exempt from disclosure under applicable law. If you have received this facsimile in error, please notify the sender immediately by telephone (collect), and return the original message by first-class mail to the above address.

11/28/07

LAW OFFICES  
**FINNEGAN, HENDERSON, FARABOW, GARRETT & DUNNER, L.L.P.**  
55 Cambridge Parkway; Suite 700  
Cambridge, Massachusetts 02142

Telephone  
617.452.1600

Facsimile  
617.452.1666

---

**FACSIMILE TRANSMITTAL**

---

**TO**

**Firm:** International Bureau of WIPO  
PCT Operations Division  
34, chemin des Colombettes  
1211 Geneva 20, Switzerland

Fax No. 011.41.22.338.82.70

**Date:** 19 November 2007

**Subject:** REQUEST TO CORRECT ERRORS IN PUBLISHED APPLICATION

**Ref. No.:** PCT International Application No. PCT/US2006/020536  
Agent Reference No. 1142-381-304

---

**FROM**

**Name:** Leslie A. McDonell

**Fax # Verified by:** A. Amison

**# Pages (incl. this):** 9

---

**KINDLY ACKNOWLEDGE RECEIPT OF THIS COMMUNICATION BY RETURN FACSIMILE**

---

If there is a problem with this transmission, notify fax room at (202) 408-4174 or the sender at the number above.

This facsimile is intended only for the individual to whom it is addressed and may contain information that is privileged, confidential, or exempt from disclosure under applicable law. If you have received this facsimile in error, please notify the sender immediately by telephone (collect), and return the original message by first-class mail to the above address.

---



**Industria y Comercio**  
**SUPERINTENDENCIA**

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO  
No. 07-134135- -00000-0000  
Fecha: 2007-12-19 16:07:26 Dep. 2020 NUECREACIONE  
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI  
Act. 411 PRESENTACION Folios: 287

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)     | ( )       |
| -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: Claudia M Neiva Cortes

Fecha: Diciembre 19, 2007

**REPUBLICA DE COLOMBIA**  
**SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO**

Folio 289

2020  
Bogotá D.C.,

Doctor(a)  
CORREA ORDOÑEZ ALVARO  
Apoderado(a) y/o Representante de  
WYETH

|            |                            |                   |
|------------|----------------------------|-------------------|
| REFERENCIA | Radicación No.             | 7 134135          |
|            | Solicitud internacional    | PCT/US2006/020536 |
|            | Fecha inicio fase nacional | 27/12/2007        |
|            | Trámite                    | 11                |
|            | Evento                     | 378               |
|            | Actuación                  | 416               |
|            | Oficio No.                 | 5432              |
|            | Folios                     | 1                 |

Teniendo en cuenta que la solicitud de privilegio de patente que se tramita bajo el expediente indicado en la referencia, reúne los requisitos de forma establecidos en la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, el Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), el Reglamento y la Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se envía el extracto de la solicitud a la Oficina de Comunicaciones para efecto de su publicación en la Gaceta de Propiedad Industrial.

Cúmplase  
Dado en Bogotá DC,

08 ABR. 2020

ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL  
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

adpall