



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 698 29 748 T2 2006.03.09

(12)

## Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) EP 0 975 349 B1

(21) Deutsches Aktenzeichen: 698 29 748.2

(86) PCT-Aktenzeichen: PCT/US98/03782

(96) Europäisches Aktenzeichen: 98 908 747.3

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: WO 98/040079

(86) PCT-Anmeldetag: 26.02.1998

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: 17.09.1998

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: 02.02.2000

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: 13.04.2005

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: 09.03.2006

(51) Int Cl.<sup>8</sup>: A61K 31/65 (2006.01)  
A61P 29/00 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

816551 13.03.1997 US

(84) Benannte Vertragsstaaten:

AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE

(73) Patentinhaber:

The Research Foundation of State University of  
New York, Albany, N.Y., US

(72) Erfinder:

SIMON, R., Sanford, Stony Brook, US; ROEMER,  
J., Elizabeth, Port Jefferson, US; GOLUB, M.,  
Lorne, Smithtown, US; RAMAMURTHY, S.,  
Nungavaram, Smithtown, US

(74) Vertreter:

LOUIS, PÖHLAU, LOHRENTZ, 90409 Nürnberg

(54) Bezeichnung: HEMMUNG DER SERINE PROTEINASE MITTELS HYDROPHOBEN TETRACYCLINS

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelebt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

## Beschreibung

**[0001]** Die Erfindung wurde von der Regierung durch das National Institute of Dental Research (NIH) unter DE 10 985 und R37-DE03987 unterstützt. Die Regierung hält bestimmte Rechte an der Erfindung.

### Hintergrund der Erfindung

#### 1. Gebiet der Erfindung

**[0002]** Die Erfindung betrifft die Verwendung eines hydrophoben Tetracyclins zur Hemmung von Serin-proteinase-Aktivität in biologischen Systemen. Insbesondere betrifft die Erfindung die therapeutische Verwendung eines 4-De-(dimethylamino)-tetracyclins zur Behandlung von Säugern, die an einer durch eine Entzündung vermittelte Gewebezerstörung aufgrund der Aktivität einer Serin-proteinase-Leukozyten-elastase leiden.

#### 2. Beschreibung des Stands der Technik

**[0003]** Eine Schädigung von Bindegewebe stellt eine hauptsächliche Komplikation der entzündlichen Reaktion dar. Derartige entzündliche Gewebebeschädigungen tragen beispielsweise zu den pathologischen Veränderungen an Gelenken bei Arthritisarten, in der Lunge bei Emphysemen und Atemnotsyndrom, in der Niere und im Verdauungstrakt beim Syndrom des multiplen Organversagens, im Zahnfleisch und Periodontium bei Perodontitis und im Herz und Gehirn bei Ischämie-Reperfusions syndrom bei. Proteasen, die von Leukozyten freigesetzt werden, spielen eine wichtige Rolle bei Gewebebeschädigungen in Verbindung mit entzündlichen Reaktionen.

**[0004]** Zwei Klassen von Proteasen werden mit entzündlichen Gewebebeschädigungen in Zusammenhang gebracht: Serin-proteinasen und Matrix-Metalloproteinasen (MMPs). Serin-proteinasen besitzen eine Substratspezifität und Art der Substratbindung, die sich völlig von der Substratspezifität und der Art der Substratbindung der MMPs unterscheiden.

**[0005]** Serin-proteinasen werden aufgrund ihrer Substratspezifität in drei Typen eingeteilt: trypsinartig, chymotrypsinartig und elastaseartig. Die Serin-proteinase Elastase bevorzugt Substrate mit kleinen aliphatischen Ketten (z. B. Ala, Val) in der P<sub>1</sub>-Position. P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub> und dergl. stellen Gruppen am natürlichen Substrat einer Protease dar, die die Spaltungsstelle des Substrats flankieren und von denen angenommen wird, dass sie an Unterkentren des Enzyms, die üblicherweise mit S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub> und dergl. bezeichnet werden, angepasst sind. Die Wirkungsweise von Serin-proteinasen umfasst die Aminosäure Serin, die eine Hydroxylgruppe aufweist, die als nucleophiles Agens für die hydrolytische Spaltung wirkt. Im Gegensatz dazu bewirkt bei Matrix-Metalloproteinasen ein Metall, bei dem es sich üblicherweise um Zink handelt, eine Koordination und Aktivierung der Zielprotein-Amidcarbonylgruppe für die Hydrolyse. Daher unterscheidet sich die Serin-proteinase Elastase von MMP-Elastase.

**[0006]** Es wurde ein beträchtlicher Aufwand zur Entwicklung von Inhibitoren der Serin-proteinase Elastase (humane Leukozyten-elastase oder HLE) getrieben, insbesondere aufgrund ihrer mutmaßlichen Rolle beim Mechanismus der Lungenschädigung im Zusammenhang mit Emphysemen und Atemnotsyndrom.

**[0007]** Eine Hemmung von humaner Leukozyten-elastase durch natürliche Nichtpeptid-Produkte, beispielsweise pentacyclische Triterpenoide pflanzlichen Ursprungs, insbesondere Ursolsäure, wird von Q-L. Ying et al. beschrieben; "Inhibition of Human Leucocyte Elastase by Ursolic Acid: Evidence for a Binding Site for Pentacyclic Triterpenes", Biochem. J., Bd. 277 (1991), S. 521–526.

**[0008]** Weitere humane Nichtpeptid-Leukozyten-elastase-Inhibitoren synthetischen Ursprungs, wie 4-(Methylsulfinyl)-phenyl-2,1-(1-methyl-2-pyrrolyl)-butyrat und verwandte Sulfid- und Sulfonderivate werden von R. T. Cunningham et al., "Synthesis and Evaluation of CE-0266: A New Human Neutrophil Elastase Inhibitor", Bioorganic Chemistry, Bd. 20 (1992), S. 345–355, beschrieben. Weitere Analoge dieser Verbindungen, bei denen es sich um HLE-Inhibitoren handelt, werden von G. P. Kirschenheuter et al., "Synthesis and Characterization of Human Neutrophil Elastase Inhibitors Derived From Aromatic Esters of Phenylalkanoic Acids", in Proteases, Protease Inhibitors and Protease-Derived Peptides, Birkhauser Verlag, Basel (1993), S. 71–82, beschrieben. Bei diesen Nichtpeptid-Verbindungen natürlichen oder synthetischen Ursprungs handelt es sich um niedermolekulare, hydrophobe, anionische Inhibitoren.

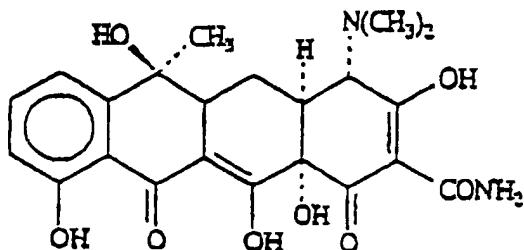
**[0009]** Es wird angenommen, dass niedermolekulare Inhibitoren von HLE vorzugsweise eine verlängerte hy-

drophobe Domäne mit einem Zentrum einer negativen Ladung aufweisen. Eine Analyse der dreidimensionalen Bindungsstelle von Leukozyten-elastase durch Röntgenkristallographie zeigt, dass die erweiterte Substrat-Bindungsstelle für dieses Enzym weitgehend von hydrophoben Resten eingefasst wird, wobei aber eine Arginin-Seitenkette (nicht direkt Teil der katalytischen Triade) in der Mitte dieses hydrophoben Milieus strukturell zur Stabilisierung der Struktur des aktiven Zentrums beiträgt. Es wird angenommen, dass hydrophobe, anionische Verbindungen sowohl auf Peptid- als auch auf Nichtpeptidbasis, die als Inhibitoren dienen können, an die erweiterte Substratbindungsstelle durch eine Kombination von hydrophoben Kräften und elektrostatischen Wechselwirkungen mit dem Argininrest binden.

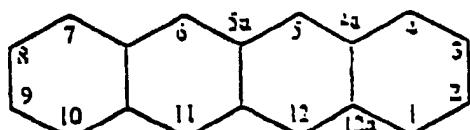
**[0010]** Weitere Beispiele für hydrophob-anionische Nichtpeptid-Inhibitoren von HLE sind Fettsäuren, Gallensäuren und Pyroltrisulfonsäure, die alle im Laboratorium von einem der Erfinder untersucht wurden; S. Simon, et al., "Inhibition of Human Neutrophil Elastase by Polyguanylic Acid and Other Synthetic Polynucleotides", *Adv. Exp. Med. Biol.*, Bd. 240 (1988), S. 65–74; S. C. Tyagi und S. R. Simon, "Inhibitors Directed to Binding Domains in Neutrophil Elastase", *Biochemistry*, Bd. 20 (1990), S. 9970–9977; S. Tyagi und S. R. Simon, "Painaric Acids as Probes of Binding Domains in Neutrophil Elastase", *J. Biol. Chem.*, Bd. 266 (1991), S. 15185–15191; S. Tyagi und S. R. Simon, "Interaction of Neutrophil Elastase With Hydrophobic Polyanionic Chelators", *Biochem. Cell Biol.*, Bd. 69 (1991), S. 624–629. Bei diesen Verbindungen handelt es sich durchweg um reversible Inhibitoren, die keine kovalenten Wechselwirkungen mit dem Enzym eingehen. Da sie an der erweiterten Substratbindungsstelle binden, stellen sie kompetitive Inhibitoren der enzymatischen Hydrolyse von größeren Oligopeptidsubstraten und Proteinen, wie Elastin, dar, jedoch keine nicht-kompetitiven Inhibitoren der Hydrolyse der kleinsten synthetischen Substrate, die nur in unmittelbarer Nähe der katalytischen Triade innerhalb des aktiven Zentrums binden.

**[0011]** Keine dieser Nichtpeptid-Verbindungen natürlichen oder synthetischen Ursprungs weist eine Ähnlichkeit mit Tetracyclin auf.

**[0012]** Tetracycline sind eine Klasse von Verbindungen, die insbesondere aufgrund ihrer frühen und spektakulären Erfolge als Antibiotika bekannt sind. Verbindungen, wie Tetracyclin, Sporocyclin und dergl., sind Breitbandantibiotika mit Eignung gegen eine Vielzahl von Bakterien und anderen Mikroorganismen. Die Ausgangsverbindung, nämlich Tetracyclin, weist die folgende allgemeine Struktur auf:



**[0013]** Die Nummerierung des mehrere Ringe umfassenden Kerns ist nachstehend angegeben:



**[0014]** Tetracyclin, sowie die 5-OH-Derivate (Oxytetracyclin, z. B. Terramycin<sup>TM</sup>) als auch die 7-Cl-Derivate (Chlortetracyclin, z. B. Aureomycin<sup>TM</sup>) kommen in der Natur vor und stellen gut bekannte Antibiotika dar. Zu halbsynthetischen Tetracyclinen gehören beispielsweise Doxycyclin, Minocyclin und Metacyclin. Die Verwendung von Tetracyclin-Antibiotika ist zwar zur Behandlung von Infektionen wirksam, kann aber zu unerwünschten Nebenwirkungen führen. Beispielsweise kann eine Langzeitverabreichung von antibiotischen Tetracyclinen eine gesunde Flora verringern oder beseitigen, z. B. die Darmflora, und kann zur Bildung von antibiotisch resistenten Organismen oder zu einem übermäßigen Wachstum von Hefen und Pilzen führen. Diese erheblichen Nachteile schließen typischerweise Behandlungsarten aus, die eine chronische Verabreichung dieser Verbindungen erfordern.

