

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 528 490**

51 Int. Cl.:

**C07C 237/26** (2006.01)

**A61P 31/00** (2006.01)

**A61K 31/65** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.12.2009 E 09795765 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.10.2014 EP 2376433**

54 Título: **Forma cristalina C de dihidrocloruro de tigeciclina y métodos para su preparación**

30 Prioridad:

**18.12.2008 EP 08172083**

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

**10.02.2015**

73 Titular/es:

**SANDOZ AG (100.0%)  
Lichtstrasse 35  
4056 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**HOTTER, ANDREAS;  
WIESER, JOSEF;  
PICHLER, ARTHUR y  
DECRISTOFORO, MARTIN**

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

ES 2 528 490 T3

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

**DESCRIPCIÓN**

Forma cristalina C de dihidrocloruro de tigeciclina y métodos para su preparación

**CAMPO DE LA INVENCION**

5 La presente invención se refiere a la forma cristalina C de dihidrocloruro de tigeciclina y a métodos para la preparación de la misma. Además, la presente invención se refiere al uso de la forma cristalina C de dihidrocloruro de tigeciclina como un producto intermedio en la preparación de un medicamento antiinfeccioso. Por otra parte, la presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden la forma cristalina C de dihidrocloruro de tigeciclina en una cantidad eficaz y al uso de la forma cristalina C de dihidrocloruro de tigeciclina como un medicamento antiinfeccioso.

**10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

15 La tigeciclina, (4S,4aS,5aR,12aS)-4,7-bis(dimetilamino)-9-[[[(1,1-dimetiletil)amino]acetil]amino]-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-octahidro-3,10,12,12a-tetrahidroxi-1,11-dioxo-2-naftacenocarboxamida, es un derivado 9-t-butilglicilamídico de minociclina (Merck Index 14<sup>a</sup> Edición, número monográfico 9432, Número de Registro CAS 220620-09-7). En comparación con otros antibióticos de tetraciclina, la tigeciclina es más activa contra cepas resistentes a tetraciclina y también más tolerable. La tigeciclina posee actividad contra aislados bacterianos que contienen los dos determinantes principales responsables de la resistencia a tetraciclina: la protección ribosómica y la descarga activa del fármaco desde la célula bacteriana. Además, la tigeciclina posee una actividad de amplio espectro, p. ej. es activa contra patógenos grampositivos (p. ej. *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina, enterococos resistentes a vancomicina), patógenos gramnegativos (p. ej. *Acinetobacter baumannii*, *Stenotrophomonas maltophilia*) y patógenos anaerobios. Por ahora, la tigeciclina está indicada para el tratamiento de infecciones complicadas de la piel y los tejidos blandos e infecciones intraabdominales. (P.J. Petersen y cols., *Antimicrob. Agents Chemoth.* 1999; 43: 738-744. R. Patel y cols., *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 2000; 38: 177-179. H.W. Boucher y cols., *Antimicrob. Agents Chemoth.* 44: 2225-2229. D.J. Biedenbach y cols., *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 2001; 40: 173-177. P.J. Petersen y cols., *Antimicrob. Agents Chemoth.* 2002; 46: 2595-2601. D. Milatovic y cols., *Antimicrob. Agents Chemoth.* 47: 400-404. T. Hirata y cols., *Antimicrob. Agents Chemoth.* 2004; 48: 2179-2184. G.A. Pankey, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2005; 56: 470-480. R. Harris y cols., *P&T* 2006; 31: 18-59.).

US 5675030 reivindica un método para extraer dihidrocloruro de tigeciclina de estado sólido desconocido.

30 WO 2005/056538, WO 2006/130418, WO 2006/130431, WO 2006/130500 y WO 2006/130501 divulgan tigeciclina, sales de adición de ácido de tigeciclina y asimismo procedimientos para preparar las mismas. Sin embargo, en la bibliografía no se describe dihidrocloruro de tigeciclina cristalino ni un método para su preparación.

35 La tigeciclina está disponible en el mercado como un polvo liofilizado para inyección, el creador es Wyeth. Durante el procedimiento de formulación, en primer lugar la tigeciclina se disuelve en agua y a continuación se liofiliza. Por lo tanto, una forma cristalina de tigeciclina o una sal de adición de ácido cristalina alternativa de tigeciclina debe mostrar gran solubilidad en agua. Los inventores de la presente invención encontraron sorprendentemente que la forma cristalina C de dihidrocloruro de tigeciclina muestra claramente la mayor solubilidad en agua en comparación con cualquiera de las formas cristalinas de tigeciclina o hidrocloreto de tigeciclina.

40 Generalmente, los sólidos cristalinos tienen una estabilidad química y física mejorada sobre la forma amorfa y formas con baja cristalinidad, por lo tanto, el dihidrocloruro de tigeciclina cristalino se prefiere más que el dihidrocloruro de tigeciclina amorfo. Así, sigue habiendo una necesidad de dihidrocloruro de tigeciclina cristalino con alta solubilidad en agua y propiedades de estabilidad adecuadas para la formulación de un medicamento antiinfeccioso.

**SUMARIO DE LA INVENCION**

En una realización, la presente invención se refiere a la forma cristalina C de dihidrocloruro de tigeciclina.

45 La forma cristalina C de dihidrocloruro de tigeciclina se puede describir por un difractograma de rayos X del polvo que comprende picos con ángulos  $2\theta$   $4,7^\circ \pm 0,2^\circ$ ,  $7,6 \pm 0,2^\circ$ ,  $9,4 \pm 0,2^\circ$ ,  $10,4 \pm 0,2^\circ$ ,  $12,7 \pm 0,2^\circ$ ,  $14,4 \pm 0,2^\circ$ ,  $15,3 \pm 0,2^\circ$ ,  $20,7 \pm 0,2^\circ$ ,  $21,5 \pm 0,2^\circ$ ,  $23,2 \pm 0,2^\circ$ ,  $25,6 \pm 0,2^\circ$  y  $26,4 \pm 0,2^\circ$ .

