

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷
A61K 31/65



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02819722.4

[43] 公开日 2005 年 1 月 12 日

[11] 公开号 CN 1564690A

[22] 申请日 2002.10.4 [21] 申请号 02819722.4

[30] 优先权

[32] 2001.10.5 [33] US [31] 60/327,502

[86] 国际申请 PCT/US2002/031730 2002.10.4

[87] 国际公布 WO2003/030819 英 2003.4.17

[85] 进入国家阶段日期 2004.4.5

[71] 申请人 泰特拉吉尼克斯医药公司

地址 美国新泽西

[72] 发明人 约瑟夫·拉弗卡

理查德·J·阿布林

[74] 专利代理机构 北京同立钧成知识产权代理有限公司

代理人 刘 芳 刘 薇

权利要求书 5 页 说明书 33 页

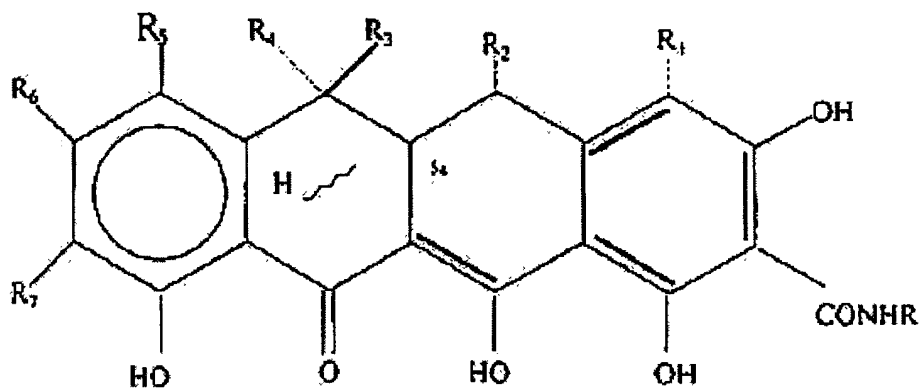
[54] 发明名称 四环素衍生物及其使用方法

[57] 摘要

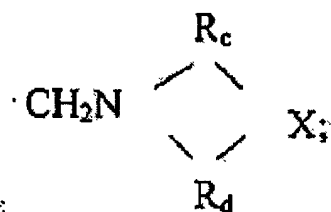
公开了一种用于抑制细菌或肿瘤生长的方法，包括对所述需要处理的对象给予有效量的一种或多种四环素衍生物。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 一种用于抑制细菌或肿瘤生长的方法, 包括对所述需要处理的对象给予有效量的四环素组合物或其盐, 所述四环素包括如下通式:



5



其中R 选自CH₂N (RaRb) 或

RaRb是C₁ ~ C₆ 烷基;

Rc和Rd是(CH₂)_nCHR_e, n是0或1, 且Re是H, C₁ ~ C₆ 烷基, 或NH₂, 以及X是NH, S, 或CH₂;

10 R₁是H或OH;

R₂是H, OH, =O, 或OCOR₈, 其中R₈是C₁ ~ C₆ 烷基, 或可选择的, R₂是N (R₉)₂, 其中R₉是氢或C₁ ~ C₆ 低级烷基, 或R₉CO, 条件是当R₂是羰基或N (R₉)₂时, R₃和R₄是H或CH₃, R₃和R₄不能同时是CH₃或H;

5a 氢是α 或 β;

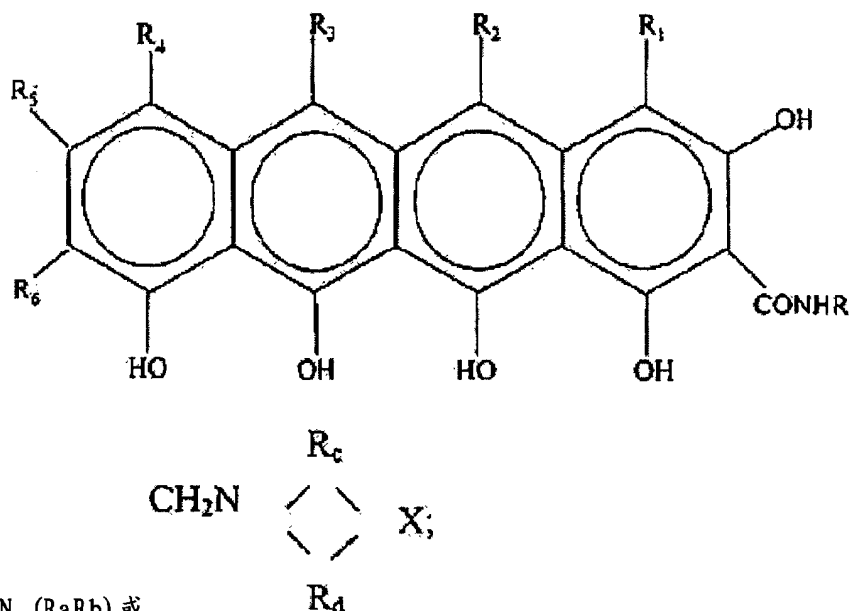
15 R₃和R₄是H, CH₃或F, 条件是当R₃是CH₃时, R₄是H或F, 当 R₄是CH₃时, R₃是H或F, R₄和R₅不能同时是 F;

R₅和R₇是卤素, H, NO₂, N₃, N₂⁺, C₂H₅OC (S) S-, CN, NR₁₀R₁₁, 其中R₁₀和R₁₁是H, C₁ ~ C₁₀ 烷基, R₁₂(CH₂)_nCO-, 其中n是0 ~ 5, 且R₉是H, NH₂, 选自直链、支链或环状C₁ ~ C₁₀烷基的单或二取代氨基, 条件是R₁₀和R₁₁不能同时是 R₁₂ (CH₂)_nCO-;

20 可选择的, R₇是叔丁基;

R_6 是卤素、乙炔、 $R_{13}-C_6H_5$ ，其中 R_{13} 是 NO_2 ，卤素，乙酰氨基，氨基，苯基，烷基或烷氧基。

2. 一种用于抑制细菌或肿瘤生长的方法，包括对所述需要处理的对象给予有效量的四环素组合物或其盐，所述四环素包括如下通式：



5

其中R选自 CH_2N ($RaRb$)或

式中， $RaRb$ 是 $C_1 \sim C_6$ 烷基；

Rc 和 Rd 是 $(CH_2)_nCHRe$ ， n 是0或1且 Re 是H， $C_1 \sim C_6$ 烷基，或 NH_2 ， X 是NH，S，或 CH_2 ； R_1 是H或

10

OH；

R_2 是H或OH；

R_3 是H或 CH_3 ；

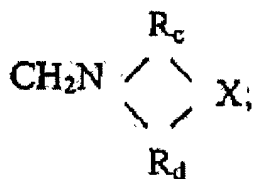
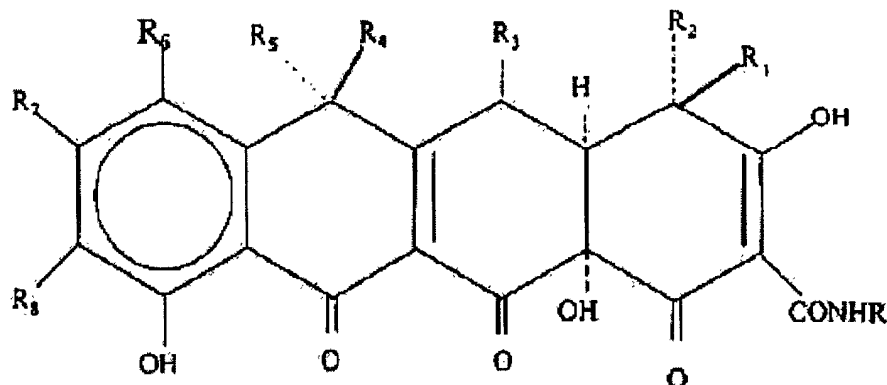
R_4 和 R_6 是卤素，H， NO_2 ， N_3 ， N_3^+ ， $C_2H_5OC(S)S-$ ，CN， NR_7R_8 ，其中 R_7 和 R_8 是H， $C_1 \sim C_{10}$ 烷基， $R_9(CH_2)_nCO-$ ，其中 n 是0~5，且 R_9 是H， NH_2 ，选自直链、支链或环状 $C_1 \sim C_{10}$ 烷基的单或二取代氨基，条件是 R_7 和 R_8 不能同时是 $R_9(CH_2)_nCO-$ ；且

15

R_5 是H或卤素，乙炔， $R_{10}-C_6H_5$ ，其中 R_{10} 是 NO_2 ，卤素，乙酰氨基，氨基，苯基，烷基，或烷氧基。

3. 一种用于抑制细菌或肿瘤生长的方法，包括对所述需要处理的对象给予有效量的四环素组合物或其盐，所述四环素包括如下通式：

20



其中R 选自CH₂N (RaRb) 或

式中, RaRb是C₁~C₆ 烷基;

- 5 Rc和Rd是(CH₂)_nCHRe, n是0或1, 且Re是H, C₁~C₆烷基, 或NH₂, X是NH, S, 或CH₂; R₁和R₂是H或N(R₉)₂, 其中R₉是H或C₁~C₆烷基, 条件是R₁和R₂不能同时是 N(R₉)₂, R₁和R₂还可以是 N(R₁₀)₃I, 其中R₁₀是C₁~C₆烷基, 条件是R₁和R₂不能同时是 N(R₁₀)₃I;

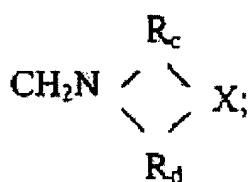
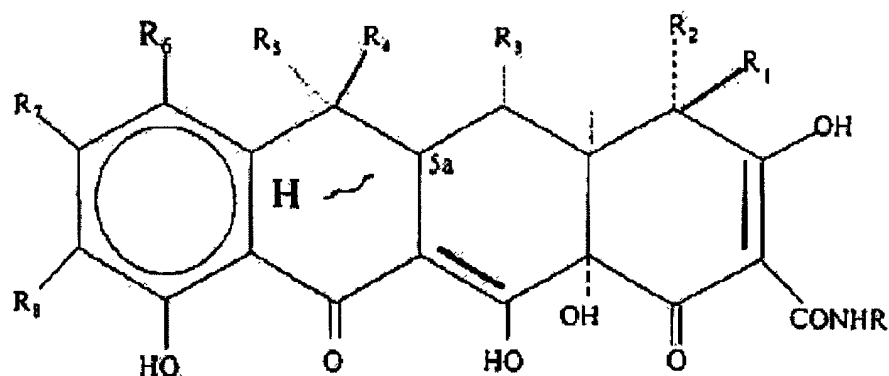
R₃是H;

R₄和R₅是H, CH₃或F, 条件是当R₄是CH₃时, R₅是H或F, 当R₅是CH₃时, R₄是H或F, 且R₄和R₅不能

- 10 同时是 F;

R₆和R₈是卤素, H, NO₂, N₃, N₂⁺, C₂H₅OC(S)S-, CN, N R₁₁ R₁₂, 其中R₁₁和R₁₂是H, C₁~C₁₀ 烷基, R₁₃(CH₂)_nCO-, 其中n是0~5, R₁₃是H, NH₂, 选自直链、支链或环状C₁~C₁₀ 烷基的单或二取代氨基, 条件是R₁₀和R₁₁不能同时是 R₁₂(CH₂)_nCO-; R₈还可以是叔丁基, R₇是H或卤素。

- 15 4. 一种用于抑制细菌或肿瘤生长的方法, 包括对所述需要处理的对象给予有效量的四环素组合物或其盐, 所述四环素包括如下通式:



其中R 选自CH₂N (RaRb) 或

5 Ra Rb是C₁ ~ C₆;

Rc和Rd 是(CH₂)_nCHRe, n是0或1, Re是H, 烷基(C₁ ~ C₆), NH₂, X是NH, S, 或CH₂;

R₁和R₂是H或N(R₉)₂式中, R₉是氢或低级烷基(C₁ ~ C₆), 条件是R₁和R₂不能同时是 N(R₉)₂;

R₃是H, OH, =O, OCOR₁₀, 其中R₁₀是C₁ ~ C₆, 或可选择的, R₃是N(R₉)₂式中, R₉是氢或C₁ ~ C₆, 条件是当R₂₃ 是=O或N(R₉)₂时, R₄和R₅是H或CH₃, 且R₄和R₅不能同时是CH₃或H;

10 5a 氢是α或β;

R₄和R₅是H, CH₃或F, 条件是当R₄是CH₃时, R₅是H或F, 当R₅是CH₃时, R₄是H或F, 且R₄和R₅不能同时是F;