**[0015]** Natürliche Tetracycline können ohne Verlust ihrer antibiotischen Eigenschaften modifiziert werden, wobei aber bestimmte Elemente der Struktur erhalten bleiben müssen, um dies zu erreichen. Eine Klasse von Verbindungen wurde definiert, die strukturell mit den antibiotischen Tetracyclinen verwandt sind, deren antibi-

otische Aktivität aber in erheblichem Maße oder vollständig durch eine chemische Modifikation beseitigt werden ist. Die Modifikationen, die gegebenenfalls an der Tetracyclin-Grundstruktur vorgenommen werden können, werden von L. A. Mitscher, *The Chemistry of the Tetracycline Antibiotics*, Marcel Dekker, New York, (1978), Kapitel 6, in einem Übersichtsartikel beschrieben. Gemäß Mitscher kann die Modifikation an den Positionen 5–9 des Tetracyclin-Ringsystems vorgenommen werden, ohne den vollständigen Verlust von antibiotischen Eigenschaften zu verursachen. Jedoch führen Veränderungen an der Grundstruktur des Ringsystems oder ein Ersatz von Substituenten an den Positionen 1–4 oder 10–12 im allgemeinen zu synthetischen Tetracyclinen, die eine geringere oder im wesentlichen gar keine antibakterielle Aktivität besitzen.

**[0016]** Zu chemisch modifizierten Tetracyclinen (CMTs) gehören beispielsweise 4-De-(dimethylamino)-tetracyclin (CMT-1), Tetracyclononitril (CMT-2), 6-Demethyl-6-desoxy-4-de-(dimethylamino)-tetracyclin (CMT-3), 7-Chlor-4-de-(dimethylamino)-tetracyclin (CMT-4), Tetracyclinpyrazol (CMT-5), 4-Hydroxy-4-de-(dimethylamino)-tetracyclin (CMT-6), 4-De-(dimethylamino)-12a-desoxytetracyclin (CMT-7), 6-Desoxy-5a-hydroxy-4-de-(dimethylamino)-tetracyclin (CMT-8), 4-De-(dimethylamino)-12a-desoxyanhydrotetracyclin (CMT-9) und 4-De-(dimethylamino)-minocyclin (CMT-10).

**[0017]** Zu weiteren Beispielen für Tetracycline, die zur Erzielung einer verringerten antimikrobiellen Aktivität modifiziert sind, gehören die 4-Epimeren von Oxytetracyclin und Chlortetracylin (epi-Oxytetracyclin und epi-Chlortetracyclin).

**[0018]** Von bestimmten Tetracyclinen wurde gezeigt, dass sie Matrix-Metalloproteininasen unterdrücken. Die Laboratorien von zwei der Erfinder waren in wesentlichem Umfang bei der Identifizierung von Tetracyclinen als eine Familie von Verbindungen, die MMPs unabhängig von der antibiotischen Tetracyclin-Aktivität hemmen können, beteiligt. Die US-Patente 5 459 135 (Golub et al.), 5 321 017 (Golub et al.), 5 308 839 (Golub et al.), 4 935 412 (McNamara et al.), 4 704 383 (McNamara et al.) und 4 666 897 (Golub et al.) beschreiben die Verwendung von nicht-antimikrobiellen Tetracyclinen zur Behandlung von gewebezerstörenden Zuständen, chronischen Entzündungen und anderen Zuständen in Verbindung mit einer übermäßigen Metalloproteinase-Aktivität von Matrix-Metalloproteininasen, wie Kollagenase, Gelatinase und MMP-Elastase.

**[0019]** Die Hemmung der Aktivität von Matrix-Metalloproteininasen durch Tetracycline wird in einer Reihe von Studien gezeigt, bei denen Versuchstiere beteiligt sind, bei denen eine Periodontitis iatrogen durch Infektion mit oralen Pathogenen herbeigeführt wird oder bei denen eine periodontale Bänderatrophie durch Zerstörung von pankreatischen Inseln herbeigeführt wird, wodurch sich eine pathologische Erhöhung der MMP-Aktivität an den Stellen der Gewebeschädigung ergibt. Eine Behandlung dieser Tiere mit halbsynthetischen Tetracyclinen, bei denen die antibiotische Aktivität erhalten geblieben ist, sowie mit chemisch modifizierten Tetracyclinen, die frei von jeglicher antibiotischer Aktivität sind, führt zu einer ausgeprägten Verringerung der MMP-Spiegel an den Stellen der Gewebeschädigung sowie zu einer ausgeprägten Besserung des Periodontiums bei den Tieren; vergl. z. B. K. M. Chang et al., "Local and Systemic Factors in Periodontal Disease Increase Matrix-Degrading Enzyme Activities in Rat Gingiva: Effect of Minocycline Therapy", *Research Communications in Molecular Pathology and Pharmacology*, Bd. 91 (1996), S. 303–318; M. E. Ryan, et al., "Matrix Metalloproteinases and Their Inhibition in Periodontal Treatment", *Current Opinion in Periodontology*, Bd. 3 (1996), S. 85–96.

**[0020]** Jedoch wurde bei dieser miteinander im Zusammenhang stehenden Reihe von Studien festgestellt, dass zwar verschiedene modifizierte Tetracycline die Aktivität von Matrix-Metalloproteinase-elastase hemmten, die Tetracycline, die damals charakterisiert wurden, jedoch nicht die in vitro-Serin-proteinase-Elastase-Aktivität weder von Ratten-PMNs oder humaner Synovialhaut hemmten; vergl. z. B. L. Golub et al., "Tetracyclines Inhibit Connective Tissue Breakdown: New Therapeutic Implications For an Old Family of Drugs", *Crit. Rev. Oral Biol. Med.*, Bd. 2 (1991), S. 297–322, S. 300 und 301.

**[0021]** Metalloproteininasen und Serin-proteininasen können unter Zusammenwirken eine Zerstörung eines Großteils der Elemente der extrazellulären Matrix, einschließlich interstitielles Stroma und Basalmembranen, hervorrufen. Bei dieser Wechselwirkung können folgende Wirkungen eintreten: 1) Cathepsin G (eine Serin-proteinase), kann MMP-8 aktivieren; 2) humane Leukozyten-elastase (eine Serin-proteinase) kann die hauptsächlichen endogenen Gewebeinhibitoren von Matrix-Metalloproteininasen (TIMPs) inaktivieren; und 3) MMB-8 und MMP-9 können den  $\alpha_1$ -Proteinase-Inhibitor ( $\alpha_1$ -PI), den hauptsächlichen endogenen Inhibitor von humaner Leukozyten-elastase, inaktivieren; vergl. S. K. Mallya, et al., "Interaction of Matrix Metalloproteinases With Serine Protease Inhibitors", *Annals of the New York Academy of Science*, Bd. 732 (1994), S. 303–314; und A. R. Rinehart et al., "Human  $\alpha$ -Proteinase Inhibitor Binds to Extracellular Matrix In Vitro", *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, Bd. 9 (1993), S. 666–679. Somit können die beiden Klassen von Proteininasen durch einen Beitrag zur Protease-Aktivierung und durch Inaktivierung der endogenen Inhibitoren das Protease-Antiprotease-

se-Gleichgewicht in Richtung zu einem pathologischen Gewebeabbau verschieben. Obgleich die Enzyme unter normalen Bedingungen reguliert werden, kann ein Zusammenbruch des Kontrollmechanismus zu verschiedenen Krankheitszuständen führen, die durch eine übermäßige Aktivität von Serin-proteinase gekennzeichnet sind.

**[0022]** Beispielsweise kann unter Bedingungen einer Infiltration einer großen Anzahl von Neutrophilen, wie es z. B. bei Atemnotsyndrom auftreten kann, wobei die endogenen Konzentrationen von  $\alpha_1$ -PI nicht in wirksamer Weise die Konzentrationen von humaner Leukozyten-Elastase neutralisieren können, das Protease-Antiprotease-Gleichgewicht so verschoben werden, dass der Schutz der endogenen Antielastase nicht ausreicht, um einen Schutz gegen durch HLE vermittelte Schädigung zu gewährleisten.

**[0023]** Ein exogener Proteinase-Inhibitor, der dazu befähigt ist, das Protease-Antiprotease-Gleichgewicht wieder herzustellen, wurde bisher nicht aufgefunden.

#### Zusammenfassende Darstellung der Erfindung

**[0024]** Demzufolge wird erfindungsgemäß die Verwendung eines hydrophoben Tetracyclins zur Herstellung einer Zusammensetzung zum Hemmen von übermäßiger Leukozyten-elastase-Aktivität in einem biologischen System bereitgestellt, wobei das hydrophobe Tetracyclin 6-Demethyl-6-desoxy-4-de-(dimethylamino)-tetracyclin (CMT-3) umfasst.

**[0025]** Erfindungsgemäß wird ferner die Verwendung eines hydrophoben Tetracyclins zur Herstellung einer Zusammensetzung zum Behandeln eines Subjekts, das unter Gewebeschädigung aufgrund von übermäßiger Leukozyten-elastase-Aktivität leidet, bereitgestellt, wobei das hydrophobe Tetracyclin 6-Demethyl-6-desoxy-4-de-(dimethylamino)-tetracyclin (CMT-3) umfasst.

**[0026]** 6-Demethyl-6-desoxy-4-de-(dimethylamino)-tetracyclin wird einem Säuger in einer ausreichenden Menge verabreicht, um die Aktivität von Leukozyten-elastase zu hemmen, wodurch die entzündliche Zerstörung im Zusammenhang mit der Aktivität von Leukozyten-elastase verringert wird. Beim Säuger handelt es sich vorzugsweise um einen Menschen, wobei aber auch andere Tiere in vorteilhafter Weise behandelt werden.

**[0027]** Die Erfindung eignet sich sowohl für pharmazeutische als auch für kosmetische Zwecke. Der Inhibitor weist erhebliche Vorteile als therapeutisches Mittel, das das Protease-Antiprotease-Gleichgewicht wieder herstellt, auf.

#### Kurze Beschreibung der Zeichnungen

**[0028]** [Fig. 1](#) ist ein Balkendiagramm der Hemmung des durch humane Neutrophile vermittelten Abbaus der extrazellulären Matrix durch 11 verschiedene Tetracycline gemäß der Erörterung in Beispiel 1. Eine Untersuchung der Dosisabhängigkeit dieser Hemmung ist in Tabelle 1 dargelegt.

**[0029]** [Fig. 2](#) ist ein Balkendiagramm zur Erläuterung der vergleichsweisen Hemmung des durch humane Neutrophile vermittelten und durch humane Leukozyten-elastase vermittelten Abbaus von extrazellulärer Matrix durch CMT-3 ((COL-3) gemäß der Erörterung in den Beispielen 1 und 2.

**[0030]** [Fig. 3A](#), B und [Fig. 4A](#), B erläutern Dixon-Diagramme ([Fig. 3A](#) und [Fig. 4A](#)) und Cornish-Bowden-Diagramme ([Fig. 3B](#) und [Fig. 4B](#)) der Hemmung der amidolytischen Aktivität von humaner Leukozyten-elastase durch CMT-3 (COL-3) gemäß der Erörterung in Beispiel 2. Der Abschnitt der Dixon-Diagramme über der X-Achse und die parallelen Steigungen der Cornish-Bowden-Diagramme bestätigen, dass CMT-3 (COL-3) einen kompetitiven Inhibitor der amidolytischen Aktivität von humaner Leukozyten-elastase gegenüber dem chromogenen Oligopeptidsubstrat Methoxysuccinyl-Ala-Ala-Pro-Val-p-nitroanilid darstellt.