50 Alternativamente, la forma cristalina C de dihidrocloruro de tigeciclina se puede describir mediante un espectro infrarrojo que comprende picos en números de onda de  $3274 \pm 2 \text{ cm}^{-1}$ ,  $2400 \pm 2 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1671 \pm 2 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1585 \pm 2 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1540 \pm 2 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1489 \pm 2 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1434 \pm 2 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1361 \pm 2 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1289 \pm 2 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1241 \pm 2 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1199 \pm 2 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1106 \pm 2 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1056 \pm 2 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1027 \pm 2 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1002 \pm 2 \text{ cm}^{-1}$ ,  $936 \pm 2 \text{ cm}^{-1}$ ,  $879 \pm 2 \text{ cm}^{-1}$ ,  $806 \pm 2 \text{ cm}^{-1}$ ,  $783 \pm 2 \text{ cm}^{-1}$  y  $716 \pm 2$

cm<sup>-1</sup>.

También es materia de la presente invención un procedimiento para la preparación de la forma cristalina C de dihidrocloruro de tigeciclina que comprende las etapas de:

- a) suspender tigeciclina en acetonitrilo o una mezcla de acetonitrilo con cloruro de metileno;
- 5 b) añadir de 2,0 a 2,2 equivalentes de ácido clorhídrico a la suspensión;
- c) agitar la suspensión a una temperatura que varía de temperatura ambiente al punto de ebullición del disolvente o la mezcla de disolventes usados;
- d) aislar la forma cristalina C de dihidrocloruro de tigeciclina.

Además, la presente invención se refiere al uso de la forma cristalina C de dihidrocloruro de tigeciclina como un producto intermedio para preparar un medicamento antiinfeccioso.

Por otra parte, la presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden la forma cristalina C de dihidrocloruro de tigeciclina en una cantidad eficaz.

Además, la presente invención se refiere al uso de la forma cristalina C de dihidrocloruro de tigeciclina como un medicamento antiinfeccioso.

Otros objetivos, características, ventajas y aspectos de la presente invención se harán evidentes para los expertos a partir de la siguiente descripción. Sin embargo, se debe entender que la descripción y los siguientes ejemplos específicos, aunque indican realizaciones preferidas de la invención, se dan solamente a modo de ilustración. Diversos cambios y modificaciones dentro del espíritu y el alcance de la invención divulgada se harán fácilmente evidentes para los expertos en la técnica a partir de la lectura de la descripción y de la lectura de otras partes de la presente divulgación.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Figura 1: Difractograma de rayos X del polvo de la forma cristalina C de dihidrocloruro de tigeciclina

Figura 2: Espectro infrarrojo de la forma cristalina C de dihidrocloruro de tigeciclina

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

Según se usa en la presente memoria, el término "amorfo" se refiere a un material sólido que carece de estructura cristalina regular.

El término "temperatura ambiente", según se usa en la presente memoria, indica que la temperatura aplicada no es crítica y que no se ha de mantener un valor de temperatura exacto. Habitualmente, se entiende que "temperatura ambiente" significa temperaturas de aproximadamente 15°C a aproximadamente 25°C [véase la Farmacopea Europea 6.0, 1.2 (2008)].

El término "ácido clorhídrico concentrado" se refiere a ácido clorhídrico que tiene una concentración de hidrócloruro de 37%.

La presente invención se refiere a la forma cristalina C de dihidrocloruro de tigeciclina. La estructura química del dihidrocloruro de tigeciclina se muestra en la Figura A.

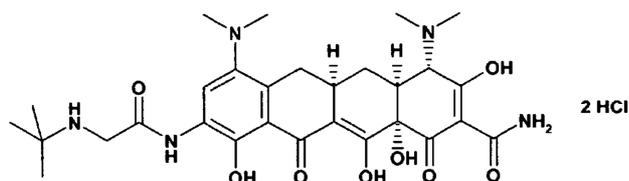


Figura A: Estructura química del dihidrocloruro de tigeciclina

La forma cristalina C de dihidrocloruro de tigeciclina se puede caracterizar, p. ej., por un difractograma de rayos X

del polvo típico o un espectro infrarrojo. Cada una de estas características por sí misma es suficiente para definir e identificar inequívocamente la forma cristalina de dihidrocloruro de tigeciclina, pero también se pueden combinar entre sí.

5 La presente invención se refiere a la forma cristalina C de dihidrocloruro de tigeciclina caracterizada por un difractograma de rayos X del polvo con picos en ángulos 2-θ de 4,7° ± 0,2°, 7,6 ± 0,2°, 9,4 ± 0,2°, 10,4 ± 0,2°, 12,7 ± 0,2°, 14,4 ± 0,2°, 15,3 ± 0,2°, 20,7 ± 0,2°, 21,5 ± 0,2°, 23,2 ± 0,2°, 25,6 ± 0,2° y 26,4 ± 0,2°.

Un difractograma de rayos X del polvo característico de la forma cristalina C de dihidrocloruro de tigeciclina se muestra en la Figura 1 y algunos picos característicos se listan en la Tabla 1.

10 Según esto, en una realización preferida, la presente invención se refiere a la forma cristalina C de dihidrocloruro de tigeciclina caracterizada por un difractograma de rayos X del polvo sustancialmente según la Tabla 1 y la Figura 1.