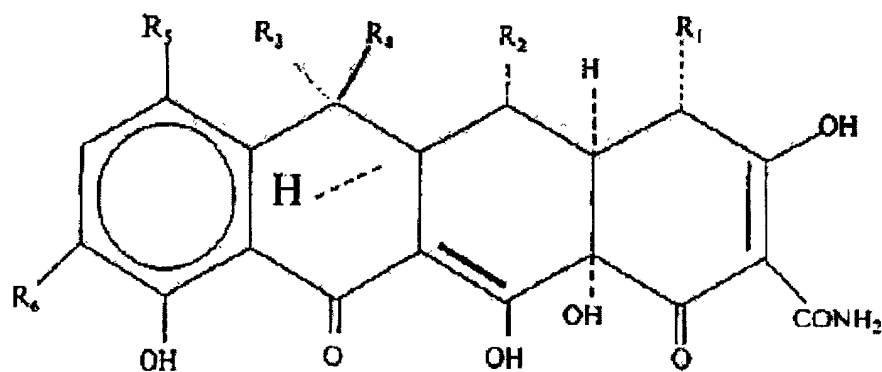
R₆和R₈是卤素, H, NO₂, N₃, N₂⁺, C₂H₅OC(S)S-, CN, N R₁₀ R₁₁, 其中R₁₀和R₁₁是H, 烷基(C₁ ~ C₁₀), R₁₂(CH₂)_nCO-, 其中n是0 ~ 5, R₁₂是H, NH₂, 选自直链、支链或环状 C₁ ~ C₁₀烷基单或二

15 取代的氨基, 条件是R₁₀和R₁₁均为R₁₂(CH₂)_nCO-, 或者, 可选择的, R₈是叔丁基;

R₇是H或卤素, 乙炔, R₁₂-C₆H₅, 其中R₁₂是NO₂, 卤素, 乙酰氨基, 氨基, 苯基, 烷基, 或烷氧基。

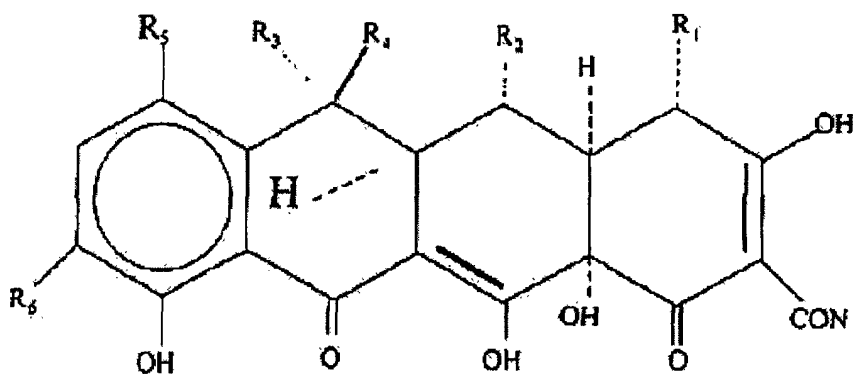
5. 一种用于抑制细菌或肿瘤生长的方法, 包括对所述需要处理的对象给予有效量的

20 四环素组合物或其盐, 所述四环素包括如下通式:



其中, R_1 是 H 或 $N(CH_3)_2$; R_2 是 H, CH_3 或 $OCOCH_3$; R_3 是 H 或 CH_3 ; R_4 是 H; R_5 是 H, $N(CH_3)_2$, NH_2 , $N(C_4H_9)_2$, $N(C_6H_{13})_2$, $N(3,3\text{-二甲基丁基})_2$, N_3 , N_2^+ , NO_2 , $NHCOCH_3$, $NH(\text{正丙基})_2$,
 5 $NH\text{-异丁基}$, $NH\text{-异丁基甲基}$, $NH(\text{环丁基})$, $NH(\text{环丁基甲基})$; R_6 是 H, NO_2 , NH_2 , $(CH_3)_2CHNH$, N_3 , $NHCOCH_3$, N_2^+ , N_3 或 $(CH_3)_3C$ 。

6. 一种用于抑制细菌或肿瘤生长的方法, 包括对所述需要处理的对象给予有效量的四环素组合物或其盐, 所述四环素包括如下通式:



10

其中 R_1 是 H 或 $N(CH_3)_2$; R_2 是 H, OH 或 $OCOCH_3$; R_3 是 H 或 CH_3 ; R_4 是 H; R_5 是 H, $N(CH_3)_2$; $N(C_4H_9)_2$, $N(C_6H_{13})_2$, $N(3,3\text{-二甲基丁基})_2$; N_3 , N_2^+ , NO_2 , $NHCOCH_3$, $NH(\text{正丙基})_2$, $NH\text{-异丁基}$,
 15 $NH\text{-异丁基甲基}$, $N(CH_3CO)(\text{异丁基})$, $NH(\text{环丁基})$, $NH(\text{环丁基甲基})$, 或 NH_2 ; R_6 是 H, NO_2 , NH_2 , $(CH_3)_2CHNH$, N_3 , $NHCOCH_3$, N_2^+ 或 $(CH_3)_3C$ 。

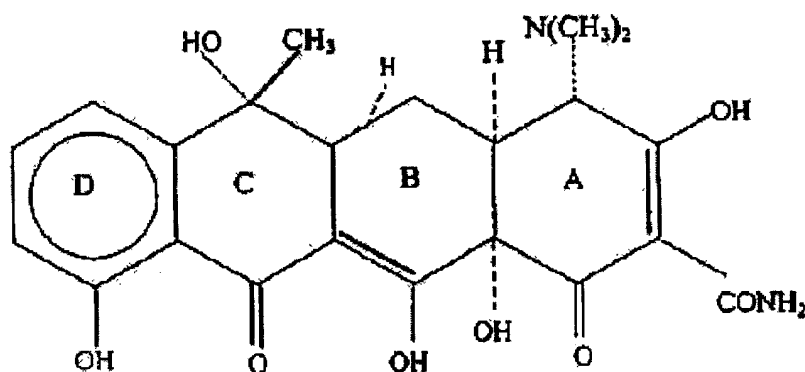
四环素衍生物及其使用方法

发明领域

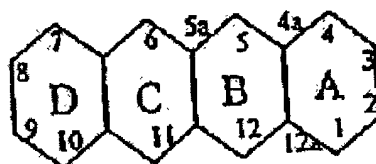
本发明涉及一类新的四环素衍生物、这些新衍生物的制备方法 & 这些衍生物的使用方法。

背景技术

四环素化合物有如下通式结构：



母核环系的编号如下：



四环素以及其5-羟基（土霉素）和7-氯（金霉素）衍生物存在于自然界，是众所周知的抗生素。天然四环素可不失其抗生素性质而进行修饰，尽管必须保留结构中的某些元素。在 Mitscher 的 “The Chemistry Of Tetracyclines, Chapter 6, Mrcel Dekker, Publishers, New York 1978)” 一书中，已经阐述了在四环素的基本结构中哪些位置可以或不可以进行修饰。根据 Mitscher 的说法，四环素环系的5-9位的取代基进行修饰，可不失其抗生素性质。但在基本环系的1-4位及10-12位改变或被取代基代替，通常会导致合成的四环素实质上降低

或失去抗微生物效果。一些化学修饰的无抗微生物效果的例子（以下称为CMT）有4-脱二甲氨基四环素，4-脱二甲氨基脱氧脱甲四环素（6-脱甲基-6-脱氧-4-脱二甲氨基四环素），4-脱二甲氨基二甲氨基四环素（7-二甲氨基-4-脱二甲氨基四环素），及4-脱二甲氨基强力霉素（5-羟基-6-脱氧-4-脱二甲氨基四环素）。

一些4-脱二甲氨基四环素衍生物公开在美国专利 Nos. 3, 029, 284和5, 122, 519中，包括6-脱甲基-6-脱氧-4-脱二甲氨基四环素和5-羟基-6-脱氧-4-脱二甲氨基四环素，同时在D环的C-7位和C-9位有氢和其它取代基。这些取代基包括氨基，硝基，二（低级烷基）氨基和单（低级烷基）氨基或卤素。6-脱甲基-6-脱氧-4-脱二甲氨基四环素衍生物和5-羟基-6-脱氧-4-脱二甲氨基四环素衍生物据称可被用作抗菌剂。

其它在A环C4位带有一个胍基的4-脱二甲氨基四环素衍生物公开在美国专利 Nos. 3, 622, 627和3, 824, 285中。这些胍衍生物在C7位有氢和卤素作为取代基，包括7-卤-6-脱甲基-6-脱氧-4-脱二甲氨基-4-胍基四环素，以及7-卤-5-羟基-6-脱氧-4-脱二甲氨基-4-胍基四环素。

在4-脱二甲氨基四环素A环C4位取代了烷基氨基（NH-烷基），以及烷基胍（N-NH-烷基）。这些化合物因为它们抗菌活性而己知。参见美国专利 Nos.

3, 345, 370, 3, 609, 188, 3, 622, 627, 3, 502, 660, 3, 509, 184, 3, 502, 696, 3, 515, 731, 3, 265, 732, 5, 122, 519, 3, 849, 493, 3, 772, 363, 以及3, 829, 453。

除了作为抗生素，四环素已被描述有许多其它用途，如已知四环素还有抑制胶原蛋白破坏酶的活性，如胞间质金属蛋白酶（MMP），包括胶原蛋白酶（MMP-1），白明胶酶（MMP-2）和溶基质素（MMP-3）。Golub等，J.Periodontit.Res. 20: 12-23 (1985)；Golub等，Crit.Revs.Oral Biol.Med. 2: 297-322 (1991)；美国专利 Nos. 4, 666, 897；4, 704, 383；4, 935, 411；4, 935, 412。此外，已知四环素可以抑制哺乳动物骨骼肌消耗和蛋白降解，美国专利 No. 5, 045, 538，并能增强哺乳动物细胞白介素-10的产生。

而且，在美国专利 No.Re. 34, 656中，四环素被报道可增强骨蛋白合成，在美国专利 No. 4, 704, 383中报道四环素在组织培养中有减少骨吸收的作用。

同样地，Golub等的美国专利 No. 5, 532, 227 公开了四环素类可以改善蛋白质过多的糖基化作用。特别是，四环素类抑制由糖尿病患者过量的胶原糖基化作用引起的过量胶原交联。

美国专利 No. 5, 532, 227公开了已知在发炎的情况下，如发生牛皮癣时，四环素类抑制过量磷脂酶A2活性。另外，已知四环素类还抑制环氧酶-2（cyclooxygenase-2, COX-2）、肿瘤坏死因子（TNF）、氧化氮和IL-1（白细胞介素-1）。

这些性质使四环素用于治疗许多疾病。例如对四环素类包括非抗微生物药的四环素类在

内的用途有许多建议,可以有效治疗关节炎。例如, greenwald等的文章中提到,“四环素类抑制反应性关节炎金属蛋白酶活性,且与氟比洛芬共同使用可改善骨损害”(Journal of Rheumatology 19: 927-938 (1992)); Greenwald等认为,“与MMP抑制剂共用可治疗毁灭性的关节炎;在基质金属蛋白酶的抑制中,四环素类起着重要作用”(Therapeutic Potential, Annals of the New York Academy of Sciences 732: 181-198(1994)); Kloppenburg 等, Minocycline in Active Rheumatoid Arthritis, Arthritis Rheum 37: 629-636 (1994); Ryan 等的“二甲氨四环素在活动性变形性关节炎治疗中的作用”, Arthritis Rheum 37: 629-636 (1994); Ryan等,“四环素改善骨关节炎破裂”, Current Opinion in Rheumatology 8: 238-247 (1996); O'Dell等,“二甲氨四环素或安慰剂治疗早期变形性关节炎”, Arthritis Rheum 40: 842-848 (1997)。

也有人建议用四环素类治疗皮疾病。例如: white等, Lancet, Apr. 29, p966 (1989) 报道说二甲胺四环素可有效治疗大疱型表皮松解症,该病是一种危急生命的皮肤病,被认为与胶原蛋白酶有关。

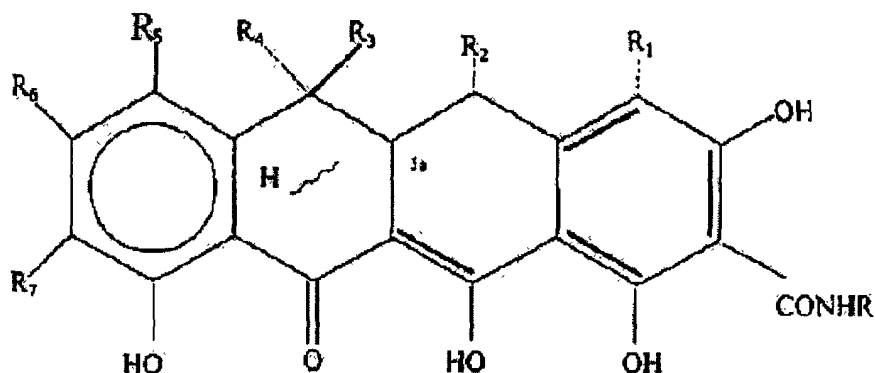
此外,也有研究建议四环素类和金属蛋白酶抑制剂可用于抑制肿瘤发展, DeClerck等, Annals N.Y.Acad.Sci., 732: 222-232 (1994), 骨吸收, Rifkin等, Annals N.Y.Acad.Sci., 732: 165-180 (1994), 血管生成, Maragoudakis等, Br.J.Pharmacol, 111: 894-902 (1994), 并且可能具有抗炎的性质, Ramamurthy等, Annals N.Y.Acad.Sci, 732, 427-430 (1994)。