**[0031]** [Fig. 5](#) zeigt ein Dixon-Diagramm der amidolytischen HLE-Aktivität in Gegenwart von Doxycyclin, woraus sich nur eine sehr schwache Hemmung durch dieses Tetracyclin im Gegensatz zu CMT-3 ergibt, wie in Beispiel 2 erläutert wird.

**[0032]** [Fig. 6](#) ist ein Balkendiagramm zur Erläuterung der Fähigkeit von oral verabreichtem CMT-3 zur Verringerung der Leukozyten-elastase-Aktivität in Zahnfleisch-Gewebeextrakten von Ratten, die Injektionen von bakteriellem Lipopolysaccharid in das Zahnfleisch erhalten hatten, um lokale Entzündungen hervorzurufen (Beispiel 3).

## Ausführliche Beschreibung der Erfindung

**[0033]** Erfindungsgemäß weist ein hydrophobes Tetracyclin eine wirksame Hemmaktivität gegen die Serin-proteinase Elastase auf.

**[0034]** Humane Leukozyten-elastase (HLE) und Cathepsin G sind Serin-proteinasen, die in azuropheilen Granulien von humanen, polymorphonuklearen Leukozyten (Neutrophilen) auftreten. Diese Elastase wird gelegentlich als humane Neutrophilen-elastase (HNE) bezeichnet. Beim natürlichen Substrat Elastin handelt es sich um ein flexibles Protein, das hochgradig durch Desmosin und  $\alpha$ -Iodesmosin und andere vernetzende Reste vernetzt ist. Die Serin-proteinase Elastase ist zum Abbau von elastischen Fasern, Typ IV-Kollagen (das in der Basalmembran von Blutgefäßen auftritt), Typ III-Kollagen, das im Zahnfleisch und glatten Muskeln auftritt, Proteoglycanen, Haftglycoproteinen, wie Fibronectin und Laminin, TIMPs und anderen Proteinkomponenten von Bindegewebe und interstitieller Flüssigkeit befähigt.

**[0035]** Die Serin-proteinase humane Leukozyten-elastase (HLE) hat das Potential zur Gewebezerstörung bei zahlreichen Krankheitszuständen, wie Arthritis, periodontaler Krankheit, Glomerulonephritis, akuter Lungenkrankheit, zystischer Fibrose und einigen malignen Krebsarten, die durch die Invasion der extrazellulären Matrix durch Tumorzellen gekennzeichnet sind. Man nimmt eine Beteiligung der HLE-Aktivität beim septischen Schock, beim multiplen Organversagen (MOF) und bei einer Myocard-Ischämie-Reperfusionsschädigung an. Für HLE wird auch eine Beteiligung beim Mechanismus von Lungenschädigungen in Verbindung mit Emphysemen und Atemnotsyndrom bei Erwachsenen (ARDS) angenommen. Man nimmt an, dass die Lungenschädigung zumindest teilweise durch ein Ungleichgewicht zwischen Proteasen und endogenen Antiproteininasen (z. B. TIMP und  $\alpha_1$ -PI) verursacht wird. Die hauptsächliche endogene Antiproteinase, die Leukozyten-elastase hemmt, ist  $\alpha_1$ -PI.

**[0036]** Es wurde nunmehr festgestellt, dass ein chemisch modifiziertes Tetracyclin zur Erzielung einer Hemmwirkung gegen Leukozyten-Elastase verwendet werden kann. Beim Tetracyclin handelt es sich um ein hydrophobes 4-De-(dimethylamino)-tetracyclin, insbesondere um 6-Demethyl-6-desoxy-4-de-(dimethylamino)-tetracyclin (CMT-3). Eine Hemmung von HLE verringert nicht nur die durch dieses Enzym verursachte direkte Gewebeschädigung, sondern hält auch die Konzentrationen der TIMPs aufrecht, wodurch die endogenen Inhibitoren von MMPs in ihrem aktiven Zustand gehalten werden.

**[0037]** Die Hemmung von Neutrophilen-proteasen unter Verwendung von nicht-antibakteriellen Tetracyclinen bringt eine wirksame Reaktion gegen Infektionen nicht in merklichem Umfang in Gefahr, da es nicht wahrscheinlich ist, dass diese Verbindung bei Verwendung in Dosen, die in Übereinstimmung mit ihrer in vitro-Hemmaktivität stehen, die Fähigkeit von Neutrophilen zur Extravasation und zur Invasion des interstitiellen Stomas in Reaktion auf Chemoattraktionsmittel, die an Stellen von bakteriellen Infektionen erzeugt werden, beeinträchtigt.

**[0038]** Es wurde nunmehr festgestellt, dass bestimmte CMTs und insbesondere CMT-3 eine erhebliche Hemmaktivität gegen Leukozyten-elastase entfalten, während Minocyclin, Doxycyclin und andere chemisch modifizierte Tetracycline keine wesentliche Hemmwirkung gegen Leukozyten-elastase aufweisen.

**[0039]** Die Aktivität verschiedener Tetracycline wurde unter Anwendung eines in vitro-Tests der entzündlichen Gewebeschädigung untersucht, bei dem man humane Neutrophile einen Abbau einer biosynthetisch hergestellten, vollständigen, interstitiellen, stromalen, extrazellulären Matrix (ECM) vornehmen lässt. Bei einem Neutrophilen handelt es sich um einen Leukozytentyp (polymorphe nukleare Leukozyten). Untersuchungen mit diesem experimentellen System zeigen, dass der durch Neutrophile vermittelte Abbau dieses ECM praktisch vollständig durch Zugabe von  $\alpha_1$ -PI, das einen starken Inhibitor der Leukozyten-elastase sowie ein kompetitives Substrat für die MMPs darstellt, gehemmt werden kann; E. J. Roemer, K. J. Stanton und S. R. Simon, "In Vitro Assay Systems for Inflammatory Cell-Mediated Damage to Interstitial Extracellular Matrix", In Vitro Toxicol., Bd. 7 (1994), S. 75–81; E. J. Roemer, K. J. Stanton, und S. R. Simon, "In Vitro Assay Systems for Cell Interactions With Interstitial Extracellular Matrix", In Vitro Toxicol., Bd. 7 (1994), S. 209–224. Beim Test der Tetracycline (Beispiel 1) auf ihre Fähigkeit zur Hemmung des ECM-Abbaus in diesem System in einer Dosis von beispielsweise 30  $\mu$ M erwies sich CMT-3 gegenüber in Bezug auf den Schutz der ECM gegen eine durch Neutrophile vermittelte Zerstörung als weit überlegen, wie in [Fig. 1](#) dargestellt ist. Bei weiteren Dosis-Reaktions-Studien unter Anwendung dieses in vitro-Tests lässt sich eine annähernd 50%ige Hemmung des durch Neutrophilen vermittelten ECM-Abbaus mit 25–50  $\mu$ M erreichen. Die meisten anderen Tetracycline, die über den gleichen Dosisbereich hinweg getestet wurden, sind unfähig, mehr als ~20% des durch Neutrophile vermittelten ECM-Abbaus bei diesem Test zu hemmen.

**[0040]** Eine direkte Hemmung von HLE durch CMT-3 wurde unter Anwendung einer Modifikation des Tests auf Aktivität von humaner Leukozyten-elastase (HLE) bestimmt. Dieser Test wurde von Ying et al. (Q. Ying, A. R. Rinehart, S. R. Simon und J. C. Cheronis, "Inhibition of Human Leukocyte Elastase by Ursolic Acid: Evidence for a Hydrophobic Binding Site for Pentacyclic Triterpenes", Biochem. J., Bd. 277 (1991), S. 521–526) beschrieben. Dabei wurden die Konzentrationen an organischem Lösungsmittel und Detergents verringert, wobei man sich eines herkömmlichen Tests auf die Aktivität von humaner Leukozyten-elastase (HLE) durch Messung der Amidolyse des chromogenen Oligopeptidsubstrats Methoxysuccinyl-Ala-Ala-Pro-Val-p-nitroanilid bediente. Von diesem Oligopeptid wird im allgemeinen angenommen, dass es die ersten fünf Unterzentren der erweiterten Substratbindungsdomäne in HLE besetzt. Unter Anwendung einer Kombination von Dixon- und Cornish-Bowden-Diagrammen zur Analyse der Geschwindigkeitsdaten auf die gleiche Weise, wie sie früher für andere Nichtpeptid-elastase-Inhibitoren von Ying et al. (Biochem. J., Bd. 277 (1991), S. 521–526) beschrieben wurde, zeigen wir, dass CMT-3 einen vorwiegend kompetitiven Inhibitor der Amidolyse von Methoxysuccinyl-Ala-Ala-Pro-Val-p-nitroanalid mit einem scheinbaren  $K_i$ -Wert von 18–40  $\mu\text{M}$  darstellt, wie in den [Fig. 3A](#), B und [Fig. 4A](#), B gezeigt wird.

**[0041]** Im Gegensatz dazu stellt Doxycyclin, das in vitro zur Hemmung der MMP-8-Aktivität mit einem  $K_i$ -Wert von 25–50  $\mu\text{M}$  befähigt ist, nur einen sehr schwachen Inhibitor von HLE dar, wobei der  $K_i$ -Wert mehr als 300  $\mu\text{M}$  beträgt, wie die Steigung des Dixon-Diagramms in [Fig. 5](#) zeigt. Wenn CMT-3 im Test des ECM-Abbaus, der durch gereinigte HLE statt durch lebende Neutrophile vermittelt wird, eingesetzt wird, erweist es sich als wirksamer Inhibitor mit einem scheinbaren  $I_{50}$ -Wert von ~25–50  $\mu\text{M}$ .

**[0042]** In vivo-Tests (Beispiel 3) zeigten, dass die Verabreichung von CMT-3 an Ratten, bei denen eine akute periodontale Entzündung durch Verabreichung von Endotoxin herbeigeführt worden war, die Aktivität von Leukozyten-elastase verringerte, wie durch einen amidolytischen Test mit dem Substrat Succinyl-Ala-Ala-Ala-p-nitroanilid gezeigt wurde.

**[0043]** Die Bedingungen, die erfindungsgemäß behandelt werden können, treten bei Säugetiersubjekten auf. Humane Patienten stellen bei weitem die wichtigsten Subjekte dar, jedoch kann das Verfahren auch zum Nutzen anderer Säuger, einschließlich Haustiere, wie Hunde und Katzen, und Laboratoriumstiere, wie Ratten und Mäuse, sowie landwirtschaftlich genutzter Tiere eingesetzt werden.

**[0044]** Die Erfindung kann zur Behandlung von Subjekten verwendet werden, die an einer Gewebeschädigung aufgrund einer übermäßigen Aktivität von humaner Leukozyten-elastase leiden, z. B. bei einigen Lungenkrankheiten und Nierenkrankheiten. Zu Lungenkrankheiten dieses Typs gehören zystische Fibrose, Emphysem, Atemnotsyndrom bei Erwachsenen als eine Komplikation eines Polytraumas, Operationsbelastungen, Sepsis oder als eine Komponente von multiplem Organversagen, sowie akute Lungenschädigungen aufgrund einer Inhalation von Giftstoffen, wie Säuren, Chemikalien, industriellen und militärischen Giften sowie Rauch und anderen toxischen Verbrennungsprodukten. Zu Nierenkrankheiten dieses Typs gehören Glomerulonephritis und akutes Nierenversagen sowie eine Komplikation bei einem Polytrauma oder bei Sepsis oder als eine Komponente von multiplem Organversagen.