**Tabla 1:** Picos de difracción de rayos X del polvo (XRPD) característicos de la forma cristalina C de dihidrocloruro de tigeciclina

Angulo [°2-θ]	Intensidad Relativa [%]
4,7	94
7,6	63
9,4	100
10,4	45
12,7	64
14,4	37
15,3	27
20,7	45
21,5	39
23,2	37
25,6	29
26,4	26

15 La forma cristalina C de dihidrocloruro de tigeciclina también se puede caracterizar por un espectro infrarrojo típico como el mostrado en la Figura 2. Según esto, en una realización preferida adicional, la presente invención se refiere a la forma cristalina C de dihidrocloruro de tigeciclina caracterizada por un espectro infrarrojo sustancialmente según la Figura 2. Se presentan bandas características a números de onda de 3274 ± 2 cm<sup>-1</sup>, 2400 ± 2 cm<sup>-1</sup>, 1671 ± 2 cm<sup>-1</sup>, 1585 ± 2 cm<sup>-1</sup>, 1540 ± 2 cm<sup>-1</sup>, 1489 ± 2 cm<sup>-1</sup>, 1434 ± 2 cm<sup>-1</sup>, 1361 ± 2 cm<sup>-1</sup>, 1289 ± 2 cm<sup>-1</sup>, 1241 ± 2 cm<sup>-1</sup>, 1199 ± 2 cm<sup>-1</sup>, 1106 ± 2 cm<sup>-1</sup>, 1056 ± 2 cm<sup>-1</sup>, 1027 ± 2 cm<sup>-1</sup>, 1002 ± 2 cm<sup>-1</sup>, 936 ± 2 cm<sup>-1</sup>, 879 ± 2 cm<sup>-1</sup>, 806 ± 2 cm<sup>-1</sup>, 783 ± 2 cm<sup>-1</sup> y 716 ± 2 cm<sup>-1</sup>.

20 En una realización, la presente invención proporciona un procedimiento para la preparación de la forma cristalina C de dihidrocloruro de tigeciclina, que comprende las etapas de:

a) suspender tigeciclina en acetonitrilo o una mezcla de acetonitrilo con cloruro de metileno;

b) añadir de 2,0 a 2,2 equivalentes de ácido clorhídrico a la suspensión;

25 c) agitar la suspensión a una temperatura que varía de temperatura ambiente al punto de ebullición del disolvente o la mezcla de disolventes usados;

d) aislar la forma cristalina C de dihidrocloruro de tigeciclina.

Se puede usar cualquier forma de tigeciclina en la etapa a) del procedimiento anterior, p. ej. formas amorfas, formas cristalinas, mezclas de formas amorfas y cristalinas, mezclas de diferentes formas cristalinas, hidratos o solvatos. Formas cristalinas adecuadas pueden ser las formas I a V de WO 2006/128150, las formas I y II de WO 2007/127292, cualquiera de las formas divulgadas en WO 2008/066935 o mezclas de las mismas.

La tigeciclina se usa preferiblemente en una concentración que varía de 5 a 100 g/l, más preferiblemente de 5 a 50 g/l y lo más preferiblemente de 5 a 20 g/l. Se encontró que la forma cristalina C de dihidrocloruro de tigeciclina no cristalizaba usando disolventes como acetonitrilo o mezclas de acetonitrilo con cloruro de metileno. Se prefieren mezclas de acetonitrilo con cloruro de metileno, mientras que la cantidad de cloruro de metileno puede variar de 1% a 20%, preferiblemente varía de 5% a 15%. Según esto, la relación de acetonitrilo a cloruro de metileno varía de 99:1 a 80:20 (v/v).

Se puede usar cualquier ácido clorhídrico adecuado en la etapa b) del procedimiento anteriormente descrito. Se puede emplear ácido clorhídrico diluido o concentrado que tiene una concentración en el intervalo de 3 a 38%. Preferiblemente, se usa ácido clorhídrico que tiene una concentración de aproximadamente 10 a 37%, lo más preferiblemente que tiene una concentración de aproximadamente 18%.

La relación de tigeciclina a ácido clorhídrico empleada puede variar. Cuando se usan menos de 2,0 equivalentes de ácido clorhídrico, se obtiene una mezcla de forma C de dihidrocloruro de tigeciclina y forma A de monohidrocloruro de tigeciclina. Los inventores encontraron que cuanto menos ácido clorhídrico se use, más forma A de monohidrocloruro de tigeciclina se obtiene. Por otra parte, un exceso de ácido clorhídrico puede conducir a un material con una cantidad amorfa superior (véase la Tabla 2). Por lo tanto, también se puede obtener la forma cristalina C de dihidrocloruro de tigeciclina que contiene, p. ej., menos de 50% o menos de 25% o menos de 5% de material amorfo o forma cristalina A de tigeciclina. Los inventores encontraron que la relación ideal de tigeciclina a ácido clorhídrico usada es de 2,0 a 2,2 equivalentes de ácido clorhídrico para 1 equivalente de tigeciclina (mol:mol) a fin de obtener la forma cristalina C de dihidrocloruro de tigeciclina en forma esencialmente polimorfa.

**Tabla 2:** Relación entre la cantidad de HCl y la forma cristalina; ACNL:MED = 95:5 (v:v), c = 10 mg/ml, T<sub>baño</sub> = 83°C;

HCl 5N usado [equivalentes molares]	Forma C [%]	Forma A [%]	amorfa [%]
1,4	33	67	0
1,6	55	45	0
1,8	90	10	0
2,0	100	0	0
2,5	40	0	60

La cristalización de la forma C de dihidrocloruro de tigeciclina también tendría lugar a temperatura ambiente o incluso inferior. No obstante, a fin de alcanzar una cristalización más rápida de la forma C de dihidrocloruro de tigeciclina, la suspensión obtenida en la etapa c) preferiblemente se agita a temperaturas elevadas. Temperatura elevada significa en este caso una temperatura que varía desde 30°C hasta el punto de ebullición del disolvente o la mezcla de disolventes usados.