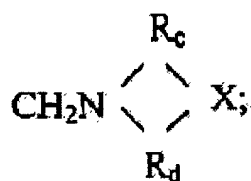
综上所述,四环素类已经被认为能有效治疗许多疾病和病症。所以,需要有新的而且甚至更多有用的衍生物。

发明内容

在此公开的化合物是四环素的衍生物,均显示出抗菌和/或抗癌活性。

在一个优选方案中,本发明涉及一种用于抑制细菌或肿瘤生长的方法,包括对所述需要处理的对象给予有效量的四环素组合物或其盐,包括如下通式:





其中R选自CH₂N (RaRb) 或

RaRb是C₁~C₆烷基; Rc和Rd是(CH₂)_nCHR_e, n是0或1, 且Re是H, C₁~C₆烷基, 或NH₂, 以及X是NH, S, 或CH₂; R₁是H或OH;

R₂是H, OH, =O, 或OCOR₈, 其中R₈是C₁~C₆烷基, 或可选择的, R₂是N(R₉)₂, 其中R₉是氢或C₁~C₆低级烷基, 或R₉CO, 条件是当R₂是羰基或N(R₉)₂时, R₃和R₄是H或CH₃, R₃和R₄不能同时是CH₃或同时是H;

5a 氢是α或β;

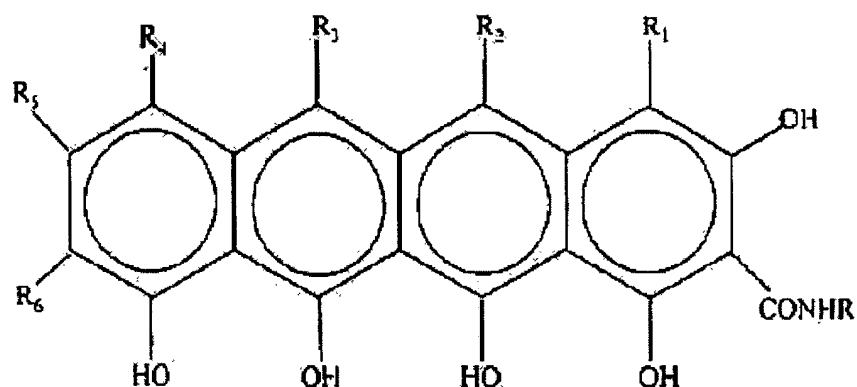
R₃和R₄是H, CH₃或F, 条件是当R₃是CH₃时, R₄是H或F, 当 R₄是CH₃时, R₃是H或F, R₄和R₅不能同时是 F;

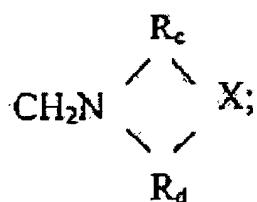
R₅和R₇是卤素, H, NO₂, N₃, N₂⁺, C₂H₅OC(S)S-, CN, NR₁₀R₁₁, 其中R₁₀和R₁₁是H, C₁~C₁₀烷基, R₁₂(CH₂)_nCO-, 其中n是0~5, 且R₉是H, NH₂, 选自直链、支链或环状C₁~C₁₀烷基的单或二取代氨基, 条件是R₁₀和R₁₁不能同时是 R₁₂(CH₂)_nCO-;

可选择的, R₇是叔丁基;

R₆是卤素、乙炔、R₁₃-C₆H₅, 其中R₁₃是NO₂, 卤素, 乙酰氨基, 氨基, 苯基, 烷基或烷氧基。

在另一个优选方案中, 本发明涉及一种用于抑制细菌或肿瘤生长的方法, 包括对所述需要处理的对象给予有效量的四环素组合物或其盐, 包括如下通式:





其中R 选自CH₂N (RaRb) 或

式中, RaRb是C₁~C₆ 烷基;

Rc和Rd是(CH₂)_nCHRe, n是0或1 且Re是H, C₁~C₆ 烷基, 或NH₂, X是NH, S, 或CH₂; R₁是H或OH;

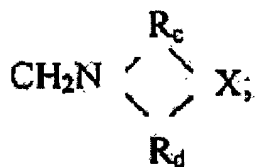
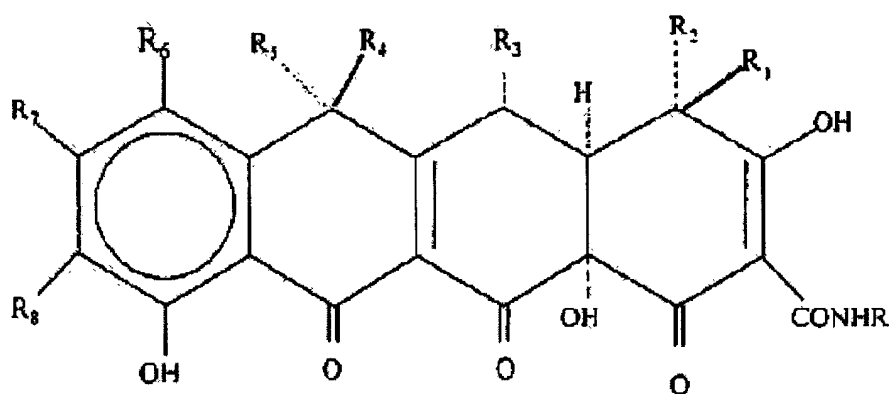
R₂是H或OH;

R₃是H或CH₃;

R₄和R₆是卤素, H, NO₂, N₃, N₂⁺, C₂H₅OC(S)S-, CN, NR₇R₈, 其中R₇和R₈是H, C₁~C₁₀烷基, R₉(CH₂)_nCO-, 其中n是0~5, 且R₉是H, NH₂, 选自直链、支链或环状C₁-C₁₀ 烷基的单或二取代氨基, 条件是 R₇和R₈ 不能同时是R₉(CH₂)_nCO-; 且

R₅是H或卤素, 乙炔, R₁₀-C₆H₅, 其中R₁₀是NO₂, 卤素, 乙酰氨基, 氨基, 苯基, 烷基, 或烷氧基。

在另一个优选方案中, 本发明涉及一种用于抑制细菌或肿瘤生长的方法, 包括对所述需要处理的对象给予有效量的四环素组合物或其盐, 包括如下通式:



其中R 选自CH₂N (RaRb) 或

式中, RaRb是C₁~C₆ 烷基;

Rc和Rd是(CH₂)_nCHRe, n是0或1, 且Re是H, C₁~C₆ 烷基, 或NH₂, X是NH, S, 或CH₂; R₁, R₂是H

或 $N(R_9)_2$, 其中 R_9 是 H 或 $C_1 \sim C_6$ 烷基, 条件是 R_1 和 R_2 不能同时是 $N(R_9)_2$, R_1, R_2 还可以是 $N(R_{10})$

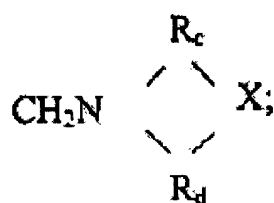
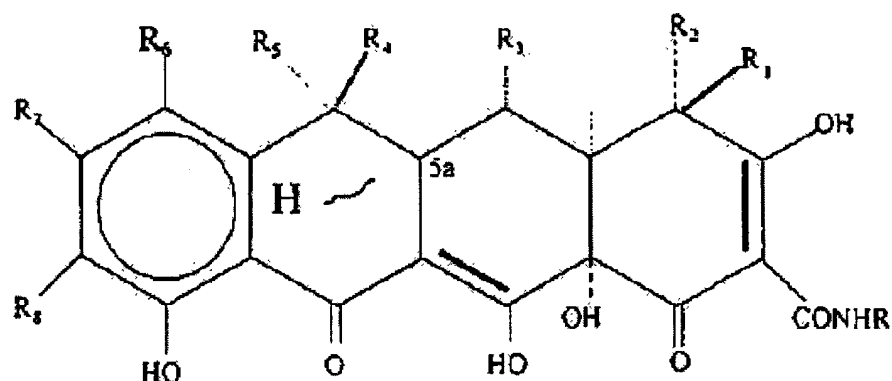
$_3I$, 其中 R_{10} 是 $C_1 \sim C_6$ 烷基, 条件是 R_1, R_2 不能同时是 $N(R_{10})_3I$;

R_3 是 H;

R_4 和 R_5 是 H, CH_3 或 F, 条件是当 R_4 是 CH_3 时, R_5 是 H 或 F, 当 R_5 是 CH_3 时, R_4 是 H 或 F, 且 R_4 和 R_5 不能同时是 F;

R_6 和 R_8 是卤素, H, NO_2 , N_3 , N_2^+ , $C_2H_5OC(S)S-$, CN, $NR_{11}R_{12}$, 其中 R_{11} 和 R_{12} 是 H, $C_1 \sim C_{10}$ 烷基, $R_{13}(CH_2)_nCO-$, 其中 n 是 0 ~ 5, R_{13} 是 H, NH_2 , 选自直链、支链或环状 $C_1 \sim C_{10}$ 烷基的单或二取代氨基, 条件是 R_{10} 和 R_{11} 不能同时是 $R_{12}(CH_2)_nCO-$; R_9 还可以是叔丁基, R_7 是 H 或卤素。

在又一个优选方案中, 本发明涉及一种用于抑制细菌或肿瘤生长的方法, 包括对所述需要处理的对象给予有效量的四环素组合物或其盐, 包括如下通式:



其中 R 选自 $CH_2N(RaRb)$ 或

$Ra Rb$ 是 $C_1 \sim C_6$;

Rc 和 Rd 是 $(CH_2)_nCHRe$, n 是 0 或 1, Re 是 H, 烷基 ($C_1 \sim C_6$), NH_2 , X 是 NH , S , 或 CH_2 ;

R_1, R_2 是 H 或 $N(R_9)_2$ 式中, R_9 是氢或低级烷基 ($C_1 \sim C_6$), 条件是 R_1 和 R_2 均不可以是 $N(R_9)_2$.

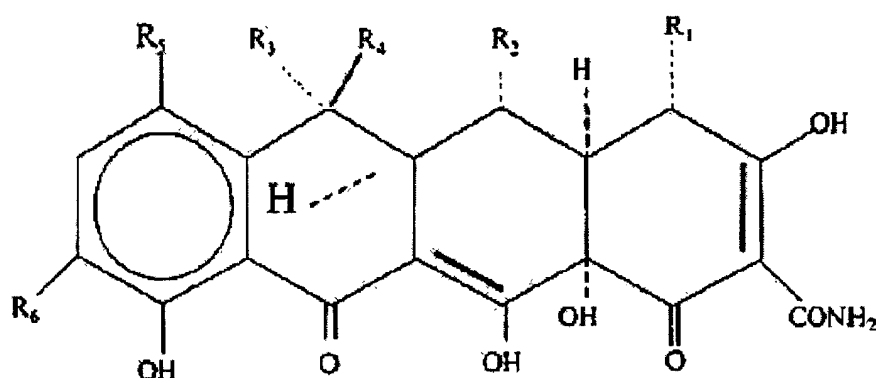
R_3 是 H, OH, $=O$, $OCO R_{10}$, 其中 R_{10} 是 $C_1 \sim C_6$, 或可选择的, R_3 是 $N(R_9)_2$ 式中, R_9 是氢或 $C_1 \sim C_6$, 条件是当 R_{23} 是 $=O$ 或 $N(R_9)_2$ 时, R_4 和 R_5 是 H 或 CH_3 , 且 R_4 和 R_5 不能同时是 CH_3 或 H;

5a 氢是 α 或 β ;

R_4 和 R_5 是 H, CH_3 或 F, 条件是当 R_4 是 CH_3 时, R_5 是 H 或 F, 当 R_5 是 CH_3 时, R_4 是 H 或 F, 且 R_4 和 R_5 不能同时是 F;

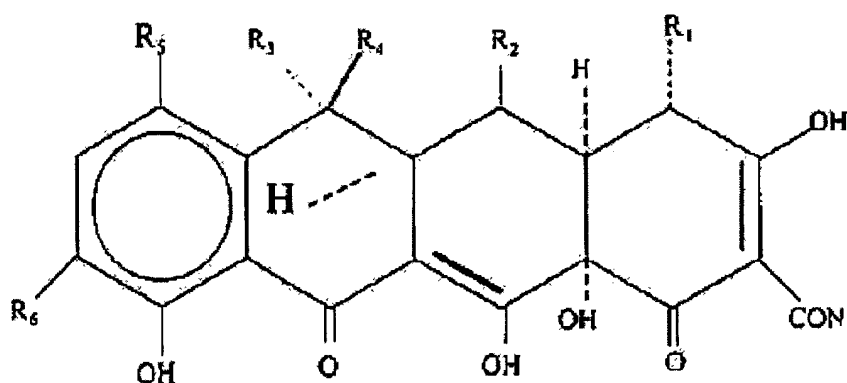
R_6 和 R_8 是卤素, H, NO_2 , N_3 , N_2^+ , $\text{C}_2\text{H}_5\text{OC}(\text{S})\text{S}-$, CN , $\text{NR}_{10}\text{R}_{11}$, 其中 R_{10} 和 R_{11} 是H, 烷基($\text{C}_1 \sim \text{C}_{10}$), $\text{R}_{12}(\text{CH}_2)_n\text{CO}-$, 其中 n 是 $0 \sim 5$, R_{12} 是H, NH_2 , 选自直链、支链或环状 $\text{C}_1 \sim \text{C}_{10}$ 烷基的单或二取代氨基, 条件是 R_{10} 和 R_{11} 均为 $\text{R}_{12}(\text{CH}_2)_n\text{CO}-$, 或者, 可选择的, R_6 是叔丁基;
 R_7 是H或卤素, 乙炔, $\text{R}_{12}-\text{C}_6\text{H}_5$, 其中 R_{12} 是 NO_2 , 卤素, 乙酰氨基, 氨基, 苯基, 烷基, 或烷氧基。