**[0045]** Die Erfindung kann auch zur Behandlung von Läsionen und entzündlichen Hautkrankheiten verwendet werden, bei denen eine ausgeprägte Infiltration der Dermis-Epidermis-Verbindungsstelle durch Neutrophile beteiligt ist und sich eine Trennung der Dermis-Epidermis-Verbindung ergibt. Derartige Zustände können immunologischen Ursprungs sein (autoimmun oder als Folge von Arzneistoffreaktionen) oder sie können durch ein bakterielles Toxin ausgelöst werden (wie bei "scalded skin" von Kindern). Es ist in hohem Maße wahrscheinlich, dass Leukozyten-elastase bei diesen Zuständen zur Zerstörung der Dermis-Epidermis-Verbindungsstelle beiträgt. Bei einigen Läsionen, die durch chemische Blasenbildungsmittel (sowohl durch industrielle als auch durch militärische Belastung) ausgelöst werden, wobei eine Infiltration von Neutrophilen und eine Trennung der Dermis-Epidermis-Verbindung erfolgen, kann ebenfalls Leukozyten-elastase beteiligt sein, so dass diese Läsionen ebenfalls Kandidaten für eine CMT-3-Therapie darstellen. Bei einigen Augenläsionen stellt ebenfalls eine Neutrophilen-Infiltration eine Komponente der Schädigung dar, so dass diese Läsionen in wirksamer Weise mit einer Antiproteinase, wie CMT-3, behandelt werden können.

**[0046]** Die Erfindung beinhaltet die Verabreichung der Tetracyclinverbindung in einer Menge, die eine Verringerung oder Hemmung unerwünschten Folgen in Verbindung mit einer übermäßigen Leukozyten-elastase-Aktivität bewirkt. Die bevorzugte Tetracyclinverbindung ist chemisch so modifiziert, dass seine antimikrobiellen Eigenschaften verringert oder beseitigt sind. Ein derartiges, chemisch modifiziertes Tetracycline kann in höheren Konzentrationen als antimikrobielle Tetracycline eingesetzt werden, wobei bestimmte Nachteile, wie das unterschiedslose Abtöten von nützlichen Mikroorganismen, das häufig mit der Verwendung von antimikro-

biellen oder antibakteriellen Mengen derartiger Verbindungen einhergeht, vermieden wird.

**[0047]** Die maximale Dosis für ein Subjekt ist die höchste Dosis, die keine unerwünschten oder unverträglichen Nebenwirkungen hervorruft. Beispielsweise kann die Tetracyclinverbindung in einer Menge von etwa 0,1 mg/kg/Tag bis etwa 24 mg/kg/Tag und vorzugsweise von etwa 2 mg/kg/Tag bis etwa 18 mg/kg/Tag verabreicht werden. Für die Zwecke der vorliegenden Erfindung gehören zu Nebenwirkungen eine klinisch signifikante antimikrobielle oder antibakterielle Aktivität sowie toxische Wirkungen. Beispielsweise würde eine Dosis von mehr als etwa 50 mg/kg/Tag bei den meisten Säugern, einschließlich des Menschen, Nebenwirkungen hervorrufen. In jedem Fall lässt sich der behandelnde Arzt vom entsprechenden Fachwissen leiten. Die vorliegende Erfindung umfasst ohne Beschränkung Dosierungen, die zur Erzielung der beschriebenen Erscheinungen wirksam sind.

**[0048]** Die bevorzugte pharmazeutische Zusammensetzung zur erfindungsgemäßen Verwendung umfasst eine Kombination der Tetracyclinverbindung in einem geeigneten pharmazeutischen Träger, der dem Anwender geläufig ist.

**[0049]** Für die vorstehend beschriebenen pharmazeutischen Zwecke kann das erfindungsgemäße Tetracyclin per se in pharmazeutischen Präparaten gegebenenfalls mit bekannten, pharmazeutisch verträglichen Adjuvantien oder Trägern zubereitet werden. Diese Präparate können gemäß herkömmlichen chemischen Verfahren hergestellt und intern, z. B. oral durch Tabletten oder Flüssigkeiten, oder durch Suppositorien; parenteral, z. B. intravenös, intramuskulär oder subkutan, in Form von injizierbaren Lösungen oder Suspensionen; topisch oder in Form eines Sprühmittels oder Aerosols von Tröpfchen innerhalb des Atmungsbereiches für eine Inhalation in der Lunge und den Luftwegen verabreicht werden. Derartige Aerosole können Träger, wie pulmonale Tensidzubereitungen, die zusätzlich zur therapeutischen Wirksamkeit beitragen, umfassen. Man kann sich einer zeitlich abgestimmten oder kontrollierten Verabreichung bedienen.

**[0050]** Pharmazeutische oder kosmetische Präparate enthalten eine wirksame Menge des Tetracyclins, die eine Hemmung einer Serin-proteinase und insbesondere von Leukozyten-elastase bewirkt.

**[0051]** Gemäß einer weiteren Ausführungsform kann das Tetracyclin als ein Mittel in kosmetischen Präparaten, wie Hautcremes und Lotionen, kosmetischen Masken, kosmetischen Umschlägen, kosmetischen Verbänden und Shampoos für kosmetische Behandlungen verwendet werden. Es ist darauf hinzuweisen, dass der Ausdruck "kosmetisch" sich auf eine Betonung oder Besserung des physischen Erscheinungsbilds bezieht.

**[0052]** Für eine topische oder kosmetische Anwendung umfassen geeignete Zubereitungen (ohne Beschränkung hierauf) Liposomen, Lösungen, Suspensionen, Emulsionen, Cremes, Salben, Pulver, Einreibemittel, Aerosole und dergl., die gegebenenfalls sterilisiert und/oder mit Hilfsstoffen, wie Konservierungsmitteln, Stabilisatoren, Netzmitteln, Puffern oder Salzen zur Beeinflussung des osmotischen Drucks und dergl., vermischt werden.

**[0053]** Es ist darauf hinzuweisen, dass die tatsächlichen bevorzugten Mengen des Wirkstoffes in einem speziellen Fall je nach den speziellen formulierten Zusammensetzungen, der Anwendungsart und den speziellen Behandlungsstellen und zu behandelnden Subjekten variieren. Dosierungen werden auf der Grundlage herkömmlicher Überlegungen festgelegt, z. B. durch einen üblichen Vergleich der unterschiedlichen Aktivitäten zwischen den Zubereitungen und einem bekannten Mittel, z. B. mittels eines geeigneten herkömmlichen pharmakologischen oder kosmetischen Verfahrens.

**[0054]** Für kosmetische Zwecke können zusammen mit dem Tetracyclin zahlreiche weitere biologisch verträgliche oder biologisch inerte Materialien einverleibt werden. Der Ausdruck "biologisch verträglich" bedeutet eine nicht-toxische oder nicht-schädigende Beschaffenheit gegenüber humanem und nicht-humanem Gewebe. Zu diesen zusätzlichen Materialien gehören beispielsweise Feuchthaltemittel, d. h. Substanzen mit Affinität für Wasser, wie Glycerin, Propylenglykol oder Isopropanolpropylenglykol, organische oder anorganische Salze, wie quaternäre Ammoniumverbindungen und Zinksalze, Alkohole, wie Benzylalkohol oder niedere aliphatische Alkohole, polymere Latices, Füllstoffe, wie Siliciumdioxid und Talcum, Öle, wie Mineralöl, Rizinusöl und Petrolatum, Netz- oder Dispergiermittel oder Tenside, z. B. Blockcopolymeren von Ethylenoxid und Propylenoxid, Farbstoffe, Duftstoffe, Pigmente, Zinkoxid, Titandioxid, topische Medikamente, wie Methylsalicylat, Nicotinate, Capsaicin und Menthol, Antiakne-Medikamente, wie Benzoylperoxid, Resorcin und Retinoesäure, topische antibakterielle Mittel, wie Silbersulfadiazin, andere Tetracycline und Cefazolin, Hauthydratisierungsmittel, wie Natriumpyrrolidin carbonsäure und UV-A- und/oder UV-B-Strahlung absorzierende Sonnenschutzmittel, wie p-Aminobenzoësäure (PABA) oder 2-Ethylhexyl-4-N,N-dimethylaminobenzoat (Padimat O). Substrate

können ebenfalls verwendet werden, um eine Verstärkung, eine Gas- oder Flüssigkeitsbarriere oder einen Schutz des Behandlungsbereichs zu gewährleisten. Die Substrate unterliegen praktisch keinen Beschränkungen und umfassen polymere Filme, Metallfolien, Cellulosematerialien und andere natürliche oder synthetische Materialien.

**[0055]** Die folgenden Beispiele tragen zum weiteren Verständnis der Erfindung bei und sollen in keiner Weise eine Beschränkung des angemessenen Schutzmfangs darstellen.

#### Beispiel 1

**[0056]** Die Serin-proteinase-Hemmaktivität von Tetracyclinen wurde unter Anwendung eines in vitro-Tests einer entzündlichen Gewebeschädigung getestet, bei dem man einen Abbau einer biosynthetisch hergestellten, vollständigen, interstitiellen, stromalen, extrazellulären Matrix (ECM), die durch gezüchtete glatte R22-Rattenherz-Muskelzellen erzeugt worden war, durch humane Neutrophile (lebende PMNs) gemäß den Angaben von Roemer et al. abbauen ließ (E. J. Roemer, K. J. Stanton und S. R. Simon, "In Vitro Assay Systems for Inflammatory Cell-Mediated Damage to Interstitial Extracellular Matrix", In Vitro Toxicol., Bd. 7 (1994), S. 75–81; E. J.

**[0057]** Roemer, K. J. Stanton und S. R. Simon, "In Vitro Assay Systems for Cell Interactions With Interstitial Extracellular Matrix", In Vitro Toxicol., Bd. 7 (1994), S. 209–224). Zehn verschiedene, chemisch modifizierte Tetracycline (CMTs) mit den Bezeichnungen CMT-1 bis CMT-10 und Doxycyclin wurden in Konzentrationen von 5  $\mu$ M bis 50  $\mu$ M zur ECM gleichzeitig mit einer Suspension von  $2 \times 10^6$  lebensfähigen humanen PMN/ml in ausgewogener Hank-Salzlösung (HBSS) gegeben. Bei diesen Untersuchungen war die ECM metabolisch mit  $^3$ H-Prolin radioaktiv markiert. Nach 6-stündiger Inkubation der Lösung aufgetretene Zählereignisse wurden gemessen und mit den Zählereignissen nach Inkubation mit PMN allein verglichen. Die Ergebnisse für die Konzentrationen 5  $\mu$ M, 25  $\mu$ M und 50  $\mu$ M sind in Tabelle 1 aufgeführt. Die Ergebnisse für 30  $\mu$ M sind in [Fig. 1](#) dargestellt.