En la etapa d) la forma cristalina C de dihidrocloruro de tigeciclina se aísla de la mezcla de reacción. Se puede emplear cualquier método convencional tal como filtración, centrifugación o evaporación del disolvente.

La forma C de dihidrocloruro de tigeciclina es una forma anhidra, que no contiene agua cuando se almacena a una humedad relativa de aproximadamente 0% y que no contiene más de aproximadamente 0,8% a 1,7%, p. ej. cuando se almacena a una humedad relativa de aproximadamente 50%.

La forma C de dihidrocloruro de tigeciclina cristaliza en láminas alargadas delgadas o agujas finas que tienen una longitud que varía de aproximadamente 10 - 300 µm, dependiendo de la velocidad de cristalización. Debido al mayor tamaño de partícula, la forma C de dihidrocloruro de tigeciclina se filtra mejor que las formas A y B de

monohidrocloruro de tigeciclina. Por lo tanto, la forma C de dihidrocloruro de tigeciclina es una forma especialmente adecuada para aislar dihidrocloruro de tigeciclina de la síntesis mediante filtración, especialmente en la producción a granel.

5 La forma de dosificación acabada contiene tigeciclina amorfa, respectivamente hidrocloruro de tigeciclina, liofilizada. Antes de la liofilización, la tigeciclina, respectivamente las sales de adición de ácido de tigeciclina, se disuelve en agua, así, la solubilidad en agua es un factor importante a considerar. La Tabla 3 muestra los datos de solubilidad de las diferentes formas cristalinas de base libre de tigeciclina y las formas cristalinas A y B del hidrocloruro de tigeciclina en comparación con los de la forma cristalina C de dihidrocloruro de tigeciclina.

10 Según se presenta en la Tabla 3, la forma cristalina C de dihidrocloruro de tigeciclina muestra claramente la mayor solubilidad en agua y por lo tanto es una forma particularmente adecuada para el procedimiento de liofilización como un producto intermedio a fin de preparar un medicamento antiinfeccioso.

**Tabla 3:** Solubilidad en agua de diferentes formas cristalinas de tigeciclina, hidrocloruro de tigeciclina y la forma C de dihidrocloruro de tigeciclina

Forma	Concentración [mg/ml]	Base usada [mg de equivalentes de base]
WO 2006/128150 ( <i>base libre</i> )		
I	201	206
II	170	280
III	174	198
IV	322	387
V	134	180
WO 2007/127292 ( <i>base libre</i> )		
I	54	156
II	76	198
WO 2008/066935 ( <i>base libre</i> )		
IX	141	177
WO 2008/066935 ( <i>base libre</i> )		
XII	174	180
Presente invención ( <i>sales de adición de ácido</i> )		
A (x HCl)	503	621
B (x HCl)	323	332
C (x2HCl)	562	696

15 Además, la forma cristalina C de dihidrocloruro de tigeciclina de alta solubilidad en agua de la presente invención también muestra buena estabilidad termodinámica. La forma cristalina C de dihidrocloruro de tigeciclina de la presente invención representa una forma termodinámicamente estable, lo que significa que no se convierte en otras formas cristalinas o amorfas cuando se almacena, incluso a temperaturas elevadas. Por ejemplo, la forma cristalina C de dihidrocloruro de tigeciclina no cambiaba su estructura cristalina después del almacenamiento durante 7 días a 80°C.

20

5 Asimismo, la tigeciclina debe estar disponible en una forma físicamente estable, a fin de evitar la degradación y como consecuencia la acumulación de subproductos no deseados. La Tabla 4 compara los datos de estabilidad de las diferentes formas cristalinas de base libre de tigeciclina e hidrocloreuro de tigeciclina con los de la forma cristalina C de dihidrocloreuro de tigeciclina de la presente invención. Después de almacenar durante 7 días a 80°C, se puede observar que las formas I y II de WO 2006/128150 muestran un enorme incremento en las impurezas totales. Todas las otras formas cristalinas de tigeciclina, el hidrocloreuro de tigeciclina y también la forma C de dihidrocloreuro de tigeciclina que se han probado mostraban datos de estabilidad satisfactorios cuando se consideraba que 80°C durante 7 días representaban condiciones extremas, que un ingrediente farmacéutico activo nunca experimentará en su ciclo vital bajo circunstancias normales.

10 Además, la forma cristalina C de dihidrocloreuro de tigeciclina es más estable que la forma amorfa. La Tabla 4 presenta que la forma C de dihidrocloreuro de tigeciclina con una cantidad amorfa de 20% es menos estable que una forma C polimorfa pura. Por lo tanto, la forma cristalina C de dihidrocloreuro de tigeciclina en forma polimorfa esencialmente pura se prefiere más que el dihidrocloreuro de tigeciclina amorfo.