在另一个优选方案中, 本发明涉及一种用于抑制细菌或肿瘤生长的方法, 包括对所述需要处理的对象给予有效量的四环素组合物或其盐, 包括如下通式:



其中 R_1 是H或 $\text{N}(\text{CH}_3)_2$; R_2 是H, CH_3 或 OCOCH_3 ; R_3 是H或 CH_3 ; R_4 是H; R_5 是H, $\text{N}(\text{CH}_3)_2$, NH_2 , $\text{N}(\text{C}_4\text{H}_9)_2$, $\text{N}(\text{C}_6\text{H}_{13})_2$, $\text{N}(3,3\text{-二甲基丁基})_2$, N_3 , N_2^+ , NO_2 , NHCOCCH_3 , $\text{NH}(\text{n-丙基})_2$, NH-异丁基 , NH-异丁基甲基 , $\text{NH}(\text{环丁基})$, $\text{NH}(\text{环丁基甲基})$; R_6 是H, NO_2 , NH_2 , $(\text{CH}_3)_2\text{CHNH}$, N_3 , NHCOCCH_3 , N_2^+ , N_3 或 $(\text{CH}_3)_3\text{C}$ 。

在另一个优选方案中, 本发明涉及一种用于抑制细菌或肿瘤生长的方法, 包括对所述需要处理的对象给予有效量的四环素组合物或其盐, 包括如下通式:



其中 R_1 是H或 $\text{N}(\text{CH}_3)_2$; R_2 是H, OH或 OCOCH_3 ; R_3 是H或 CH_3 ; R_4 是H; R_5 是H, $\text{N}(\text{CH}_3)_2$; $\text{N}(\text{C}_4\text{H}_9)_2$, $\text{N}(\text{C}_6\text{H}_{13})_2$, $\text{N}(3,3\text{-二甲基丁基})_2$; N_3 , N_2^+ , NO_2 , NHCOCCH_3 , $\text{NH}(\text{n-丙基})_2$, NH-异丁基 , NH-

异丁基甲基, $N(CH_3CO)$ (异丁基), NH (环丁基), NH (环丁基甲基), 或 NH_2 ; R_6 是 H , NO_2 , NH_2 , $(CH_3)_2CHNH$, N_3 , $NHCOCH_3$, N_2^+ 或 $(CH_3)_3C$ 。

以下实施例描述了本发明各种物质的制备。

HPLC 分析用 Waters 反相层析 C_{18} -对称柱, 使用含 0.1% TFA 的水和乙腈作为洗脱剂。

分析 LC/MS 用配备系列 1100 MSD 检测器的 Hewlett Packard Series 1100 液相色谱仪进行, 并带有 ES 电离模式及于 270 nm 的紫外检测, 用 4.6×100 mm 柱, 流速是 0.4 ml/min。制备 HPLC 用 Gilson 系列 HPLC, 并带有 270 nm 紫外检测, 用 19×150 mm 柱, 流速是 15 ml/min, 1H NMR 用 Bruker 300 MHz 核磁仪在氘代甲醇中进行。

9-硝基-强力霉素硫酸盐

搅拌下, 在 $0^\circ C$ 向盐酸强力霉素 (1 g, 2.08 mmol) 在 30 ml 浓硫酸的溶液中, 加硝酸钾 (252 mg, 2.49 mmol)。产生的混合物在 $0^\circ C$ 搅拌 20 分钟, 然后在搅拌下注入 1.2 L 冷乙醚。滤出沉淀的固体, 用冷的醚洗涤, 并在真空中干燥, 得到 1.22 g 米色的产物。如需要, 将产物溶于甲醇进行纯化, 过滤并将滤液倾入乙醚, 滤出固体进行干燥。

9-氨基-强力霉素硫酸盐

向 9-硝基-强力霉素硫酸盐 (1 g, 1.7 mmol) 在 35 ml 乙二醇一甲基醚和 5 ml 甲醇的溶液中, 搅拌下加入 700 mg 10% Pd/C。反应混合物在常压下氢化 6 小时。用硅藻土滤去催化剂, 用甲醇洗。浓缩滤液, 然后搅拌下滴加至 800 ml 冷乙醚中。滤去分离出的固体, 用冷乙醚洗涤, 并真空干燥, 得到 843 mg 米色的产物。

9-异丙基氨基-强力霉素硫酸盐

向搅拌的 9-氨基-强力霉素硫酸盐 (100 mg, 0.18 mmol) 在 10 ml 乙二醇一甲基醚的溶液中, 加入 0.05 ml 浓硫酸, 0.5 ml 丙酮和 100 mg 10% Pd/C。产生的混合物在大气压下氢化 1 小时 15 分钟, 然后用硅藻土滤除催化剂, 用甲醇洗涤。浓缩滤液, 然后搅拌下倾入 150 ml 冷乙醚中。滤出沉淀的固体, 用冷乙醚洗涤, 并真空干燥, 得到 109 mg 米色的产物。将产物溶于甲醇进行纯化, 过滤并将滤液倾入乙醚。滤出形成的固体并进行干燥。

9-乙酰氨基强力霉素硫酸盐

搅拌下, 向 9-氨基-强力霉素硫酸盐 (72 mg, 0.13 mmol) 在 1.5 ml 1,3-二甲基-2-咪唑并烷酮的溶液中加入 70 mg 碳酸氢钠, 再加入 0.05 ml 乙酰氯化物。混合物在室温下搅拌 1 小时, 然后过滤。浓缩滤液, 并在搅拌下倾入 100 ml 冷乙醚中。滤出沉淀的固体, 用冷的

乙醚洗涤，并真空干燥，得到 92 mg 产物。

9-重氮-强力霉素硫酸盐盐酸盐

搅拌下，向冷却在冰浴中的9-氨基-强力霉素硫酸盐（300 mg，0.54 mmol）在9ml 0.1N 盐酸的甲醇溶液内，加入0.3ml 正丁基亚硝酸酯。溶液在0℃搅拌 30分钟，然后搅拌下倾入 300 ml 冷乙醚中。滤出沉淀的固体，并真空干燥，得到 256 mg 橙棕色产物。

9-叠氮基强力霉素硫酸盐

搅拌下，向9-重氮-强力霉素硫酸盐盐酸盐（80 mg，0.14 mmol）在4.5 ml 0.1N盐酸在甲醇中的溶液中，加入10 mg 叠氮化钠。溶液在室温下搅拌2小时，然后搅拌下倾入100 ml 冷乙醚中。滤出沉淀的固体，并真空干燥，得到 43 mg 产物。

9-（4-氟苯基）-强力霉素

向9-重氮-强力霉素硫酸盐盐酸盐（358 mg，0.59 mmol）和4-氟苯基硼酸（107 mg，0.76 mmol）在4ml 甲醇的溶液中，加入18 mg 醋酸钯（II），产生的混合物在室温下搅拌16小时。滤去催化剂，浓缩残余物，用制备高效液相层析法纯化。从高效液相层析收集的部分进行浓缩，并倾入20 ml 冷乙醚中。滤出固体，真空干燥，得到 32 mg 产物。

7-[1, 2-双（苄氧羰基）胍基]-强力霉素

搅拌下，向强力霉素盐酸盐（300 mg，0.62 mmol）在2.5 ml 四氢呋喃和3.2 ml 甲磺酸的溶液中，在0℃下加入230 mg 二苄偶氮二羧酸酯（dibenzoyazodicarboxylate）。产生的混合物在0℃搅拌2小时，然后倾入400 ml 冷乙醚中。滤出固体，真空干燥，得到 479 mg 灰白色产物。

7-氨基-强力霉素

向7-[1, 2-双（苄氧羰基）胍基]强力霉素（478 mg）在30 ml 乙二醇一甲基醚的溶液中，加入200 mg 10% Pd/C，产生的混合物在室温下氢化3小时。用硅藻土滤除催化剂，用甲醇洗涤，将滤液浓缩，并倾入500 ml 冷乙醚中。滤出分离出的固体，并真空干燥，得到 268 mg 产物。

7-二甲氨基-强力霉素硫酸盐

向7-氨基-强力霉素(100 mg)在8ml 乙二醇一甲基乙醚的溶液中,加入1 ml 37%含水甲醛溶液,0.05 ml 浓硫酸和100 mg 10% Pd/C。产生的混合物在大气压下氢化6小时,然后用硅藻土滤除催化剂,用甲醇洗涤。浓缩残余物,并在搅拌下倾入100 ml 冷乙醚中。分离出的固体因为粘性很强,进行很困难的过滤。然后立即将该固体再溶解在甲醇中,并在搅拌下倾入100 ml 冷乙醚中。滤出分离的固体,并真空干燥,得到89 mg 产物。

7-二丙基-强力霉素硫酸盐

向7-氨基-强力霉素(90 mg)在8ml 乙二醇一甲基乙醚的溶液中,加入0.5 ml 丙醛,0.05 ml 浓硫酸和80 mg 10% Pd/C。产生的混合物在大气压下氢化5小时,然后用硅藻土滤除催化剂,用甲醇洗涤。浓缩残余物,并在搅拌下倾入100 ml 冷乙醚中。滤出分离的固体,并真空干燥,得到415 mg 产物。

7-二丁基氨基-强力霉素硫酸盐

向7-氨基-强力霉素(100 mg, 0.2 mmol)在6ml 乙二醇一甲基乙醚的溶液中,加入0.6 ml 丁醛,0.05 ml 浓硫酸和100mg 10% Pd/C。产生的混合物在大气压下氢化4小时,然后用硅藻土滤除催化剂,用甲醇洗涤。浓缩残余物,并在搅拌下倾入100 ml 冷乙醚中。滤出分离的固体,并真空干燥,得到103 mg 产物。

7-二(3, 3-二甲基)丁基氨基-强力霉素硫酸盐

向7-氨基-强力霉素(100 mg, 0.2 mmol)在6ml 乙二醇一甲基乙醚的溶液中,加入0.5 ml 3, 3-二甲基丁醛,0.05 ml 浓硫酸和100mg 10% Pd/C。产生的混合物在大气压下氢化4小时,然后用硅藻土滤除催化剂,用甲醇洗涤。浓缩残余物,并在搅拌下倾入100 ml 冷乙醚中。滤出分离的固体,并真空干燥,得到122 mg 产物。

7-二己基氨基-强力霉素硫酸盐

向7-氨基-强力霉素(100 mg, 0.2 mmol)在6ml 乙二醇一甲基乙醚的溶液中,加入0.6 ml 己醛,0.05 ml 浓硫酸和100mg 10% Pd/C。产生的混合物在大气压下氢化4小时,然后用硅藻土滤除催化剂,用甲醇洗涤。浓缩残余物,并在搅拌下倾入100 ml 冷乙醚中。滤出分离的固体,并真空干燥,得到129 mg 产物。

7-异丙基氨基-强力霉素硫酸盐

向7-氨基-强力霉素(90 mg, 0.2 mmol)在8ml 乙二醇一甲基乙醚的溶液中,加入0.5 ml 异丁醛,0.05 ml 浓硫酸和90 mg 10% Pd/C。产生的混合物在大气压下氢化6小时,然后用硅藻土滤除催化剂,用甲醇洗涤。浓缩残余物,并在搅拌下倾入100 ml 冷乙醚中。滤出分离的固体,并真空干燥,得到142 mg 产物。

7-甲基-7-异丙基氨基-强力霉素硫酸盐

向7-异丙基氨基-强力霉素(60 mg)在4ml 乙二醇一甲基乙醚的溶液中,加入0.4 ml 37%甲醛水溶液,0.05 ml 浓硫酸和50 mg 10% Pd/C。产生的混合物在大气压下氢化2小时,然后用硅藻土滤除催化剂,用甲醇洗涤。浓缩残余物,并在搅拌下倾入80 ml 冷乙醚中。滤出分离的固体,并真空干燥,得到52 mg 产物。