Tabelle 1

Einfluss von CMTs auf die durch PMN (+0,5 nM PMA) vermittelte R22-ECM-Hydrolyse

( $^3$ H-Pro-cpm, freigesetzt in 6 Stunden bei 37°C)

Test	ECM-Hydrolyse (% Kontrolle)		
	5 $\mu$ M	25 $\mu$ M	50 $\mu$ M
Doxycyclin	98	92	84
CMT-1	93	95	90
CMT-2	91	95	100
CMT-3	69	55	50
CMT-4	90	98	130
CMT-5	78	112	102
CMT-6	109	101	97
CMT-7	97	84	100
CMT-8	96	82	57
CMT-9	88	215	190
CMT-10	101	85	80

**[0058]** Anmerkung: Die ECM-Hydrolyse wird als % Kontrolle angegeben, wobei die Kontrolle die Hydrolyse in Abwesenheit von jeglichem Inhibitor auf 100% normiert ist.

**[0059]** Tabelle 1 und [Fig. 1](#) zeigen, dass CMT-3 zur Erzielung einer signifikanten Hemmung des durch Neutrophile vermittelten ECM-Abbaus (~50% Hemmung in Konzentrationen von  $\geq 25$ –30  $\mu$ M) befähigt war, wobei bei sämtlichen für diesen Test herangezogenen Konzentrationen eine gute Hemmung des ECM-Abbaus erzielt

wurde. CMT-8 und CMT-10 und insbesondere CMT-8 zeigten bei einigen Konzentrationen eine gewisse Hemmung des ECM-Abbaus.

**[0060]** [Fig. 2](#) zeigt einen Vergleich der Hemmstärke von 25  $\mu\text{M}$  CMT-3 (COL-3) in parallelen Tests des ECM-Abbaus, der entweder durch  $2 \times 10^6$  PMN/ml oder 10  $\mu\text{M}$  gereinigte HLE vermittelt wird, wobei die vorstehend erwähnten Verfahren herangezogen wurden.

## Beispiel 2

**[0061]** Die direkte Hemmwirkung von Tetracyclinen auf die amidolytische Aktivität von humaner Leukozyten-elastase (HLE) wurde gemäß dem Verfahren von Ying et al., *Biochem. J.*, Bd. 277 (1991), S. 521–526, bewertet, wobei eine Modifikation durch Verringerung der DMSO-Konzentration auf 2% und durch Weglassen des Detergens Triton X-100 vorgenommen wurde. Um eine zeitabhängige Absorption von HLE an den Vertiefungen der Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen, die bei den amidolytischen Tests verwendet wurden, zu vermeiden, wurden die Platten mit einer Lösung von 0,2% Rinderserumalbumin vorbehandelt. Ein Konzentrationsbereich des chromogenen Oligopeptidsubstrats Methoxysuccinyl-Ala-Ala-Pro-Val-p-nitroanilid von 100  $\mu\text{M}$  bis 300  $\mu\text{M}$  wurde für sämtliche Messungen herangezogen. Von diesem Substrat nimmt man aufgrund einer röntgenkristallographischen Analyse an, dass es die Substrat-Bindungsunterzentren S<sub>1</sub> bis S<sub>5</sub> in HLE besetzt (W. Bode, E. Meyer und J. C. Powers, "Human Leukocyte and Porcine Pancreatic Elastase: X-Ray Crystal Structures, Mechanism, Substrate Specificity, and Mechanism-Based Inhibitors", *Biochemistry*, Bd. 28 (1989), S. 1951–1963). Die Hemmung der amidolytischen Aktivität wurde durch die graphischen Verfahren von Dixon (M. Dixon, *Biochem. J.*, Bd. 55 (1953), S. 170–171) und Cornish-Bowden (A. Cornish-Bowden, *Biochem. J.*, Bd. 137 (1974), S. 143–144, wie bei Ying et al. analysiert: ein Schnittpunkt von Dixon-Diagrammen, die bei verschiedenen Substratkonzentrationen erhalten wurden, an einem Punkt oberhalb der X-Achse schließt einen Mechanismus einer reinen nicht-kompetitiven Hemmung aus, während parallele Cornish-Bowden-Diagramme, die bei verschiedenen Substratkonzentrationen erhalten wurden, mit einer reinen kompetitiven Hemmung übereinstimmen. Die Substratkonzentration, bei der sich die Dixon-Diagramme schneiden, stellt ein Maß für den K<sub>i</sub>-Wert für den Inhibitor dar. Typische Dixon- und Cornish-Bowden-Diagramme für die Hemmung von HLE durch CMT-3 (COL-3) sind in den [Fig. 3A](#), B und [Fig. 4A](#), B dargestellt. Aus diesen Daten lässt sich der K<sub>i</sub>-Wert für die Hemmung der amidolytischen Aktivität von HLE durch CMT-3 zu 25–40  $\mu\text{M}$  bestimmen.

**[0062]** In Gegenwart von 10% Dimethylsulfoxid und 0,1% Triton X-100 war die Hemmstärke von CMT-3 deutlich verringert, was die Annahme stützt, dass hydrophobe Wechselwirkungen zur Stabilisierung der Bindung von CMT-3 an HLE beitragen.

**[0063]** Die Hemmaktivität von Doxycyclin gegenüber einer Amidolyse von Methoxysuccinyl-Ala-Ala-Pro-Val-p-nitroanilid durch HLE wurde ebenfalls in Gegenwart von 2% DMSO und ohne Detergens ermittelt, wie vorstehend für CMT-3 beschrieben. Eine Analyse der Steigung des Dixon-Diagramms bezüglich der Hemmung der amidolytischen Aktivität von HLE durch Doxycyclin zeigt einen wesentlich höheren K<sub>i</sub>-Wert um etwa 300  $\mu\text{M}$ , wie in [Fig. 5](#) dargestellt ist. Weitere Tetracyclin-Derivate, die eine vergleichbar niedrige oder gar keine Wirkungsstärke als Inhibitoren der amidolytischen Aktivität von HLE aufwiesen, waren Oxytetracyclin und dessen 4-Epimeres, epi-Oxytetracyclin; Chlortetracyclin und dessen 4-Epimeres, epi-Chlortetracyclin; Anhydrochlortetracyclin; und CMT-5, ein chemisch modifiziertes Tetracyclin, bei dem die Oxo- und Hydroxyreste an der Basis der vier kondensierten Ringe durch einen Pyrazolring ersetzt sind. Es wird angenommen, dass CMT-3 aufgrund der Besonderheit, dass ihm jegliche Substituenten an den 6- oder 4-Positionen des kondensierten Ringsystems der Tetracycline fehlen, in überraschender Weise dazu befähigt ist, mit wesentlich größerer Affinität an HLE zu binden, als alle übrigen getesteten Tetracycline.

**[0064]** Die Fähigkeit von CMT-3 zur Hemmung von HLE ist nicht auf amidolytische Tests beschränkt, wie bereits in [Fig. 2](#) gezeigt worden ist, wo der Abbau einer vollständigen, interstitiellen, extrazellulären Matrix durch gereinigte HLE durch Einwirkung von CMT-3 gehemmt wird. Die Wirkungsstärke der Hemmaktivität von CMT-3 bei diesem Test der Hemmung des Matrixabbaus durch HLE ist vergleichbar mit der Wirkung, die bei den Tests der amidolytischen HLE-Aktivität bestimmt wurden, was mit der Interpretation im Einklang steht, dass der Hemmmechanismus bei beiden Testtypen die Bindung von CMT-3 an das Enzym in einer Weise beinhaltet, die die Bindung von Peptid- oder Proteinsubstraten blockiert. Beim Test des durch HLE vermittelten Abbaus von ECM erwiesen sich die übrigen getesteten Tetracycline in Dosen, die mit den getesteten Dosen für CMT-3 vergleichbar waren, nicht als wirksam.

## Beispiel 3

**[0065]** Die Fähigkeit von oral verabreichtem CMT-3 (COL-3) zur in vivo-Verringerung der Leukozyten-elastase-Aktivität wurde in einem Tiermodell der akuten Entzündung und der Neutrophilen-Infiltration dargelegt, wobei man sich einer experimentellen Vorgehensweise ähnlich wie bei Chang et al. bediente (K. M. Chang, M. E. Ryan, L. M. Golub, N. S. Ramamurthy und T. F. McNamara, "Local and Systemic Factors in Periodontal Disease Increase Matrix-Degrading Enzyme Activities in Rat Gingiva: Effect of Minocycline Therapy", Res. Comm. Mol. Path. Pharm., Bd. 91 (1996), S. 303–318). Ratten erhielten 0,01 mg E. coli-Lipopolysaccharid (LPS) oder nur einen Kochsalzlösungsträger in Form einer Injektion in einem Volumen von 10 µl in das maxillare und mandibulare, labiale Zahnfleisch an jedem 2. Tag einer 6-tägigen Versuchsdauer. Zwei Gruppen von Ratten erhielten ferner 2 mg oder 5 mg CMT-3 täglich in einem Volumen von 1 ml bei Verabreichung durch eine orale Sonde während der 6-tägigen Versuchsdauer, während die übrigen Gruppen von Ratten nur den Träger mit 2% Carboxymethylcellulose erhielten. Am Ende der 6-tägigen Versuchsdauer wurden die Tiere getötet und ihr Zahnfleischgewebe wurde herausgeschnitten. Die Gewebe von jeder experimentellen Gruppe wurden vereinigt, eingefroren und aufgetaut und für Tests der enzymatischen Aktivität gemäß dem Verfahren von Yu et al. extrahiert (Z. Yu, N. S. Ramamurthy, M. Leung, K. M. Chang, T. F. McNamara und L. M. Golub, "Chemically Modified Tetracycline Normalizes Collagen Metabolism in Diabetic Rats", J. Periodont. Res., Bd. 28 (1993), S. 420–428). Die Leukozyten-elastase-Aktivität wurde unter Verwendung des Substrats Succinyl-Ala-Ala-Ala-p-nitroanilid gemäß dem Verfahren von Ramamurthy und Golub (1983) getestet (N. S. Ramamurthy und L. M. Golub, "Diabetes Increases Collagenase Activity in Extracts of Rat Gingiva and Skin", J. Periodont. Res., Bd. 18 (1983), S. 23–30). Bei dem hier dargestellten Befund handelt es sich um die Fähigkeit von oral verabreichtem CMT-3 zur Verringerung des Niveaus der Aktivität von Leukozyten-Elastase in Zahnfleischextrakten von Ratten mit LPS-Injektion. **Fig. 6** zeigt die verringerten Niveaus der Leukozyten-elastase-Aktivität in Zahnfleischextrakten von Ratten mit LPS-Injektion, die mit beiden Dosen von CMT-3 behandelt worden sind, im Vergleich mit der Elastase-Aktivität in Zahnfleischextrakten von Ratten, die LPS-Injektionen und eine Sonderverabreichung von Träger allein oder Injektionen von Kochsalzlösung erhalten haben. Eine Verabreichung von CMT-3 verringert offensichtlich die Niveaus der Elastase-Aktivität in Zahnfleischextrakten von Ratten mit LPS-Injektion auf Niveaus, die bei Tieren, denen im Zahnfleisch nur Kochsalzlösung allein injiziert worden ist, festgestellt werden. Dieses Ergebnis belegt, dass eine CMT-3-Verabreichung in vivo zu verringerten Leukozyten-elastase-Niveaus an Stellen einer lokalisierten akuten Entzündung unter Neutrophileninfiltration führen kann.