15 **Tabla 4:** Estabilidad física de formas cristalinas de tigeciclina, hidrocloreuro de tigeciclina y forma C de dihidrocloreuro de tigeciclina a temperaturas elevadas

Forma	4-Epi-tigeciclina en condiciones ambiente	4-Epi-tigeciclina 7 días a 80°C	Impurezas totales en condiciones ambiente	Impurezas totales 7 días a 80°C
WO 2006/128150 ( <i>base libre</i> )				
I	0,36	2,15	0,75	11,20
II	1,04	10,83	1,60	18,44
III	0,16	2,18	0,16	4,46
IV	0,23	0,38	0,40	0,87
V	<0,05	0,18	0,22	0,37
WO 2007/127792 ( <i>base libre</i> )				
I	0,34	1,26	0,59	2,22
II	0,17	0,38	0,24	0,91
WO 2008/066935 ( <i>base libre</i> )				
IX	0,15	0,70	0,43	2,13
XII	0,15	0,70	0,40	4,38
<b>Presente invención (sales de adición de ácido)</b>				
A (x HCl)	0,84	0,89	1,07	1,81
B (x HCl)	0,93	1,60	1,91	4,19
C (x 2HCl)	0,73	2,40	0,83	2,60
C+20% amorfo (x 2HCl)	1,73	4,34	1,81	4,88
amorfo (x 2HCl)	4,97	16,42	5,05	18,82

En total, la forma cristalina C de dihidrocloreuro de tigeciclina posee la mayor solubilidad en agua y buena estabilidad física y termodinámica y por lo tanto es una forma particularmente útil para la formulación de un medicamento antiinfeccioso.

20 La solubilidad en agua es un factor importante a considerar, ya que la tigeciclina, respectivamente las sales de adición de ácido de tigeciclina, se disuelve en agua antes de liofilizar durante el procedimiento de formulación. Es por lo que la forma cristalina C de dihidrocloreuro de tigeciclina de la presente invención es una forma particularmente adecuada de uso para el procedimiento de formulación.

Además, las propiedades termodinámicas y de estabilidad física de la forma cristalina C de dihidrocloruro de tigeciclina de la presente invención también son adecuadas. La forma C de dihidrocloruro de tigeciclina de la presente invención ni mostraba un incremento notable en las impurezas ni una conversión de la estructura cristalina después del almacenamiento en condiciones extremas.

- 5 Por otra parte, la forma C de dihidrocloruro de tigeciclina se filtra mejor que las formas A y B de hidroclocloruro de tigeciclina y por lo tanto es especialmente adecuada para aislar dihidrocloruro de tigeciclina de la síntesis mediante filtración, especialmente en la producción a granel.

Por otra parte, la presente invención se refiere al uso de la forma cristalina C de dihidrocloruro de tigeciclina como un producto intermedio para preparar un medicamento antiinfeccioso.

- 10 La presente invención también se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden la forma cristalina C de dihidrocloruro de tigeciclina en una cantidad eficaz.

Además, la presente invención se refiere al uso de la forma cristalina C de dihidrocloruro de tigeciclina como un medicamento antiinfeccioso.

- 15 La invención se describe adicionalmente mediante referencia a los siguientes ejemplos. Estos ejemplos se proporcionan solamente con propósitos de ilustración y no están destinados a limitar la presente invención de ningún modo.

## EJEMPLOS

- 20 El difractograma de rayos X del polvo (XRPD) se tomó en un difractómetro de rayos X del polvo Unisantis XMD 300 con un detector sensible a la posición en una óptica de haces paralelos usando las siguientes condiciones de adquisición: ánodo tubular: Cu, 40 kV, 0,8 mA; 3 - 43°  $\theta/2\theta$ ; detección simultánea de regiones de 10° por etapa con resolución del detector 1024, tiempo de conteo 300 segundos por etapa. La muestra se midió a temperatura ambiente en un soporte para muestras estándar sobre un rotor para muestras. Una precisión típica de los valores 2- $\theta$  está en el intervalo de  $\pm$  aproximadamente 0,2° 2- $\theta$ . Así, un pico de difracción que aparece en 5,0° 2- $\theta$  puede aparecer entre 4,8 y 5,2° 2- $\theta$  en la mayoría de los difractómetros de rayos X bajo condiciones estándar.

- 25 El espectro infrarrojo (IR) se tomó en una cubeta MKII Golden Gate™ Single Reflection Diamond ATR (reflexión total atenuada) con un espectrómetro de FTIR Bruker Tensor 27 con resolución de 4 cm<sup>-1</sup> en condiciones ambiente. Para tomar un espectro, se aplicó una punta de espátula de la muestra a la superficie del diamante en forma de polvo. A continuación, la muestra se presionó sobre el diamante con un yunque de zafiro y se registró el espectro. Se usó un espectro del diamante limpio como espectro de fondo. Una precisión típica de los valores del número de onda está en el intervalo de aproximadamente  $\pm$  2 cm<sup>-1</sup>. Así, un pico infrarrojo que aparece en 1716 cm<sup>-1</sup> puede aparecer entre 1714 y 1718 cm<sup>-1</sup> en la mayoría de los espectrómetros infrarrojos bajo condiciones estándar.

- 35 Las cantidades de forma A de hidroclocloruro de tigeciclina y dihidrocloruro de tigeciclina amorfo en la forma C de dihidrocloruro de tigeciclina, presentadas en la Tabla 2, se estimaron por comparación de espectros infrarrojos experimentales procedentes de experimentos de cristalización con espectros teóricos calculados a partir de espectros de referencia normalizados de la forma C, la forma A y el dihidrocloruro amorfo. Un espectro de comparación de la forma C que contenía 30% de forma A se generó, p. ej., calculando 0,7 \* (espectro forma C) + 0,3 \* (espectro forma A) con la calculadora espectral del programa informático espectral de Bruker "OPUS". De este modo, los espectros teóricos de la forma C que contienen entre 10 y 90% de forma A de monohidrocloruro de tigeciclina, respectivamente dihidrocloruro de tigeciclina amorfo, se calcularon en etapas de 10%. A continuación, los espectros experimentales se compararon con estos espectros teóricos, especialmente en la región de 3700 - 3300 cm<sup>-1</sup>, para estimar la cantidad de forma A de hidroclocloruro de tigeciclina y dihidrocloruro de tigeciclina amorfo en la forma C de dihidrocloruro de tigeciclina.