7-环丁基氨基-强力霉素硫酸盐

向7-氨基-强力霉素(80 mg)在7ml 乙二醇一甲基乙醚的溶液中,加入0.3ml 环丁酮,0.04 ml 浓硫酸和60mg 10% Pd/C。产生的混合物在大气压下氢化24小时,然后用硅藻土滤除催化剂,用甲醇洗涤。浓缩残余物,并在搅拌下倾入100 ml 冷乙醚中。滤出分离的固体,并真空干燥,得到85 mg 产物。

7-甲基-7-环丁基氨基-强力霉素硫酸盐

向7-环丁基氨基-强力霉素(40 mg)在3.5ml 乙二醇一甲基乙醚的溶液中,加入0.3 ml 37%甲醛水溶液,0.03 ml 浓硫酸和40 mg 10% Pd/C。产生的混合物在大气压下氢化6小时,然后用硅藻土滤除催化剂,用甲醇洗涤。浓缩残余物,并在搅拌下倾入80 ml 冷乙醚中。滤出分离的固体,并真空干燥,得到35 mg 产物。

7-乙酰氨基强力霉素硫酸盐

搅拌下,向7-氨基-强力霉素(200 mg)在3ml 1,3-二甲基-2-咪唑烷酮的溶液中,加入200 mg 碳酸氢钠,然后加入0.09 ml 乙酰氯化物。混合物在室温下搅拌1小时,然后过滤。浓缩滤液,并在搅拌下倾入200 ml 冷乙醚中。滤出沉淀的产物并真空干燥,获得202 mg 产物。

7-乙酰氨基-7-异丙基-强力霉素硫酸盐

搅拌下,向7-异丁基氨基-强力霉素(60 mg)在1.5ml 1,3-二甲基-2-咪唑烷酮的溶液

中，加入60 mg 碳酸氢钠，然后加入0.05 ml 乙酰氯化物。混合物在室温下搅拌1小时30分钟，然后过滤。浓缩滤液，并在搅拌下倾入80 ml 冷乙醚中。滤出沉淀的产物并真空干燥。

7-重氮-强力霉素盐酸盐或四氟硼酸盐

搅拌下，向冷却在冰浴中的7-氨基-强力霉素（200 mg，0.4 mmol）在4 ml 0.1N盐酸的甲醇溶液内，加入0.2ml 正丁基亚硝酸酯。溶液在0℃下搅拌30分钟，然后搅拌下倾入200 ml 冷乙醚中。滤出分离的固体，并真空干燥，得到 173 mg 产物。重氮四氟硼酸盐用四氟硼酸（54%乙醚溶液）制备，以代替盐酸。

7-叠氮-强力霉素

搅拌下，向冷却在冰浴中的7-重氮-强力霉素盐酸盐（80 mg，0.14 mmol）在 4.5 ml 0.1N 盐酸的甲醇溶液内，加入12mg 叠氮化钠。溶液在0℃下搅拌2小时，然后搅拌下倾入100 ml 冷乙醚中。滤出沉淀的固体，并真空干燥，得到 43 mg 产物。

7-氨基-9-硝基-强力霉素硫酸盐

搅拌下，向7-氨基-强力霉素（220 g，0.44 mmol）在4ml 浓硫酸的溶液中，在0℃加入硝酸钾（52 mg，0.51 mmol）。产生的混合物在0℃下搅拌15分钟，然后搅拌下倾入300 ml 冷乙醚中。滤出分离的固体，用冷乙醚洗涤并真空干燥。将产物再溶解于甲醇中，过滤，将滤液倾入乙醚中。滤出分离出的固体，并真空干燥，得到 222 g 产物。

7-二甲氨基-9-硝基-强力霉素硫酸盐

搅拌下，向7-二甲氨基-强力霉素（40 g，0.07 mmol）在1.5ml 浓硫酸的溶液中，在0℃加入硝酸钾（12 mg，0.12 mmol）。产生的混合物在0℃下搅拌30分钟，然后搅拌下倾入60 ml 冷乙醚中。滤出分离的固体，用冷乙醚洗涤并真空干燥。LC/MS显示，主要是一种有二个硝基的产物（可能是期望产物的一种硝酸酯）。

7-二甲氨基-9-重氮-强力霉素硫酸盐盐酸盐

搅拌下，向冷却在冰浴中的7-二甲氨基-9-氨基-强力霉素（50 mg）在1.5 ml 0.1N盐酸的甲醇溶液内，加入0.05 ml 正丁基亚硝酸酯。溶液在0℃下搅拌30分钟，然后搅拌下倾入80 ml 冷乙醚中。滤出分离的固体，并真空干燥，得到 38 mg 产物。

7-乙酰氨基-9-硝基-强力霉素硫酸盐

搅拌下，向7-乙酰氨基强力霉素（60 g, 0.095 mmol）在2ml 浓硫酸的溶液中，在0℃加入硝酸钾（11 mg, 0.11 mmol）。产生的混合物在0℃下搅拌5分钟，然后搅拌下倾入80 ml 冷乙醚中。滤出分离的固体，用冷乙醚洗涤并真空干燥。

7-乙酰氨基-9-氨基-强力霉素硫酸盐

搅拌下，向7-乙酰氨基-9-硝基-强力霉素硫酸盐（77 mg, 0.12 mmol）在7ml 乙二醇-甲基乙醚的溶液中，加入60 mg 10% Pd/C。反应混合物在常压下氢化7小时。

用硅藻土滤去催化剂，用甲醇洗。浓缩滤液，然后搅拌下滴加至100ml 冷乙醚中。滤出沉淀的固体，用冷的醚洗涤，并真空干燥，得到 62 mg 产物。

7-乙酰氨基-9-重氮-强力霉素硫酸盐盐酸盐

搅拌下，向冷却在冰浴中的7-乙酰氨基-9-氨基-强力霉素（100 mg）在3 ml 0.1N盐酸甲醇溶液内，加入0.1 ml 正丁基亚硝酸酯。溶液在0℃下搅拌30分钟，然后搅拌下倾入100 ml 冷乙醚中。滤出分离的固体，并真空干燥，得到 92 mg 产物。

7-乙酰氨基-9-叠氮-强力霉素硫酸盐

搅拌下，向冷却的冰浴中的7-乙酰氨基-9-重氮-强力霉素（112 mg, 0.19 mmol）在6ml 0.1N盐酸甲醇溶液内，加入14 mg（0.21 mmol）叠氮化钠。溶液在0℃下搅拌35分钟，然后搅拌下倾入150 ml 冷乙醚中。滤出分离的固体，并真空干燥，得到 94 mg 产物。

强力霉素甲碘化物

将强力霉素游离碱（315 mg）溶于2ml 甲醇和10 ml 四氢呋喃中，然后加入1 ml 甲基碘。将反应混合物保持5天；未出现产物结晶。搅拌下将反应混合物倾入300ml 冷乙醚，过滤分离出的产物，并真空干燥，得到269 mg 产物；LC/MS显示为纯品。

5-乙酰基-强力霉素

将强力霉素（100 mg）在3ml 30%氢溴酸的乙酸溶液在室温下搅拌3.5天；然后搅拌下将反应混合物倾入100 ml 冷乙醚，滤出分离出的产物。LC/MS显示起始物转化不完全，因此将产物（86 mg）在同样反应条件再进行9小时，然后以同样方式分离。

9-叔丁基-强力霉素

将强力霉素 (100 mg) 在2ml 叔丁醇和3ml 甲磺酸的溶液在室温下搅拌18小时, 然后倾入100 ml 冷水, 并用正丁醇提取。用1N氢氧化钠溶液碱化有机提取物, 并用浓盐酸将pH迅速地调节至6.5-7。滤出固体沉淀物, 然后溶于甲醇, 浓缩并在搅拌下滴加至30 ml 乙醚/PET 乙醚冷溶液中。滤出分离的固体, 用冷乙醚洗涤并真空干燥。

9-叔丁基-7-硝基-强力霉素

在室温下搅拌强力霉素盐酸盐 (2g) 在10 ml 叔丁醇和30 ml 甲磺酸中的溶液3小时, 然后加入500 mg 硝酸钾, 产生的混合物再搅拌1小时。将反应混合物倾入100 ml 含23 g 氢氧化钠的冷水溶液中; 然后再滴加氢氧化钠稀释液, 至反应混合物成为碱性。用浓盐酸将 pH 迅速调节至6.5-7。滤除分离出的深色的胶状固体。

用正丁醇提取含水滤液一次, 回收更多产物。将粗产物溶于小量的甲醇, 用高效液相层析法纯化。将从高效液相层析中得到的部分合并, 浓缩至干, 溶于甲醇, 并滴加至50 ml 3:1的乙醚/PET 乙醚的混合物中。滤出沉淀的固体, 得到 788 mg 浅黄色产物。

9-叔-丁基-7-氨基-强力霉素

向9-叔-丁基-7-强力霉素 (500 mg) 在25 ml 乙二醇一甲基醚的溶液中, 加入350 mg 10%Pd/C, 产生的混合物在常压下氢化17小时。用硅藻土滤除催化剂, 用甲醇洗。浓缩残余物, 溶于四氢呋喃并在搅拌下滴加至1:1的乙醚/PET的乙醚溶液中。滤出沉淀的产物, 并真空干燥, 得到 452 mg 产物。

9-叔丁基-7-重氮-强力霉素

向冷却在冰浴中的9-叔丁基-7-氨基-强力霉素 (93 mg, 0.18 mmol) 在2.5 ml 0.1N盐酸甲醇溶液内, 加入0.1 ml 正丁基亚硝酸酯。溶液是在0℃搅拌30分钟, 然后搅拌下将一半倾入30 ml 3:1的乙醚/PET的乙醚冷混合物中。产物如胶状粘附在烧杯的底部。将其再溶解在甲醇中, 并进行浓缩, 将残余物倾入20 ml 冷乙醚中, 立即滤出分离的固体, 进行真空干燥; 获得42 mg 产物。另一半反应混合物直接用于下述9-叔丁基物质。

9-叔丁基-7-叠氮-强力霉素

搅拌下, 在0℃向9-叔丁基-7-重氮-强力霉素反应混合物 (1.5 ml) 中加入8 mg (0.12 mmol) 叠氮化钠。使溶液升温至室温期间, 搅拌3小时。浓缩反应混合物以后, 搅拌下将残

余物倾入冷的3 : 1的乙醚/PET的乙醚混合物中。没有固体分离, 因此将溶液浓缩至干, 获得35 mg 产物。

9-叔丁基-7-二甲氨基-强力霉素

搅拌下, 向含167 mg 9-叔丁基-7-氨基-强力霉素在10 ml 乙二醇一甲基乙醚中9-叔丁基-7-氨基-强力霉素和115 mg 10% Pd/C的反应混合物中, 加入1.2 ml 37%甲醛水溶液。产生的混合物在大气压下氢化3.5小时, 然后用硅藻土滤除催化剂, 用甲醇洗涤。浓缩滤液, 并在搅拌下将残余物倾入10 ml 冷乙醚中。滤出分离的产物, 用冷乙醚洗涤并真空干燥。LC/MS显示为所预期的产物, 但被碱性杂质所污染。

9-叔丁基-7-乙酰氨基-强力霉素硫酸盐

搅拌下, 向9-叔丁基-7-氨基-强力霉素(100 mg)在2ml 1, 3-二甲基-2-咪唑烷酮的溶液中, 加入100 mg 碳酸氢钠, 然后加入0.07 ml 乙酰氯化物。将混合物在室温下搅拌1.5小时, 然后过滤。浓缩滤液, 并在搅拌下倾入100 ml 冷乙醚中。滤除分离出的产物。将粗产物再溶于甲醇, 过滤并在搅拌下滴加至冷的3 : 1的乙醚/PET的乙醚混合物中。过滤收集产物, 并真空干燥, 得到 76 mg 产物。

4-脱二甲氨基-强力霉素

搅拌下, 向四环素甲基碘化物(860 mg)在12 ml 乙酸和12 ml 水的溶液中, 加入432 mg 锌粉。搅拌15分钟后, 滤出锌粉。滤液用86 ml 含0.86 ml 浓盐酸的水稀释。滤出分离的产物, 并真空干燥, 得到 419 mg 产物。

4-脱二甲氨基-9-硝基-强力霉素

搅拌下, 在0℃向4-脱二甲氨基-强力霉素(402 mg, 1 mmol)在20 ml 浓硫酸的溶液中, 加入 111 mg 硝酸钾。搅拌20分钟以后, 反应混合物倾入100 ml 冷水中。将正丁醇加入此含产物的水中, 分出有机层。用正丁醇重复提取两次。浓缩合并的有机提取物, 搅拌下加入到冷水中。滤除分离出的产物。通过用正丁醇再提取含水滤液回收更多产物, 浓缩, 然后倾入冷水中, 再过滤。真空干燥后, 获得353 mg 产物。

4-脱二甲氨基-9-氨基-强力霉素

向4-脱二甲氨基-9-硝基-强力霉素(353 mg)在17 ml 乙二醇一甲基醚的溶液中, 加

入0.1 ml 浓硫酸和200 mg 10% Pd/C, 产生的混合物在常压下氢化10小时。用硅藻土滤除催化剂, 用甲醇洗。浓缩滤液, 并倾入100 ml 乙醚中。滤出分离出的固体, 并真空干燥, 得到 292 mg 产物。