**[0066]** Die vorstehenden Ausführungen beziehen sich auf die derzeit als bevorzugt angesehenen Ausführungsformen der Erfindung, wobei es für den Fachmann aber ersichtlich ist, dass Abänderungen und Modifikationen daran vorgenommen werden können, ohne den Erfindungsgedanken zu verlassen. Alle derartigen Abänderungen und Modifikationen, die unter den Schutzzumfang der Erfindung fallen, sollen unter die Ansprüche fallen.

## Patentansprüche

1. Verwendung eines hydrophoben Tetracyclins zur Herstellung einer Zusammensetzung zum Hemmen von übermäßiger Leukozytenelastaseaktivität in einem biologischen System, wobei das hydrophobe Tetracyclin 6-Demethyl-6-desoxy-4-de(dimethylamino)-Tetracyclin (CMT-3) umfasst.
2. Verwendung gemäß Anspruch 1, wobei es sich bei der Zusammensetzung um eine kosmetische Zusammensetzung handelt.
3. Verwendung gemäß Anspruch 1, wobei es sich bei der Zusammensetzung um eine pharmazeutische Zusammensetzung handelt.
4. Verwendung eines hydrophoben Tetracyclins zur Herstellung einer Zusammensetzung zum Behandeln eines Subjekts, das unter Gewebeschädigung auf Grund von übermäßiger Leukozytenelastaseaktivität leidet, wobei das hydrophobe Tetracyclin 6-Demethyl-6-desoxy-4-de(dimethylamino)-Tetracyclin (CMT-3) umfasst.
5. Verwendung gemäß Anspruch 4, wobei es sich bei dem Subjekt um einen Säuger handelt.
6. Verwendung gemäß Anspruch 4, wobei es sich bei der Gewebeschädigung auf Grund von übermäßiger Leukozytenelastaseaktivität um eine Lungenkrankheit handelt.
7. Verwendung gemäß Anspruch 6, wobei es sich bei der Lungenkrankheit um zystische Fibrose, Emphy-

sem, akutes Lungenversagen oder akutes Lungentrauma auf Grund von Inhalation von toxischen Stoffen handelt.

8. Verwendung gemäß Anspruch 7, wobei es sich bei dem Lungenversagen um eine Komplikation von Polytrauma, operativem Stress, Sepsis oder um eine Komponente von multiplem Organversagen handelt.

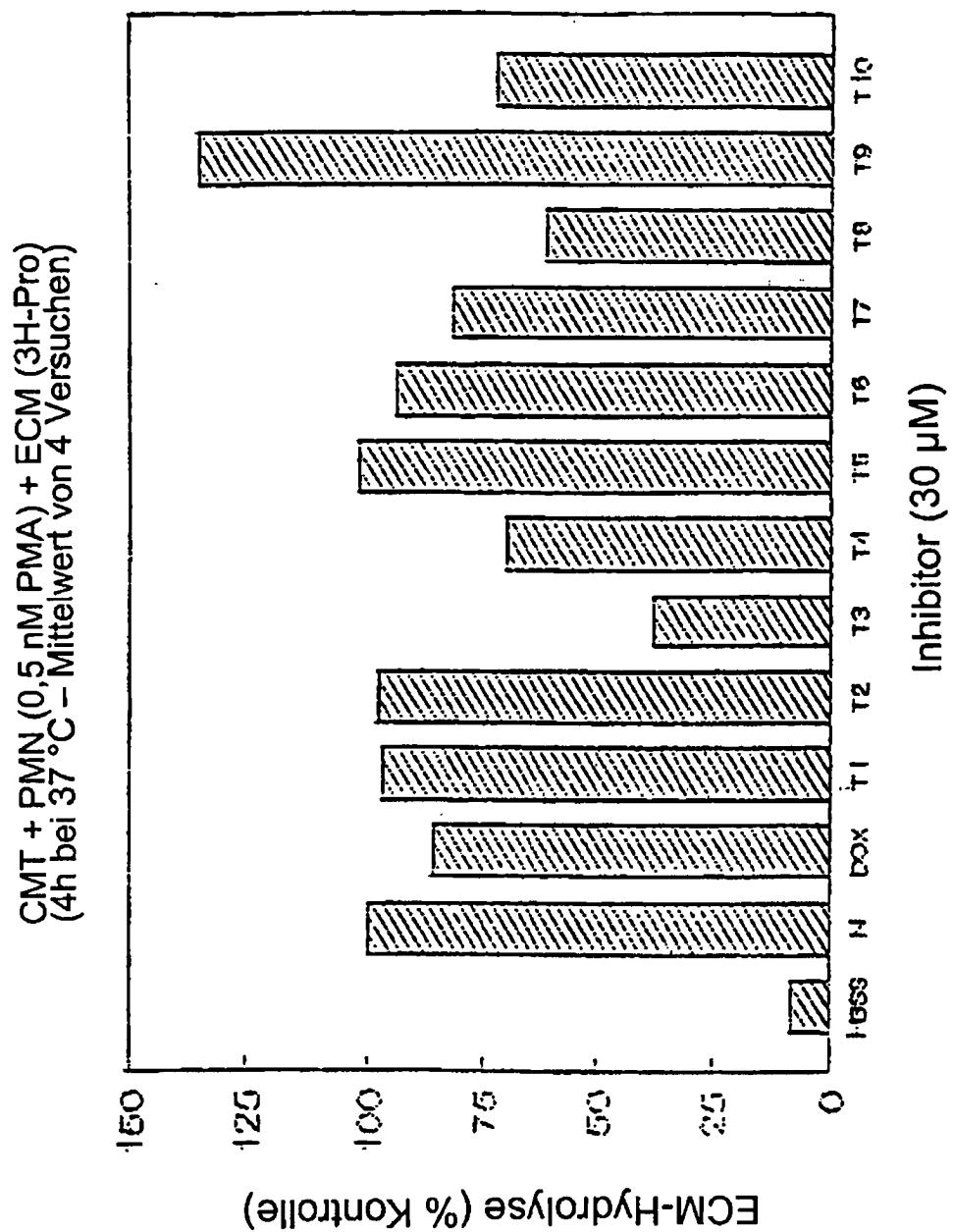
9. Verwendung gemäß Anspruch 7, wobei es sich bei dem toxischen Stoff um eine Säure, eine Chemikalie, ein industrielles Gift, ein militärisches Gift, Rauch oder ein toxisches Verbrennungsprodukt handelt.

10. Verwendung gemäß Anspruch 4, wobei es sich bei der Gewebeschädigung auf Grund von übermäßiger Leukozytenelastaseaktivität um eine Nierenerkrankung handelt.

11. Verwendung gemäß Anspruch 10, wobei es sich bei der Nierenerkrankung um Glomerulonephritis, akutes Nierenversagen als eine Komplikation von Polytrauma oder Sepsis oder akutem Nierenversagen als eine Komponente von multiplem Organversagen handelt.