### Ejemplo 1: Preparación de la forma cristalina C de dihidrocloruro de tigeciclina

- 45 Se preparó una suspensión añadiendo 190 ml de una mezcla de acetonitrilo/cloruro de metileno (85:15; v:v) a 2.038 mg de tigeciclina. La suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos. A continuación, 1,156 ml de ácido clorhídrico 5 N (2,1 equivalentes) en 1 ml de acetonitrilo se añadieron gota a gota lentamente a la suspensión. La mezcla se agitó a 70°C durante 20 horas, se enfrió hasta temperatura ambiente y se agitó adicionalmente durante 5 horas. El sólido se separó por filtración y se secó bajo vacío a temperatura ambiente para obtener 2.266 mg de la forma cristalina C de dihidrocloruro de tigeciclina (98,19% de pureza por HPLC; H<sub>2</sub>O KF: 1,7%).

- 50 **Ejemplo 2:** Preparación de la forma cristalina C de dihidrocloruro de tigeciclina

Se cargaron 40 ml de XAD1600 a una columna (20 mm de diámetro) y se lavaron con 200 ml de hidróxido sódico

acuoso al 4%, 250 ml de agua desmineralizada, 200 ml de ácido clorhídrico 0,1 M y de nuevo con 400 ml de agua desmineralizada. Se disolvieron 17,3 g de hidrocloreto de tigeclina bruto en 200 ml de agua para inyección y la solución obtenida se bombeó sobre la columna con de aproximadamente 350 a 400 ml/h. Se recogieron 85 ml de frente y se retiraron antes de que el pH disminuyera hasta 3-4. A dicho valor de pH, se recogió el eluato. Después de la adición de toda la solución de tigeclina, la columna se lavó finalmente con 400 ml de ácido clorhídrico 0,1 M.

La principal fracción recogida se transfirió a un reactor revestido doble Schmizo de 2 l antes de que se añadieran 488 ml de cloruro de metileno. Se ajustó un pH de  $8,0 \pm 0,1$  mediante la adición de 10 ml de hidróxido sódico acuoso al 20% mientras se agitaba vigorosamente. Después de agitar durante 10 minutos, las dos fases se separaron. La fase acuosa se lavó dos veces con 488 ml de cloruro de metileno, mientras el pH se mantenía a  $8,0 \pm 0,1$  mediante la adición bien de hidróxido sódico 0,1 M o bien de ácido clorhídrico 0,2 M. La fase acuosa obtenida se retiró. Las fases de cloruro de metileno recogidas se filtraron sobre un filtro ondulado antes de que el volumen se redujera hasta 500 ml en el evaporador giratorio (50-55°C, 500 mbar). A continuación, se añadieron 500 ml de acetonitrilo y la solución se redujo de nuevo hasta un volumen de 230 ml. La solución se transfiere a un reactor revestido doble Schmizo de 2 l y se añaden 845 ml de acetonitrilo para obtener un volumen total de 1.075 ml. La solución se ajustó hasta una cantidad de cloruro de metileno de 5% mediante la adición de aproximadamente 20 ml de cloruro de metileno. Se añadieron 0,2 g de dihidrocloreto de tigeclina (p. ej. obtenido del ejemplo 1) como cristales seminales y la tigeclina cristalizaba a temperatura ambiente antes de que se añadieran 7,8 ml de ácido clorhídrico 5 M en 50 ml de acetonitrilo a lo largo de un período de 15 a 20 minutos. La suspensión se agitó durante 16 horas a de 20 a 25°C mientras se observaba un cambio de color de amarillo a naranja. Para completar la cristalización, la suspensión se agitó adicionalmente durante 1 hora a de 0 a 5°C. El sólido se separó por filtración, se lavó con 80 ml de acetonitrilo frío y se secó bajo vacío a temperatura ambiente durante 16 horas para obtener 14 g de forma C de hidrocloreto de tigeclina cristalino.

### Ejemplo 3: Preparación de forma cristalina C de dihidrocloreto de tigeclina

Se cargaron 40 ml de XAD1600 a una columna (20 mm de diámetro) y se lavaron con 200 ml de hidróxido sódico acuoso al 4%, 250 ml de agua desmineralizada, 200 ml de ácido clorhídrico 0,1 M y de nuevo con 400 ml de agua desmineralizada hasta que se alcanzaba un  $\text{pH} \geq 5,0$ . Se disolvieron 17,3 g de hidrocloreto de tigeclina bruto en 200 ml de agua para inyección y la solución obtenida se bombeó sobre la columna con de aproximadamente 350 a 400 ml/h. Se recogieron 85 ml de frente y se retiraron antes de que el pH disminuyera hasta 3-4. A dicho valor de pH, se recogió el eluato. Después de la adición de toda la solución de tigeclina, la columna se lavó finalmente con 400 ml de ácido clorhídrico 0,1 M.