4-脱二甲氨基-9-重氮-强力霉素盐酸盐

搅拌下, 向冷却在冰浴中的4-脱二甲氨基-9-氨基-强力霉素 (220 mg) 在5 ml 0.1N 盐酸甲醇溶液内, 加入0.2ml 正丁基亚硝酸酯。溶液在0℃搅拌30分钟, 然后搅拌下倾入150 ml 2:1的乙醚/PET 乙醚冷混合物中。滤出分离的固体, 并真空干燥, 得到 191 mg 产物。

4-脱二甲氨基-9-叠氮-强力霉素

向冷却在冰浴中的4-脱二甲氨基-9-重氮-强力霉素 (150 mg, 0.32 mmol) 在6.5 ml 0.1N 盐酸的甲醇溶液内, 加入23 mg 叠氮化钠, 产生的混合物在0℃搅拌1小时, 然后在搅拌下倾入120 ml 冷乙醚中。一些固体形成, 滤出后发现不是所期望的产物。将滤液浓缩至干, 加在甲醇中, 并在搅拌下倾入50 ml 冷水中。滤出分离的固体, 并真空干燥。通过用正丁醇提取滤液, 获得更多产物, 浓缩, 倾入水中, 滤出固体, 获得 84 mg 产物。

4-脱二甲氨基-7-硝基-9-叔丁基-强力霉素

在室温下搅拌4-脱二甲氨基-强力霉素 (500 mg 1.25 mmol) 在3ml 叔丁醇和15 ml 甲磺酸的溶液15小时, 然后加入140 mg 硝酸钾, 产生的混合物再搅拌1小时。将反应混合物在搅拌下倾入200 ml 冷水。滤除分离出的固体并在空气中干燥。将粗产物溶于小量的甲醇, 用高效液相层析法纯化。合并从高效液相层析中得到的部分, 浓缩至干, 溶于甲醇, 并滴加至50 ml 冷水中。滤出分离的固体, 真空干燥, 得到 217 mg 产物。

4-脱二甲氨基-7-氨基-9-叔丁基-强力霉素

搅拌下, 向4-脱二甲氨基-7-硝基-9-叔丁基强力霉素 (217mg 0.42 mmol) 在12 ml 乙二醇一甲基醚的溶液中, 加入170mg 10% Pd/C, 产生的混合物在常压下氢化13小时。用硅藻土滤除催化剂, 用甲醇洗。浓缩滤液, 倾入20 3:1的乙醚/PET 乙醚混合物, 得到40 mg 产物。浓缩橙色滤液至干, 另获得138 mg 产物。

4-脱二甲氨基-7-重氮-9-叔丁基-强力霉素

搅拌下, 向冷却在冰浴中的4-脱二甲氨基-7-氨基-9-叔丁基-强力霉素 (165 mg) 在5ml

0.1 N盐酸甲醇溶液内，加入0.15 ml 正丁基亚硝酸酯。溶液在0℃搅拌 30分钟；在搅拌下将其中一半倾入50 ml 冷乙醚中。滤出分离的固体，并真空干燥，得到 50 mg 产物。

4-脱二甲氨基-7-氨基-强力霉素

搅拌下，在0℃向4-脱二甲氨基-强力霉素（400 mg）在4ml 四氢呋喃和4.5 ml 甲磺酸的溶液中，加入418 mg（1.4 mmol）二苄基偶氮二羧酸酯，将产生的混合物在温热到室温的同时搅拌4小时。加入水和正丁醇，分离出两相。水层用乙醚/正丁醇的混合物提取。将合并的有机提取物浓缩至干，然后加入 10 ml 乙二醇一甲基乙醚。然后，加入430 mg 10% Pd/C，将产生的混合物在常压下氢化12小时。用硅藻土滤去催化剂，用甲醇洗。将滤液浓缩，搅拌下倾入3: 1 乙醚/PET 乙醚的冷混合物中；滤出分离的产物，并真空干燥，得到 114 mg 产物。

9-硝基-二甲氨四环素硫酸盐

搅拌下，在0℃向二甲氨四环素盐酸盐（1 g，2.02 mmol）在30 ml 浓硫酸中的溶液中，加入硝酸钾（246 mg）。在0℃，将产生的混合物搅拌45分钟，然后搅拌下倾入1.2 L冷乙醚中。滤出沉淀的固体，用冷的醚洗涤，并真空干燥，得到1.33 g 产物。

9-氨基-二甲氨四环素硫酸盐

搅拌下，向9-硝基-二甲氨四环素硫酸盐（500 g，0.83 mmol）在10ml 乙二醇一甲基乙醚和7ml 甲醇的溶液中，加入250 mg 10% Pd/C。反应混合物在大气压力下氢化4小时。用硅藻土滤去催化剂，用甲醇洗。滤液浓缩，然后在搅拌下滴加至600ml 冷乙醚中。滤出沉淀的固体，用冷的醚洗涤，并真空干燥，得到 465 mg 产物。

9-重氮-二甲氨四环素硫酸盐盐酸盐

搅拌下，向冷却在冰浴中的9-氨基-二甲氨四环素硫酸盐（100 mg）在3 ml 0.1N盐酸甲醇的溶液内，加入0.1 ml 叔丁基亚硝酸盐（或正丁基亚硝酸酯）。溶液在0℃搅拌 30分钟，然后然后在搅拌下倾入100ml 冷乙醚中。滤出沉淀的固体，并真空干燥，得到 87 mg 橙棕色产物。

9-叠氮-二甲氨四环素硫酸盐

搅拌下，向9-重氮-二甲氨四环素硫酸盐盐酸盐（485 mg，0.83 mmol）在18 ml 0.1 N

盐酸的甲醇溶液中，加入59 mg 叠氮化钠。溶液在室温下搅拌2小时，然后过滤并在搅拌下将滤液倾入500 ml 冷乙醚中。滤出分离的固体，并真空干燥，得到 480 mg 米黄色产物。

9-乙酰氨基-二甲氨四环素

搅拌下，向9-氨基-二甲氨四环素硫酸盐（100 mg, 0.175 mmol）在1.5ml 1,3-二甲基-2-咪唑烷酮的溶液中，加入100 mg 碳酸氢钠，然后加入0.05 ml 乙酰氯化物。产生的混合物在室温下搅拌45分钟，然后搅拌下倾入150 ml 冷乙醚中。滤出分离的固体，并真空干燥，得到 165 mg 产物。

4-脱二甲氨基-二甲氨四环素

将二甲氨四环素游离碱（175 mg, 0.38 mmol）溶于2ml 四氢呋喃，然后加入0.43 ml 甲基碘化物。没有结晶产物出现。浓缩反应混合物，并在搅拌下倾入200 ml 冷乙醚/PET 乙醚（比例为40:60）中。滤出分离的产物，并真空干燥。将产物重新置于同样的反应条件中，再进行反应3天。如前所述，从乙醚中析出沉淀物，获得 123 mg 二甲氨四环素甲碘化物。将粗产物溶于2ml 乙酸，搅拌下加入2ml 水和60 mg 锌粉。搅拌15分钟后，滤出锌粉。滤液用15 ml 含浓盐酸的水稀释。合并的有机提取物用硫酸镁干燥并浓缩。滤出分离的固体，并真空干燥，得到 150 mg 黄色产物。

4-脱二甲氨基-9-硝基-二甲氨四环素

室温下，将4-脱二甲氨基二甲氨四环素（415 mg, 1 mmol）溶于 30 ml 浓硫酸。将溶液冷却在冰浴上，搅拌下加入硝酸钾（110 mg, 1.09 mmol）。产生的混合物搅拌15分钟，然后搅拌下倾入300 ml 冷乙醚中。滤出分离的固体，用冷乙醚洗涤并真空干燥。LC/MS显示初始物质不完全转化，因此将产物再溶解在15 ml 浓硫酸中，在0℃加入50 mg 硝酸钾，搅拌产生的混合物45分钟。如前所述分离产物，得到 542 mg 产物。

7, 9-二溴脱甲脱氧四环素

在0℃，搅拌下向脱甲脱氧四环素（50 mg, 0.12 mmol）在1.5 ml 浓硫酸的溶液中，加入42 mg N-溴琥珀酰亚胺。30分钟以后，搅拌下将反应混合物倾入60 ml 冷乙醚中。滤出分离的固体，并真空干燥，得到 70 mg 黄色的产物。

7-硝基-脱甲脱氧四环素与 9-硝基-脱甲脱氧四环素混合物

在0℃，搅拌下向脱甲脱氧四环素（40 mg，0.09mmol）在1.5 ml 浓硫酸中的溶液中，加入10 mg 硝酸钾。20分钟以后，搅拌下将反应混合物倾入50 ml 冷乙醚中。滤出分离的固体，并真空干燥，得到 59 mg 产物。LC/MS显示，两种一硝酸盐产物的比例为1.6：1。

在本发明进一步的测试中，用十种不同的细菌菌株评价了五种测试产物的最低抑菌浓度（MIC）。五个测试产物的MIC评价研究用Macrodilution Broth Method改良方法进行，该方法记载在NCCLS文献M7-A5, Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically 第五版中。每个测试产物用十种细菌菌株的悬浮物的评价进行两次。每个产物测试前，用灭菌的Mueller-Hinton Broth (MHB) 稀释（w/v），达到一个基础初始浓度：1000 μg/mg，160 μg/ml 效价。

产物1-四环素衍生物 批号：INN01182，分子量615	将14.8 mg 该产物溶于92.5ml MHB，达到 160 μg/ml 初始浓度。
产物2-四环素衍生物 批号：INN01183，分子量627	将13.6 mg 该产物溶于85.0ml MHB，达到 160 μg/ml 初始浓度。
产物3-四环素衍生物 批号：INN01185，分子量655	将11.9 mg 该产物溶于74.4ml MHB，达到 160 μg/ml 初始浓度。
产物4-四环素衍生物 批号：INN01189，分子量625	将9.6 mg 该产物溶于60.0ml MHB，达到 160 μg/ml 初始浓度。
产物5-四环素衍生物 批号：INN01195，分子量643	将13.8 mg该产物溶于86.25ml MHB，达到 160 μg/ml 初始浓度。

测试之前约48小时，从含细菌的冷冻小瓶中，将每种受试细菌分别接种在每个无菌的Tryptic Soy Broth试管中，见下表。肉汤培养基在 $35 \pm 2^\circ\text{C}$ 培养大约 24小时。将如上所述制备的肉汤培养基接种到置于陪替氏皿内的胰蛋白酶大豆琼脂的表面上，在 $35 \pm 2^\circ\text{C}$ 培养约24小时。如此生产在琼脂平板表面上的细菌“菌苔”（lawns）被用作配制评价的混悬物。

在开始测试之前，对每种细菌配制含大约 1.0×10^9 CFU/ml 细菌的初始评价悬浮物，配制方法是通过接种取自于固体培养基的细菌及加入氯化钠冲洗剂（Sodium Chloride Irrigation），配制方法如上所述。评价所用的最终悬浮物每种细菌含量大约为 1.0×10^6 CFU/ml，配制方法是将0.2 ml 1.0×10^9 CFU/ml悬浮物置于含 200 ml MuellerHinton Broth 的250 ml 无菌聚丙烯瓶内中。在用于测试之前，将最终评价悬浮物进行充分混合。培养盘

中的最终稀释度是 10^{-3} 、 10^{-4} 和 10^{-5} 。将这些培养盘在 $35 \pm 2^\circ\text{C}$ 培养，直到可观察到细菌充分生长。(表 I)。

下列培养，对培养皿上的菌落用手持计数器进行手工计数。CFU(菌落形成单位)在30-300范围的用于数据计算。

每个待评价悬浮物计算初始群体(CFU/ml)公式如下：

$$\text{CFU/ml} = (C_i \times 10^{-D})$$

C_i = 2个平皿计数的平均值

D = 所用的平板计数的稀释因子

对于每种待评价悬浮物，之后接种在每管产物/肉汤中的群体(CFU/ml)按下式计算：

$$\text{每管群体数 (CFU/ml)} = (C_i \times 10^{-D}) / 2$$

其中

C_i = 2个平皿计数的平均值

D = 所用的平板计数的稀释因子

2 = 之后接种在每管产物/肉汤中的总体积(ml)

测试步骤如下：将30 ml Mueller-Hinton Broth置于无菌瓶中30 ml 产物(初始浓度是 $160 \mu\text{g/ml}$)加入到11个系列瓶(每个含30 ml Mueller-Hinton Broth)的第1瓶中，并且充分混合，以达到1: 2的产物稀释度(v/v)。从上述配制的瓶中移去30 ml用剩余10瓶按1: 2(v/v)稀释度进行系列稀释，(10瓶的产物稀释度分别是1: 4, 1: 8, 1: 16, 1: 32, 1: 64, 1: 128, 1: 256, 1: 512, 1: 1024 和1: 2048)，每瓶中均含30 ml Mueller-Hinton Broth。每瓶在移去30 ml 部分用作进行下次系列稀释之前，均进行充分混合。将每个产物稀释液1.0 ml 和初始产物($160 \mu\text{g/ml}$ 产物浓度)1.0 ml 分别转至无菌试管中。配制12个系列管，每个含1.0 ml 适当的产物稀释液(1: 1, 1: 2, 1: 4, 1: 8, 1: 16, 1: 32, 1: 64, 1: 128, 1: 256, 1: 512, 1: 1024 和1: 2048)用于评价每种产物对每种细菌的作用(表1)。这样，得到的产物浓度范围从 $160 \mu\text{g/ml}$ 到 $0.078 \mu\text{g/ml}$ 。