Es folgen 8 Blatt Zeichnungen

## Anhängende Zeichnungen



Figur 1

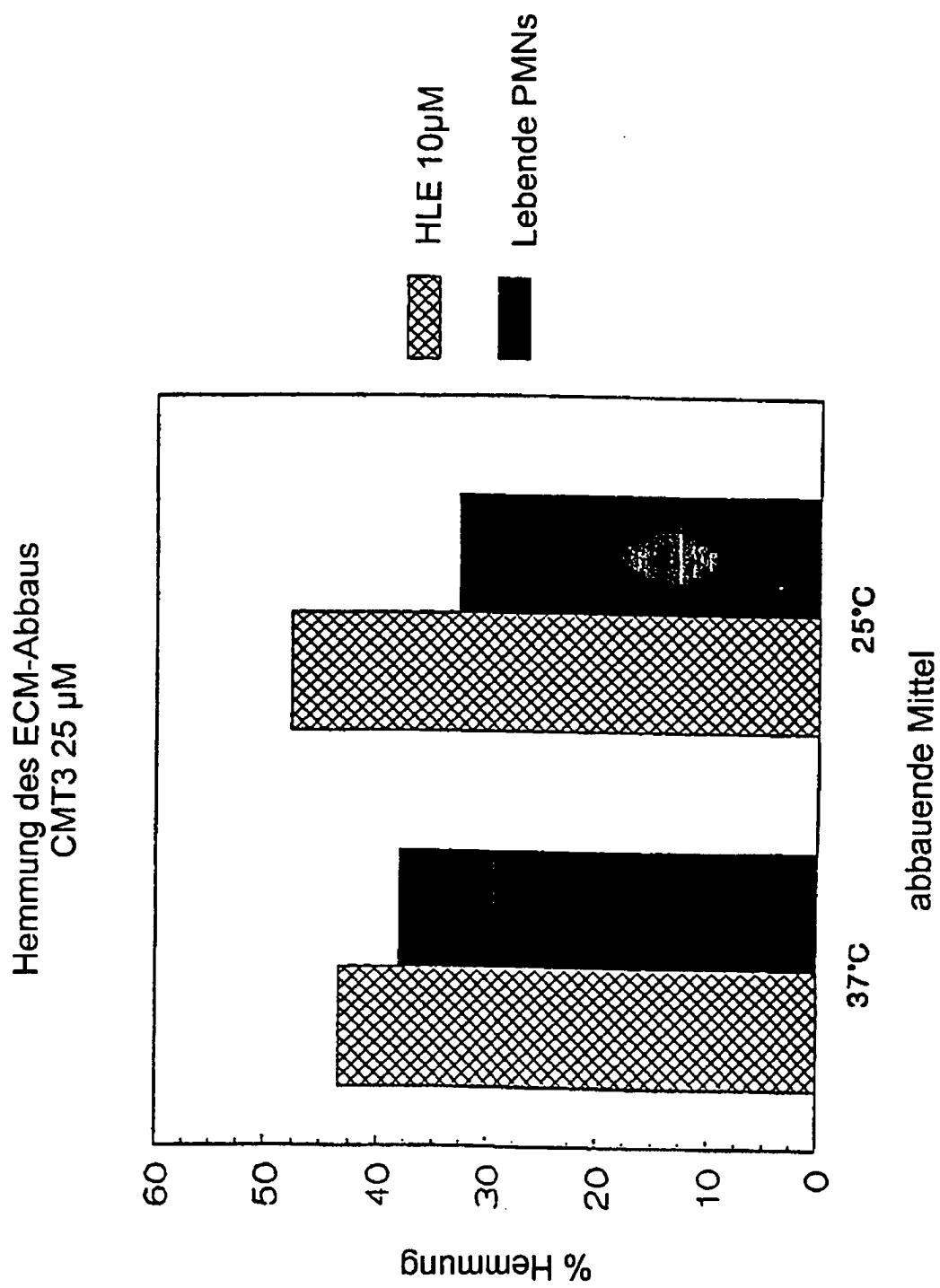


Figure 2

Hemmwirkung von CMT-3 auf HLE  
Dixon-Diagramm

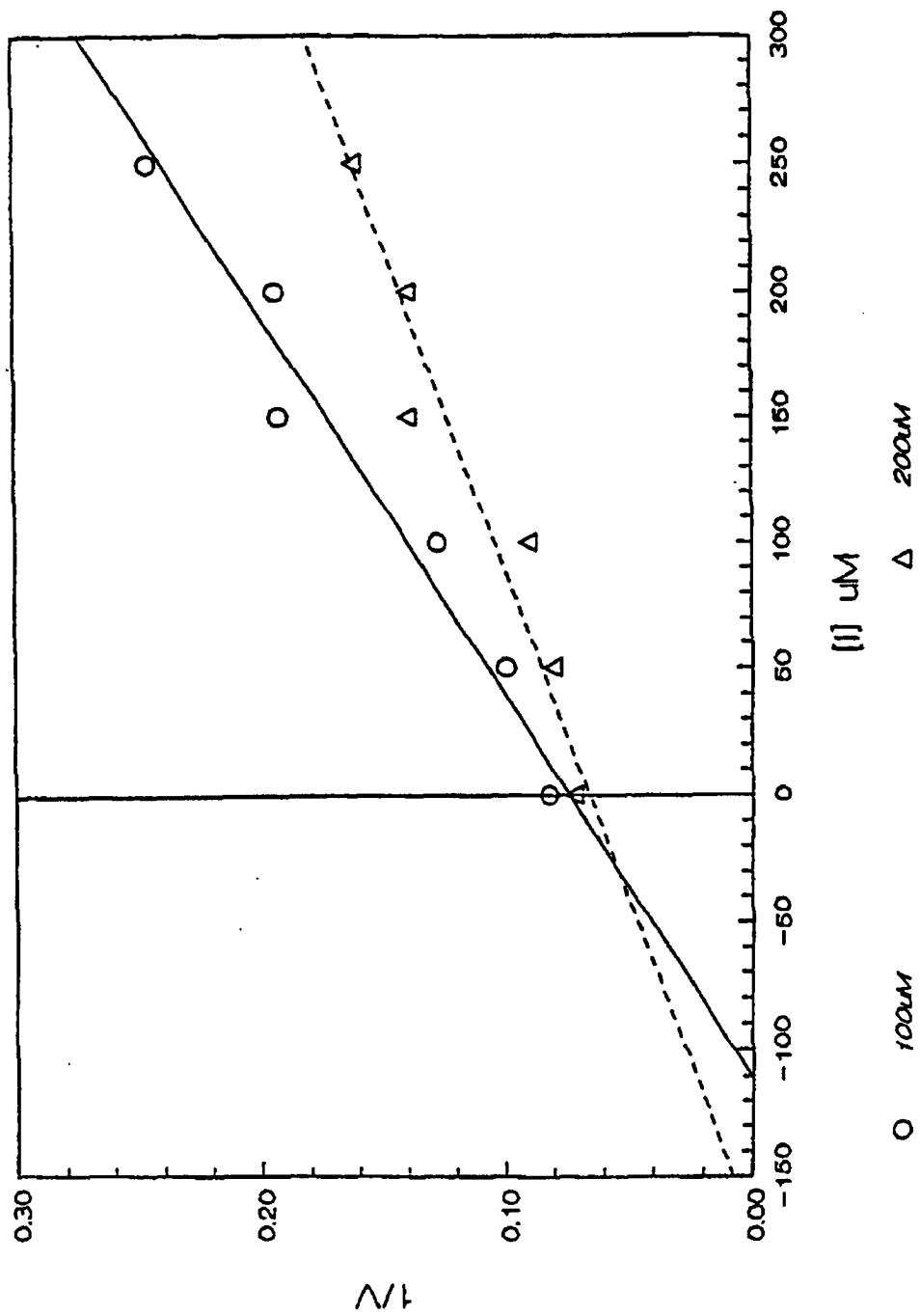


Figure 3A

Hemmung von CMT-3 auf HLE  
Cornish-Bowden-Diagramm

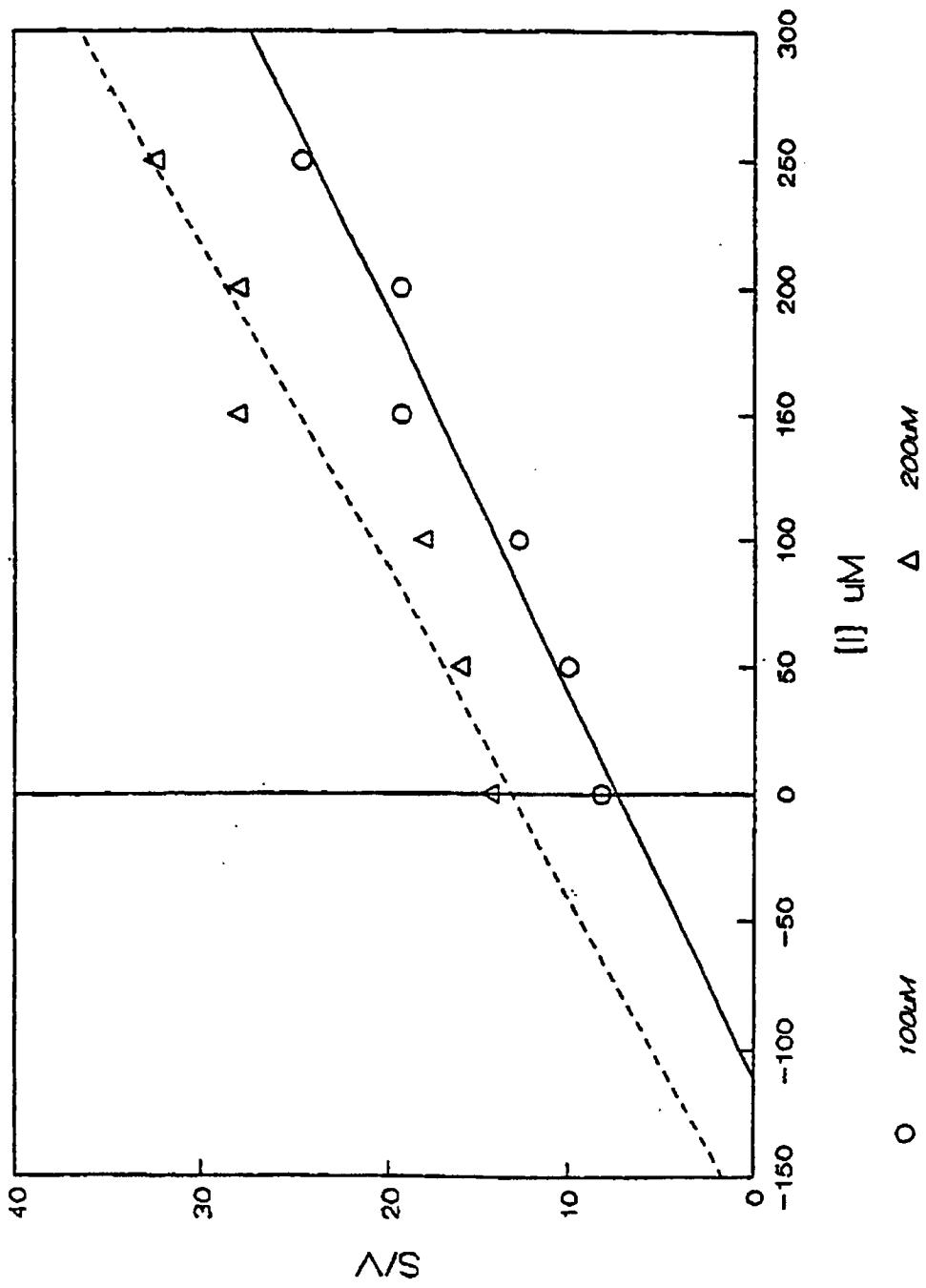


Figure 3B

Hemmwirkung von CMT-3 auf HLE

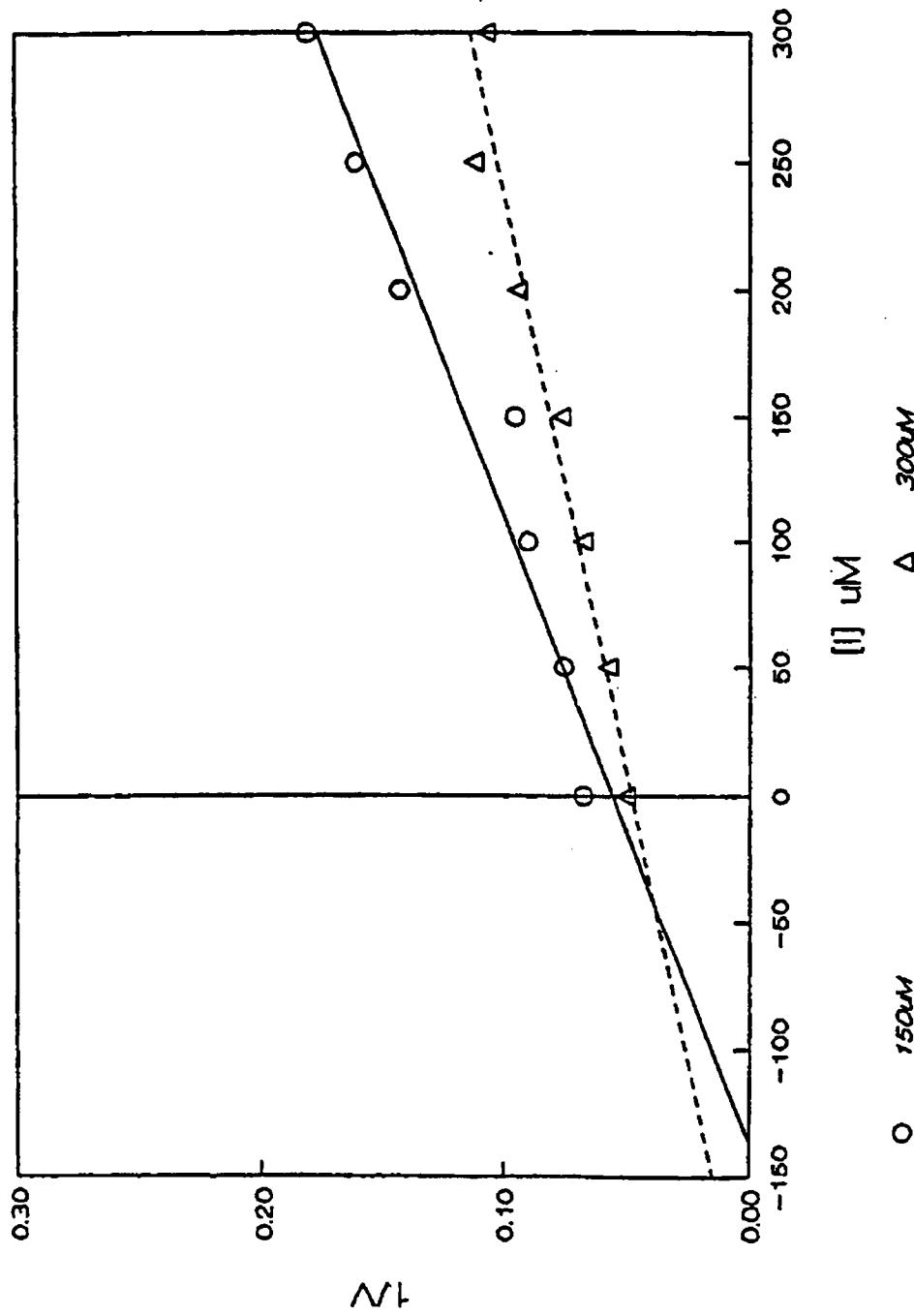
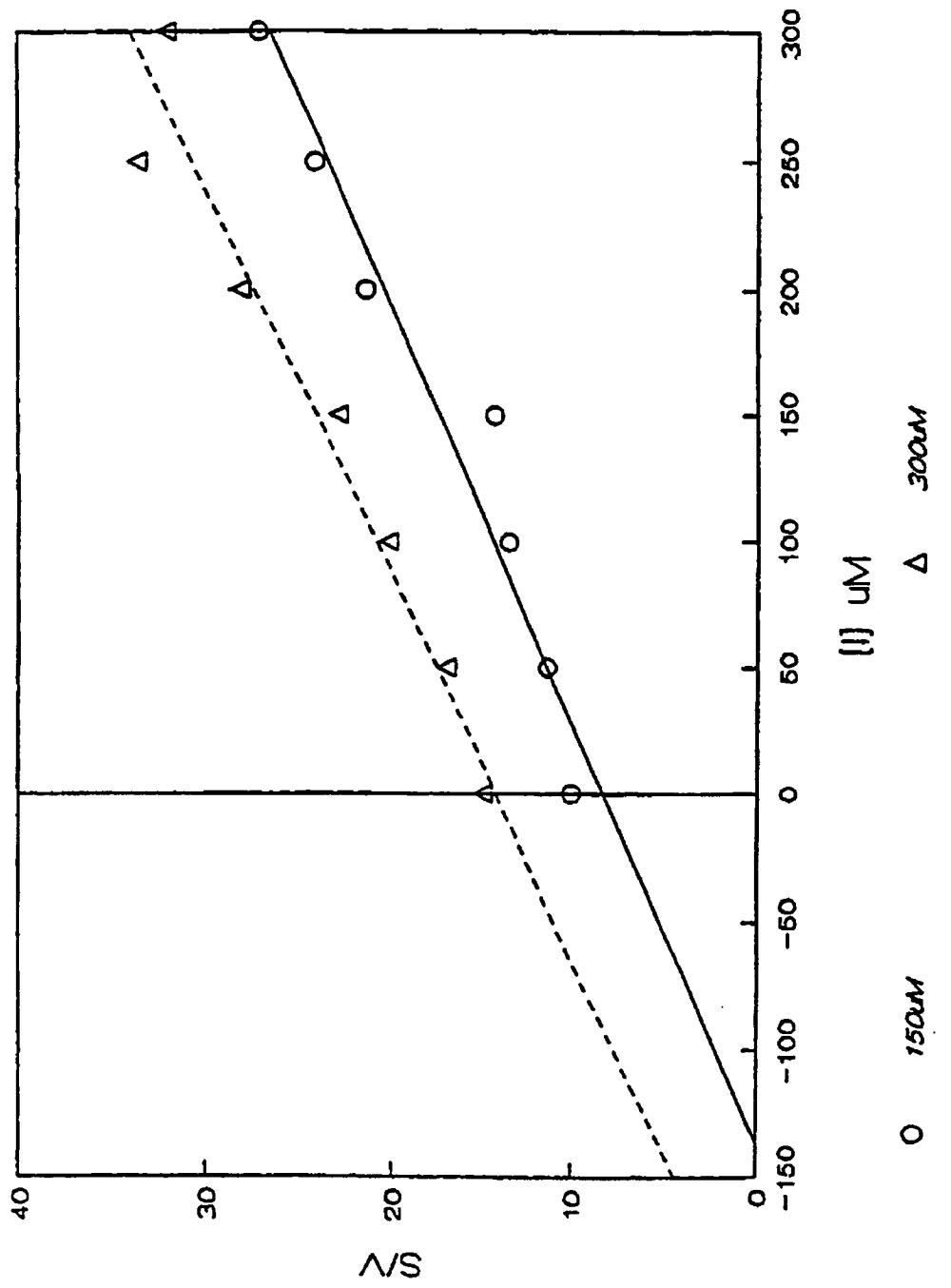