La principal fracción recogida se transfirió a un reactor revestido doble Schmizo de 2 l antes de que se añadieran 500 ml de cloruro de metileno. Se ajustó un pH de  $7,5 \pm 0,1$  mediante la adición de 10 ml de hidróxido sódico acuoso al 20% mientras se agitaba vigorosamente. Después de agitar durante 10 minutos, las dos fases se separaron. La fase acuosa se lavó dos veces con 500 ml de cloruro de metileno, mientras el pH se mantenía a  $7,5 \pm 0,1$  mediante la adición bien de hidróxido sódico 0,1 M o bien de ácido clorhídrico 0,2 M. La fase acuosa se retiró y las fases de cloruro de metileno combinada se lavaron con 500 l de agua. Las fases de cloruro de metileno se filtraron sobre un filtro ondulado antes de que se añadieran 1.400 ml de acetonitrilo bajo agitación. Se retiraron aproximadamente 900 ml de cloruro de metileno en el evaporador giratorio (50-55°C, 500-600 mbar) y, a una temperatura interna de aproximadamente 40°C, se añadieron 3,64 ml (2,0 equivalentes molares) de ácido clorhídrico concentrado (37%) en 100 ml de acetonitrilo en 5-10 minutos bajo agitación vigorosa. Después de la adición del ácido, el volumen se redujo hasta 1.050-1.060 ml en el evaporador giratorio ( $T_{\text{baño}} = 50-55^\circ\text{C}$ ,  $p = 500-600$  mbar) mientras la temperatura interna se mantenía a 40°C. Después de la destilación, la suspensión se enfrió hasta 20-25°C en una hora y se agitó adicionalmente a esta temperatura durante otra hora. Se observaba un cambio de color de amarillo a naranja. El sólido se separó por filtración, se lavó con 75 ml de acetonitrilo frío y se secó bajo vacío a 35°C durante 16 horas para obtener 13-15 g de forma C de dihidrocloreto de tigeclina cristalina.

### Ejemplo 4 Prueba de solubilidad en agua

Se usó un espectrofotómetro UV-vis Lambda 35 (Perkin-Elmer) ( $\lambda = 347$  nm, cubetas de cuarzo de 1,0 cm). Se usó el programa informático UV WinLab-5.1 de Perkin Elmer®.

Se preparó una solución saturada de tigeclina, hidrocloreto de tigeclina o dihidrocloreto de tigeclina en agua destilada y la suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos con una velocidad de agitación de 1.000 U/min. La suspensión se filtró a través de un filtro de 0,45  $\mu\text{m}$ . Finalmente, la solución resultante se diluyó 10.000 veces y se midió frente a agua a una longitud de onda de 347 nm.

Forma	Concentración [mg/ml]	Base usada [mg de equivalentes de base]
WO 2006/128150 ( <i>base libre</i> )		
I	201	206
II	170	280
III	174	198
IV	322	387
V	134	180
WO 2007/127292 ( <i>base libre</i> )		
I	54	156
II	76	198
WO 2008/066935 ( <i>base libre</i> )		
IX	141	177
XII	174	180
<b>Presente invención (sales de adición de ácido)</b>		
A (x HCl)	503	621
B (x HCl)	323	332
C (x 2HCl)	562	696

El ejemplo 5 muestra las condiciones de HPLC usadas en esta solicitud.

**Ejemplo 5: HPLC**

Aparato de HPLC, p. ej. Agilent 1200

- 5 Columna: HALO C18, 2,7  $\mu\text{m}$ , 100 x 4,6 mm (Advanced Material Technology Part. N° 92814-602)

Sistema: gradiente

Eluyente A: solución tamponadora pH 6,7

Eluyente B: solución tamponadora pH 6,7 / acetonitrilo = 1/1 (v/v)

Caudal: 1,5 ml/min

- 10 Temperatura del horno: 25°C

Volumen de inyección: 5 ml

Tiempo de parada: 12 min

Tiempo posterior: 3 min

# ES 2 528 490 T3

Detección:  $\lambda = 250 \text{ nm}$

Gradiente:

t (min)	0	5	10	11	12
%B	25	35	100	100	25

## REIVINDICACIONES

1. Forma cristalina C de dihidrocloruro de tigeciclina caracterizada por un difractograma de rayos X del polvo con picos en ángulos  $2\theta$  de  $4,7^\circ \pm 0,2^\circ$ ,  $7,6 \pm 0,2^\circ$ ,  $9,4 \pm 0,2^\circ$ ,  $10,4 \pm 0,2^\circ$ ,  $12,7 \pm 0,2^\circ$ ,  $14,4 \pm 0,2^\circ$ ,  $15,3 \pm 0,2^\circ$ ,  $20,7 \pm 0,2^\circ$ ,  $21,5 \pm 0,2^\circ$ ,  $23,2 \pm 0,2^\circ$ ,  $25,6 \pm 0,2^\circ$  y  $26,4 \pm 0,2^\circ$ .
- 5 2. Forma cristalina C de dihidrocloruro de tigeciclina según la reivindicación 1, caracterizada por un espectro infrarrojo con picos en números de onda de  $3274 \pm 2 \text{ cm}^{-1}$ ,  $2400 \pm 2 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1671 \pm 2 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1585 \pm 2 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1540 \pm 2 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1489 \pm 2 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1434 \pm 2 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1361 \pm 2 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1289 \pm 2 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1241 \pm 2 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1199 \pm 2 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1106 \pm 2 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1056 \pm 2 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1027 \pm 2 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1002 \pm 2 \text{ cm}^{-1}$ ,  $936 \pm 2 \text{ cm}^{-1}$ ,  $879 \pm 2 \text{ cm}^{-1}$ ,  $806 \pm 2 \text{ cm}^{-1}$ ,  $783 \pm 2 \text{ cm}^{-1}$  y  $716 \pm 2 \text{ cm}^{-1}$ .
- 10 3. Forma cristalina C de dihidrocloruro de tigeciclina según la reivindicación 1, que contiene menos de 50% de material amorfo o forma cristalina A de hidroclicloruro de tigeciclina.
4. Forma cristalina C de dihidrocloruro de tigeciclina según la reivindicación 1, que contiene menos de 25% de material amorfo o forma cristalina A de hidroclicloruro de tigeciclina.
5. Forma cristalina C de dihidrocloruro de tigeciclina según la reivindicación 1, que contiene menos de 5% de material amorfo o forma cristalina A de hidroclicloruro de tigeciclina.
- 15 6. Forma cristalina C de dihidrocloruro de tigeciclina según la reivindicación 1, en forma polimorfa esencialmente pura.
7. Un procedimiento para preparar la forma cristalina C de dihidrocloruro de tigeciclina según las reivindicaciones 1-6, que comprende las etapas de:
  - a) suspender tigeciclina en acetonitrilo o una mezcla de acetonitrilo con cloruro de metileno;
  - 20 b) añadir de 2,0 a 2,2 equivalentes de ácido clorhídrico a la suspensión;
  - c) agitar la suspensión a una temperatura que varía de temperatura ambiente al punto de ebullición del disolvente o la mezcla de disolventes usados;
  - d) aislar la forma cristalina C de dihidrocloruro de tigeciclina.
- 25 8. El procedimiento según la reivindicación 7, en el que la relación de acetonitrilo a cloruro de metileno varía de 99:1 a 80:20 (v:v).
9. Composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de la forma cristalina C de dihidrocloruro de tigeciclina según las reivindicaciones 1-6.
10. Forma cristalina C de dihidrocloruro de tigeciclina según las reivindicaciones 1-6, para el uso como un medicamento antiinfeccioso.
- 30 11. Uso de la forma cristalina C de dihidrocloruro de tigeciclina según las reivindicaciones 1-6 como un producto intermedio para la preparación de un medicamento antiinfeccioso.