将1.0 ml 含大约 1.0×10^6 CFU/ml 混悬物加入到系列产物稀释管的每个管中，由此产生最终产物稀释系列是1: 2, 1: 4, 1: 8, 1: 16, 1: 32, 1: 64, 1: 128, 1: 256, 1: 512, 1: 1024, 1: 2048 和 1: 4096，每个稀释管含有大约 5.0×10^5 CFU/ml 待评价细菌。这样，最终产物浓度范围从 $80 \mu\text{g/ml}$ 到 $0.039 \mu\text{g/ml}$ 。试验程序如上所述进行，每个测试产物对

每种细菌的试验重复两次(表 I)。阳性对照管(生长对照)含1.0 ml Mueller-Hinton Broth 和1.0 ml 待评价混悬物。还配制了仅含Mueller-Hinton Broth 的阴性对照管(培养基)是无菌对照(未接种细菌)。

通过分别在每个无菌的试管中加入1.0 ml 每个产物稀释液,为每个产物准备了产物混浊度对照。在每个产物稀释管中加入1.0 ml 无菌的Mueller-Hinton Broth,并使用涡流混合器充分地混合,由此产生的最终产物稀释度与如上所述相同。在 $35 \pm 2^\circ\text{C}$ 培养待评价的混悬物/产物稀释管和对照管20小时,直到在阳性对照管中的生长清晰可见。

然后进行培养,检查管中细菌生长,根据可见的混浊度确定。

记录每个测试产物对每个待评价细菌的最低抑菌浓度(MIC),为测试产物完全抑制细菌生长的最高稀释度,检测是用目视法。记录每个待测产物对每种细菌两次检测的结果,然后将平均值作为最终报告值。

表 I

细菌种属	ATCC#	培养时间* (MIC管)	培养温度*	培养基
粪肠球菌 (<i>Enterococcus faecalis</i>)	29212	20小时	$35 \pm 2^\circ\text{C}$	TSB/TSA/MHB
大肠埃希氏杆菌	25922	20小时	$35 \pm 2^\circ\text{C}$	TSB/TSA/MHB
大肠埃希氏杆菌 (抗四环素)	51657	20小时	$35 \pm 2^\circ\text{C}$	TSB/TSA/MHB
大肠埃希氏杆菌 (抗四环素)	51658	20小时	$35 \pm 2^\circ\text{C}$	TSB/TSA/MHB
大肠埃希氏杆菌 (抗四环素)	51659	20小时	$35 \pm 2^\circ\text{C}$	TSB/TSA/MHB
金黄色葡萄球菌 (抗四环素)	27217	20小时	$35 \pm 2^\circ\text{C}$	TSB/TSA/MHB
金黄色葡萄球菌 (抗四环素)	27659	20小时	$35 \pm 2^\circ\text{C}$	TSB/TSA/MHB
金黄色葡萄球菌 (抗四环素)	27660	20小时	$35 \pm 2^\circ\text{C}$	TSB/TSA/MHB

金黄色葡萄球菌	29213	20小时	35 ± 2℃	TSB/TSA/MHB
---------	-------	------	---------	-------------

* =初始群体培养皿先在室温下（20℃-27℃）随意地培养约48小时，然后在35 ± 2℃培养大约72小时。

表 II 提供每一测试产物对10种测试细菌中每一种的最低抑菌浓度，以产物稀释度表示。

表 III 提供每一测试产物对10种测试细菌中每一种的最低抑菌浓度，以产物浓度（μg/ml）表示。每个产物的初始溶液浓度，以1000 μg/mg，160 μg/ml 为基础。

表II

细菌种属	ATCC#	最低抑菌浓度（以产物稀释度表示）				
		1 ^o 产物	2 ^o 产物	3 ^o 产物	4 ^o 产物	5 ^o 产物
粪肠球菌 (<i>Enterococcus faecalis</i>)	29212	<1: 2	1: 16	1: 16	1: 2	1: 8
大肠埃希氏杆菌	25922	1: 2	<1: 2	<1: 2	<1: 2	1: 2
大肠埃希氏杆菌 (抗四环素)	51657	<1: 2	<1: 2	<1: 2	<1: 2	<1: 2
大肠埃希氏杆菌 (抗四环素)	51658	<1: 2	<1: 2	<1: 2	<1: 2	<1: 2
大肠埃希氏杆菌 (抗四环素)	51659	<1: 2	<1: 2	<1: 2	<1: 2	<1: 2
铜绿假单胞菌 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>)	27853	<1: 2	<1: 2	<1: 2	<1: 2	<1: 2
金黄色葡萄球菌 (抗四环素)	27217	<1: 2	1: 32	1: 32	1: 8	1: 16
金黄色葡萄球菌 (抗四环素)	27659	<1: 2	1: 32	1: 24	1: 8	1: 16
金黄色葡萄球菌 (抗四环素)	27660	<1: 2	1: 32	1: 16	1: 8	1: 32
金黄色葡萄球菌	29213	1: 8	1: 32	1: 32	1: 8	1: 32

表 III

细菌种属	ATCC#	最低抑菌浓度 (以产物稀释度表示)				
		1 [#] 产物	2 [#] 产物	3 [#] 产物	4 [#] 产物	5 [#] 产物
粪肠球菌 (<i>Enterococcus faecalis</i>)	29212	>80	10	10	80	20
大肠埃希氏杆菌	25922	80	>80	>80	>80	80
大肠埃希氏杆菌 (抗四环素)	51657	>80	>80	>80	>80	>80
大肠埃希氏杆菌 (抗四环素)	51658	>80	>80	>80	>80	>80
大肠埃希氏杆菌 (抗四环素)	51659	>80	>80	>80	>80	>80
铜绿假单胞菌 (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>)	27853	>80	>80	>80	>80	>80
金黄色葡萄球菌 (抗四环素)	27217	>80	5	5	20	10
金黄色葡萄球菌 (抗四环素)	27659	>80	5	6.67	20	10
金黄色葡萄球菌 (抗四环素)	27660	>80	5	10	20	5
金黄色葡萄球菌	29213	20	5	5	20	5

在另一些研究中, 还研究了本发明的四环素衍生物作为基质降解金属蛋白酶(matrix degrading metalloproteinases, 简称 MMPs) 抑制剂的活性, MMPs 与恶性肿瘤生长和转移有关。这些研究用哥本哈根大鼠的Dunning MAT LyLu 肿瘤模型, 该模型来自移植了肿瘤的哥本哈根大鼠, 从一只老年哥本哈根大鼠脊部前列腺原发的前列腺肿瘤移植而来。当进行注射后, 该MAT LyLu 肿瘤自然地转移到80-100%的被注射动物的淋巴结和肺, 并发生骨转移。试验中, 试验用药是每日新配制的含每种药物 10 mg /ml及2%羧甲基纤维素的溶液。

本研究初步评价了药物的毒性, 用两组各5只未移植肿瘤的动物, 每只动物用四环素类药物 (9-氨基-强力霉素和 9-硝基-强力霉素), 剂量为 40 mg /kg /日, 用药7日。

三组动物(10只/组)通过灌胃给药,分别喂空白对照(药物赋形剂)及两种药物中的一种,共用药三周,然后每周加大药量,为三倍用量,直到动物死亡或处死。在尾静脉注射植入MAT LyLu 肿瘤细胞之前7天开始给药。约 0.1 ml 肿瘤细胞悬液注入尾部旁静脉(lateral tail veins)。药物的选择根据两个因素:(1)药物作用(2)与疾病有关的药物。下表(表IV)列出了对照组和治疗组动物的存活时间和每周体重。如表所示,9-氨基-强力霉素和9-硝基-强力霉素显示出可显著增加肿瘤移植之后的存活数,但与对照组相比,体重的改变无差异。此后一发现特别有意义,因为常规的抗癌治疗往往会导致体重减轻。

表 IV

前列腺肿瘤移植的 天数	存活数		
	9-氨基-强力霉素	9-硝基-强力霉素	对照组
14	10	8	9
17	10	8	8
24	10	8	7
27	10	8	6
28	9	8	6
29	9	6	5
30	7	4	5
34	7	4	3
42	7	4	3

在另一研究中,评价了多种四环素衍生物抑制 MMPs 的活性以及对各种癌的百分抑制率。结果见表 V,表明了本发明的治疗效果。研究的目的之一是评估系列四环素衍生物是否可作为纯的人基质金属蛋白酶(包括MMP1, 2, 3, 7, 9和14)的抑制剂。本发明的四环素衍生物在mM- μ M 范围内是有效的抑制剂。

具体实施方式

1. 测定MMP 1 (胶原酶-1)被四环素衍生物抑制的方法

MMP1活性的测定,是通过从 14 C 乙酰化的大鼠皮肤 I 型胶原质中可溶的 14 C标记的胶原质片断的释放来确定的。(测定方法见Enzymology80 711, 1981)。

实验材料:

100 μg ^{14}C 标记的大鼠皮肤 I 型胶原质 (5-6000 dpm)

50 mM Tris HCl pH 7.9

15 mM CaCl_2 , 0.02% 叠氮化物

重组人 MMP1 3-4nM

± 四环素(1 mM以下)在总体积为300ul的溶液中

在35℃培养5小时。以10,000 g 转速,在4℃10分钟离心,除去未断裂的胶原质纤维(在前10分钟内形成的)。取200 μl 上清液在 Packard Opti Phase Supermix 闪烁液中用闪烁计数器进行计数。仅有来自实验(10-70%胶原质溶解)中呈线性关系的数据可被使用。仅通过每个样品的浓度范围得出的MMP1 的抑制百分率。可用线性回归分析计算出每种四环素的 IC50 值。

2. 测定MMP 2 (白明胶酶A) 被四环素衍生物抑制的方法

MMP 2活性的测定,是通过从 ^{14}C 乙酰化的大鼠皮肤 I 型白明胶中可溶的片断释放的三氯乙酸(TCA)来确定的。(测定方法见 Enzymology 248, 470, 1995. Biochem. J. 195, 1981)。

实验材料:

100 μg ^{14}C 标记的白明胶(I 型胶原质, 60℃变性20分钟)

50 mM Tris HCl pH 7.9

15 mM CaCl_2 , 0.02% 叠氮化物

重组人 MMP 1, 0.1-0.5 nM

± 四环素(1 mM以下)在总体积为250ul的溶液中

在37℃培养16小时。冷却培养物停止反应,并加入50 μl 冷的90% (w/v) 三氯乙酸,小心地混合均匀。在4℃使三氯乙酸沉淀15分钟,然后以10,000 g 转速,在4℃离心10分钟,取200 μl 三氯乙酸上清液,在 Packard Opti Phase Supermix 闪烁液中进行闪烁计数,以确定放射含量。仅有来自实验(10-70%溶解)中呈线性关系的数据可被使用。通过每个四环素样品的浓度得出的MMP2 的抑制百分率。用线性回归分析计算出每种四环素的 IC50 值。

3. 测定MMP 3 (溶基质素 1) 被四环素衍生物抑制的方法

MMP 3活性的测定, 是通过从 ^{14}C 乙酰化的 β 酪蛋白(Sigma)中可溶的片断释放三氯乙酸(TCA)来确定的。测定方法见Enzymology 248, 451 (1995)。

实验材料:

100 μg ^{14}C 标记的酪蛋白(7000 dpm)

50 mM Tris HCl pH 7.9

15 mM CaCl_2 , 0.02% 叠氮化物

重组人 MMP 3, 0.25- 1.0nM

± 四环素(1 mM以下)在总体积为250 μl 的溶液中

在37℃培养16小时。冷却培养物停止反应, 并加入500 μl 冷的18%三氯乙酸, 在冰上放置15分钟。在4℃, 以10,000 g 转速离心10分钟, 以除去三氯乙酸沉淀。取200 μl 三氯乙酸上清液用于进行闪烁计数。仅有来自实验(10-60%溶解)中呈线性关系的数据可被使用。通过每个待选四环素的浓度得出的MMP3 的抑制百分率。用线性回归分析计算出每种四环素的IC50 值。

4. 测定 MMP7 (Matrilysin) 被四环素衍生物抑制的方法

MMP7 活性的测定, 是通过从 ^{14}C 乙酰化的 β 酪蛋白(Sigma)中可溶的片断释放三氯乙酸(TCA)来确定的。测定方法见 Enzymology 248, 451 (1995)。

实验材料:

100 μg ^{14}C 标记的酪蛋白(7000 dpm)