Figure 4A

Hemmung von CMT-3 auf HLE  
Cornish-Bowden-Diagramm



Wirkung von Doxycyclin auf HLE  
Dixon-Diagramm

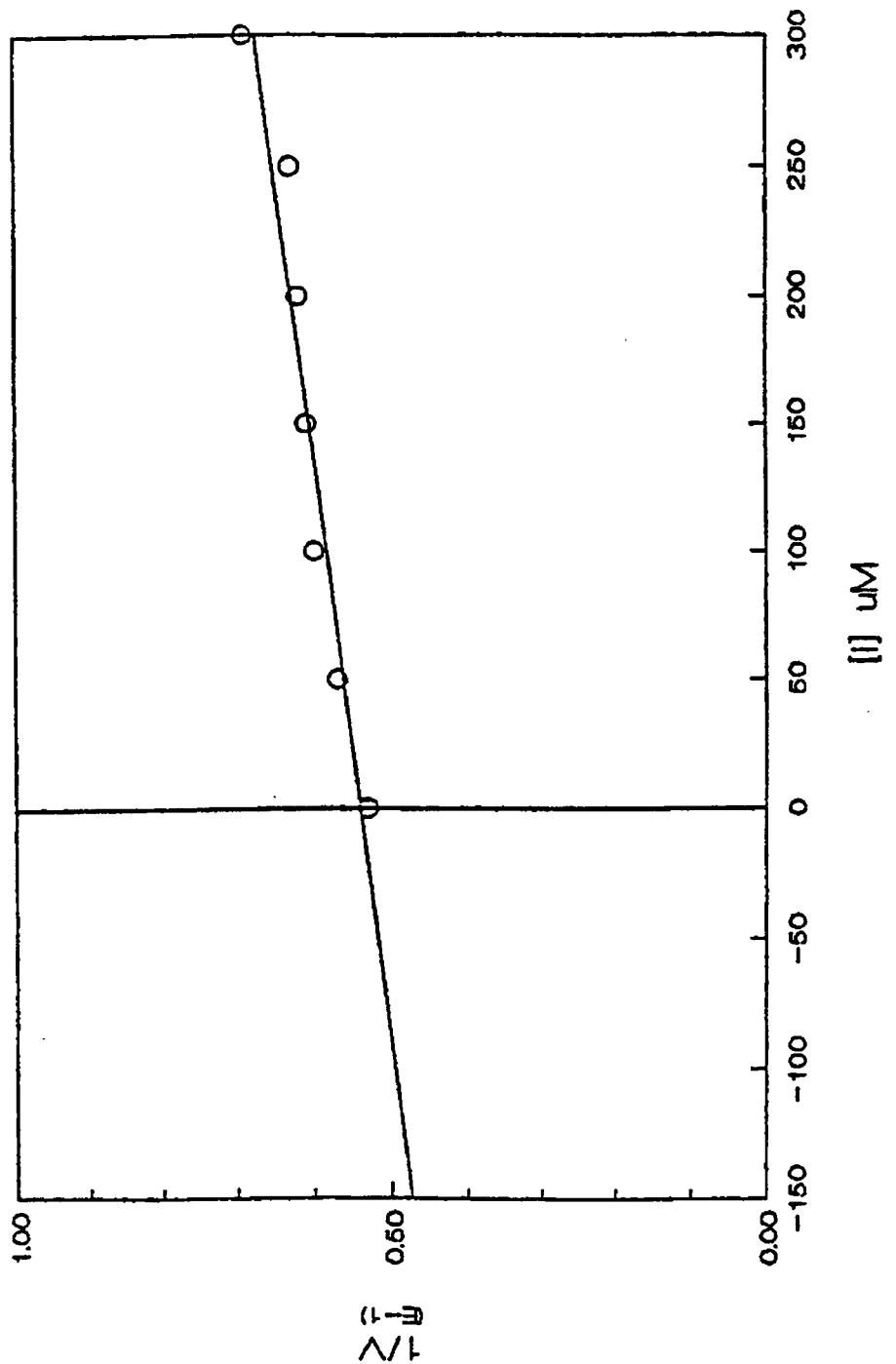
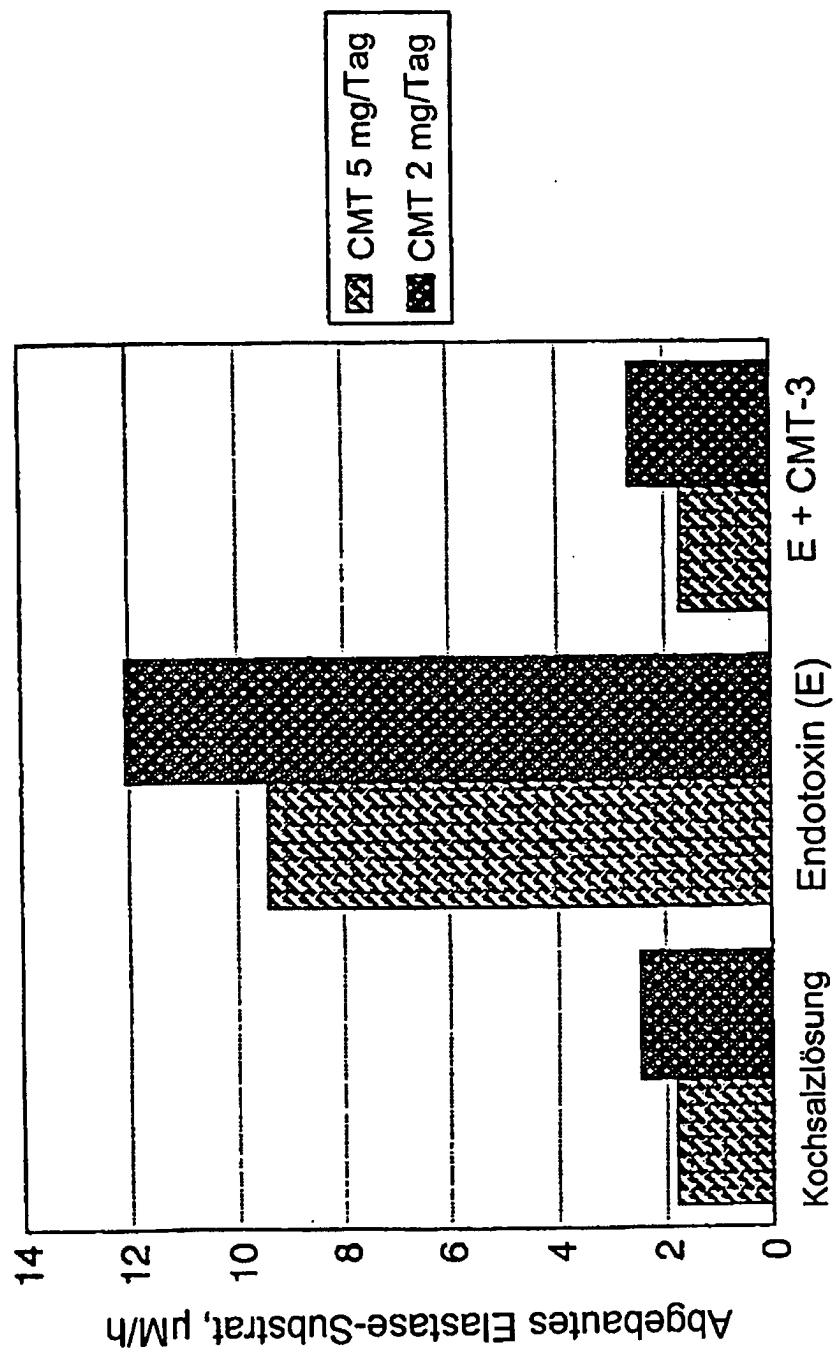


Figure 5

Wirkung von Endotoxin-induzierter Periodontitis auf  
Zahnfleisch-Elastase-Aktivität: Hemmung durch tägliche  
Verabreichung von 5 oder 2 mg CMT-3



Figur 6