Figura 1

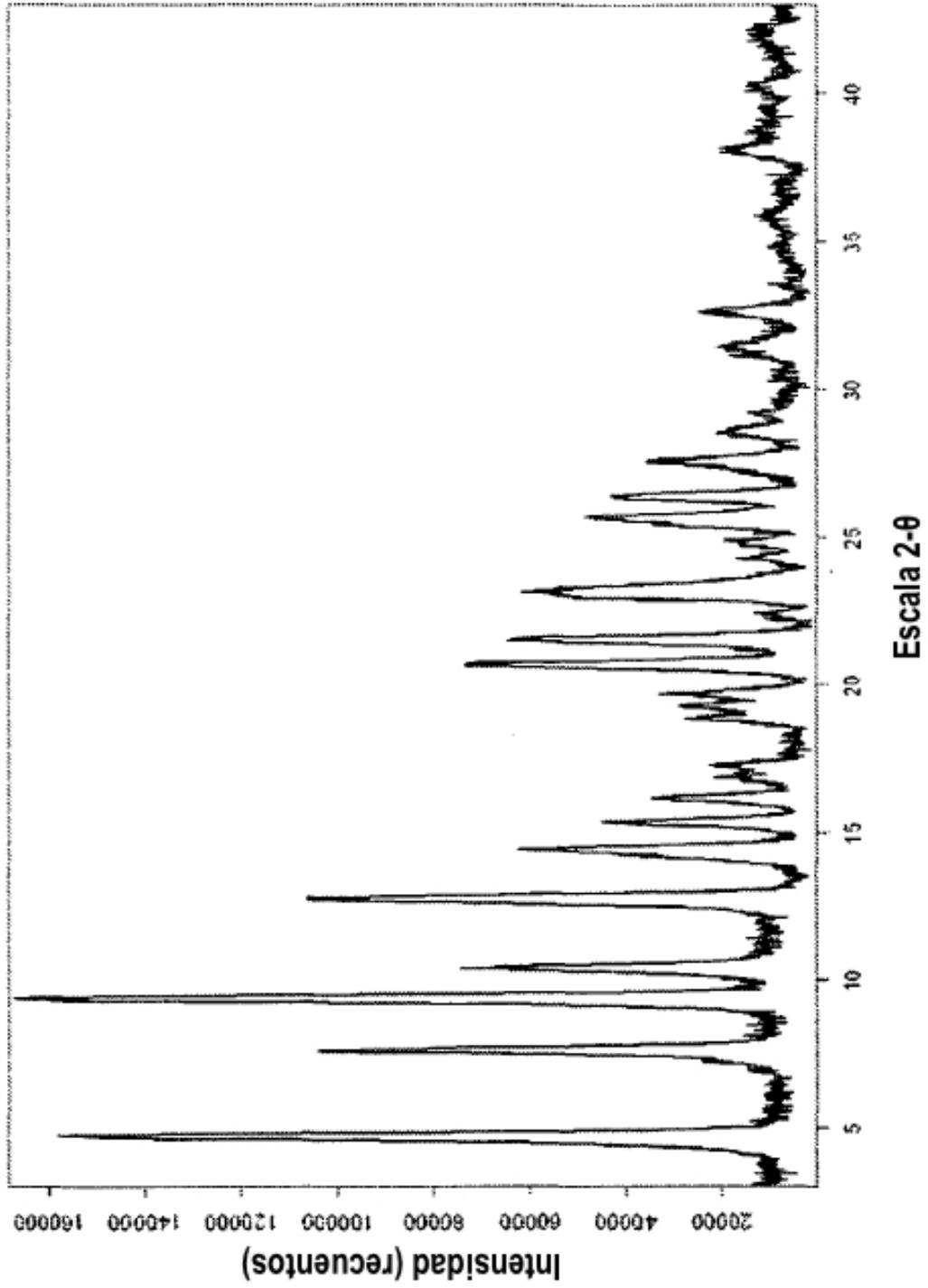


Figura 2