50 mM Tris HCl pH 7.9

15 mM CaCl_2 , 0.02% 叠氮化物

重组人 MMP 7, 1.5nM

± 四环素(1 mM以下)在总体积为250 μl 的溶液中

在37℃培养16小时。冷却培养物停止反应, 并加入500 μl 冷的18%三氯乙酸, 在冰上放置15分钟。在4℃, 以10,000 g 转速离心10分钟, 以除去三氯乙酸沉淀。取200 μl 三氯乙酸上清液用于进行闪烁计数。仅有来自实验(10-60%溶解)中呈线性关系的数据可被使用。通

过每个待选四环素的浓度得出的MMP7 的抑制百分率。用线性回归分析计算出每种四环素的 IC50 值。

5. 测定 MMP 9 (白明胶酶) 被四环素衍生物抑制方法

MMP 9 活性的测定, 是通过从¹⁴C 乙酰化的大鼠皮肤 I 型可溶的片断释放三氯乙酸 (TCA) 来确定的。测定方法见Enzymology 248, 470, 1995. Biochem. J. 195, 1981。

实验材料:

100 μg ¹⁴C 标记的白明胶 (胶原质, 60℃变性20分钟)

50 mM Tris HCl pH 7.9

15 mM CaCl₂, 0.02% 叠氮化物

重组人 MMP 9, 1.2-2 nM

± 四环素 (1 mM以下) 在总体积为250ul的溶液中

在37℃培养16小时。冷却培养物停止反应, 并加入50 μl冷的90% (w/v) 三氯乙酸, 小心地混合均匀。在4℃使三氯乙酸沉淀15分钟, 然后以10,000 g 转速, 在4℃离心10分钟, 取200 μl 三氯乙酸上清液, 在 Packard Opti Phase Supermix 闪烁液中进行闪烁计数, 以确定放射含量。仅有来自实验 (10-70%溶解) 中呈线性关系的数据可被使用。通过每个四环素样品的浓度得出的MMP9 的抑制百分率。用线性回归分析计算出每种四环素的 IC50 值。

6. 测定 MMP 14 (MTI-MMP) 被四环素衍生物抑制的方法

MMP 14 活性的测定, 是通过从¹⁴C 乙酰化的大鼠皮肤 I 型可溶的片断释放三氯乙酸 (TCA) 来确定的。测定方法见Enzymology 80 711, 1981)。

实验材料:

100 μg ¹⁴C 标记的胶原质 (5-6000 dpm)

50 mM Tris HCl pH 7.9

15 mM CaCl₂, 0.02% 叠氮化物

重组人 MMP 14, 50-100 nM

± 四环素 (1 mM以下) 在总体积为300ul的溶液中

在35℃培养15小时。以10,000 g 转速,在4℃10分钟离心除去未断裂的胶原质纤维(在前10分钟内形成的),取200 μl 上清液在 Packard Opti Phase Supermix 闪烁液中用闪烁计数器进行计数。仅有来自实验(10-70%胶原质溶解)呈线性关系的数据可被使用。仅通过每个样品的浓度范围得出的MMP1的抑制百分率,计算出每种四环素的 IC50 值。

另一目的是分析四环素衍生物在体外对下列肿瘤细胞的化学侵入的特异性作用:

C8161 人黑色素瘤细胞

MDA-MB-231人乳腺癌细胞

PC3人前列腺癌细胞

RPM 18226人骨髓瘤细胞

Ark人骨髓瘤细胞

Arp-1人骨髓瘤细胞

选择体外膜侵入培养系统(Membrane Invasion Culture System, MICS)化学侵入试验,以测定四环素衍生物药物侵入时对特异的人癌细胞的改变。每种化合物原液在含2% DMSO, pH为 10.0的水中成为水合物。溶解后立即在溶液中加入HCl,调节pH为7.5-8.0。将该溶液用薄片包裹,试验的24小时中,在4℃保存。每次试验新制备化合物。对肿瘤细胞入侵的化学侵入试验用前述体外膜侵入培养系统进行。

该MICS系统是一个经过热处理的塑料复合系统,包括两个配套的14孔板,直径为13 mm。两板之间有孔径为 10 μm 的一层滤膜,覆盖有一层已知成分的基质,由人层粘连蛋白/胶原质 IV/白明胶组成,在MICS的孔顶部和底部形成一层厚度为35 μm 的屏障。在放置此屏障之前,下板的孔中加入无血清的RPMI 培养基,培养基50%来自保存完好的人成纤维细胞的2日培养物,已通过离心或经过0.45 μm 无菌滤器过滤除去细胞或细胞碎片。该系统组装完毕后,此屏障置于下部板的孔上,将新鲜的无血清培养基置于上板的孔上。然后将5万个肿瘤细胞加在孔中,孔中或者有受试化合物存在,或者有 DMSO 载体(对照)。在12个试验孔中,3个随机选择的孔作为对照,3个孔中加入1 μg /ml 受试化合物,3个孔中加入10 μg /ml, 3个孔中加入25 μg /ml。24小时之后,从下部的孔中取出细胞和培养基,以磷酸缓冲盐水和2 mM EDTA代替。此溶液用于从下部的孔中去除所有细胞,对从同一孔中恢复的细胞和培养基增加此冲洗。用斑点印迹多功能系统收集这些样品于含多熔素的孔径为3 μm 的聚碳酸酯膜上。将收集的滤器固定在甲醇中,用 Wright's stain (Leukostat 染色试剂盒)在原位进行染色。将这些滤器放在显微镜载玻片上,同时还加入浸镜用油(减少从孔中产生的光折射)。进行5次显微镜视野计数,以计算24小时内透过膜入侵的细胞数。然后对该数据进行统计学分析,讨论如下。

表 V

化合物编号	基质降解金属蛋白酶(MMPs) ¹ 抑制活性						人细胞系的评价和抑制百分率			
	MMP-1	MMP-2	MMP-3	MMP-7	MMP-9	MMP-14	乳腺癌 MDA-MB-231	黑色素瘤 C8161	复合骨髓瘤 RPMI-8226	前列腺癌 PC-3 ML
1	267	>700	258	815	43	86	7 ^a 20 ^b 5 ^b 25 ^b 25 ^b 32 ^b	5 20 35 ^b 40 ^b 49 ^b 56 ^b	20 10 15 21 ^b 21 ^b 29 ^b	2 47 ^b 60 ^b 13 ^b 24 ^b 24 ^b
2	479	80	348	>1000	117	119	20 15 30 ^b	20 ^b 25 ^b 27 ^b	+8+10 ^b +11 1 ^b +4 ^b 7 ^b	20 8 15
3	>1000	>1000	304	>1000	136	216	+8 +2 12	30 ^b 22 ^b 15 ^b	+7 +23 ^b 27 ^b +22 +3 +24 ^b	3 +1 25 ^b
4	409	421	219	278	36	61	5 6 2	27 ^b 24 ^b 17	+4 +5 +14	10 +8 3
5	647	86	237	441	194	447	6 +4 46 ^b	15 27 ^b 35 ^b	6 4 36 17 37 ^b 42 ^b	44 ^b 35 46 ^b
6	394	135	241	>1000	83	56	+5 +17 ^b 27 ^b 24 44 ^b 42 ^b	18 ^b 33 ^b 32 ^b 8 21 ^b 33 ^b	+6 +25 ^b +5 12 ^b 10 5	21 26 41 ^b 13 32 ^b 30 ^b
7	R(5)	>1000	300	335	64	>1000	+18 +41 ^b +27	7 14 16	+14 ^b 12 +2	0 0 3
8	>1000	599	232	388	>1000	>1000	+10 +5 +13	13 ^b 41 ^b 40 ^b	11 3 +2	0 +4 0
9	372	337	154	507	28	29				
10	499	484	96	>1000	41	53	9 27 ^b 37 ^b +5 0 8	21 22 11 7 28 ^b 30 ^b	3 5 29 ^b	40 ^b 50 ^b 65 ^b 9 16 5
11	427	>1000	270	>1000	96	46	6 15 36 ^b	16 46 ^b 41 ^b		+3 0 36 ^b
12	>1000	>1000	390 ^a	503	270	>1000		+11 +13 +12		
13	126	48	206	>1000	64	14	4 0 +9	6 12 14	+11 +13 +12	8 23 ^b 13
14	279	R	>1000	R	R	386				
15	>1000	234	738	716	402	768				
16	452	215	>1000	569	215	715				
17	122	>1000	350		110	98				
18	123	233	335		131	102				
19	270	925	394		98	90				
20	429	511	281		162	266				
21	293	>1000	>1000		79	115				
22	396	254	462		341	459				
23	>1000	306	>1000		>1000	>1000				
24	405	724	191		127	160				
25	974	397	303		148	185				
26	>1000	413	>1000		384	586				
27	498	963	149		101	92	15 35 72 ^b	0 +1 73	24 ^b 6 42 ^b	17 ^b 35 ^b 70

							5 17 48 ^B	11 +38 ^B 51 ^B	20 9 11	9 56 ^B 70
28	>1000	>1000	231		125	49	+24 +36 ^B 54 ^B +7 +15 45 ^B	+20 34 ^B 40 ^B +25 ^B +53 ^B 19	4 +10 34 ^B 5 +3 62 ^B	7 +11 ^B 80 35 ^B 28 ^B 61
29	895	983	213		172	98	+41 ^B 7 59 ^B +13 +25 ^B 17	12 +20 61 ^B +10 +14 ^B 1	13 12 8 29 ^B 13 35 ^B	28 ^B 50 ^B 58 8 8 69
30	576	>1000	938		>1000	>1000				
31	621	258	>1000		311	593				
32	601	236	244		214	197				
33	295	263	205		142	94				
34	242	242	136		308	197				
35	947	249	218		397	108				
36	539	>1000	283		>1000	608				
37	279	>1000	274		445	41	+6 1 46 ^B	+1 20 69 ^B	10 5 46 ^B	11 26 36
38	230	175	95		215	69	+7 37 ^B 70 ^B +14 +14 37	3 1 66 ^B +28 +26 39	33 ^B 13 +11 4 +49 ^B +8	37 ^B 41 ^B 41 38 ^B 27 ^B 52
39	860	186	682		114	83	18 ^B 29 ^B 76 ^B	10 11 24	5 10 46 ^B	44 ^B 67 ^B 69 ^B
40	560	362	91		R	29	9 15 20 ^B	+1 +5 +4	16 11 9	+1 +7 +4
41	478	889	54		250	403	+8 3 2	2 8 6	7 +6 14	+4 4 4
42	R	606	1557		405	428				
43	600	2482	174		319					
44	1438	1468	224		591					
45	384	2446	194		6626					
46	194	3803	42		59	90	20 ^B +5 +1	21 7 10	7 +11 12	20 16 27 ^B
47	318	117	68		88	60	+17 +16 ^B 0	+30 +4 +2	28 18 60 ^B	3 3 5
48	12831	1929	506		424	354				
49	372	1572	141		489	87	6 +5 +1	27 ^B 7 30 ^B	11 +2 15	4 +5 6
50	211	2533	48		34	40	7 0 2	5 +2 1	+14 -8 +13	+14 +17 +10
51							+15 ^B +18 25 ^B	+9 +31 ^B +122 ^B	14 +26 ^B +2	+4 +13 4
52	>1000	250	>1000	>1000	32	68	5 12 52 ^B	5 15 30	2 26 ^B 68 ^B 19 ^B 33 ^B 46 ^B	52 ^B 68 ^B 70 ^B 31 ^B 48 ^B 63 ^B
53							9 49 ^B 83 ^B	+40 ^B +158 ^B 83 ^B	+95 ^B 18 84 ^B	29 ^B 21 45 ^B

化合物 编号	基质降解金属蛋白酶(MMPs) ¹ 抑制活性						人细胞系的评价和抑制百分率 ^a		
	MMP-1	MMP-2	MMP-3	MMP-7	MMP-9	MMP-14	RPMI-8226	ARP-1	ARK
1	267	>700	258	815	43	86	20 10 15 21 ^b 21 ^b 29 ^b	+9 +13 1	9 +9 +8 13 8 17 ^b
2	479	80	348	>1000	117	119	+8 +10 ^b +11 1 ^b +4 ^b 7 ^b	10 7 6	20 ^b 9 ^b 10
3	>1000	>1000	304	>1000	136	216	+7 +23 ^b +27 ^b +22 +3 +24 ^b	+13 +1 +16	+11 +6 +15
5	647	86	237	441	194	447	6 4 36 17 37 ^b 42 ^b	+25 ^b 1 4 ^b	+7 22 ^b 21 ^b
6	394	135	241	<1000	83	56	+6 +25 ^b +5 12 ^b 10 5	NE	12 0 8
9	372	337	154	507	28	98	21 ^b 24 ^b 28 ^b	+14 +21 ^b 7	17 ^b 24 ^b 20 ^b
10	499	484	96	>1000	41	53	3 5 29 ^b	NE	6 +7 1
13	126	48	206	>1000	64	14	+11 +13 +12	NE	2 +7 1

表V中，

^a是所用的浓度：1 μg /ml、10 μg /ml、25 μg /ml

^b是显著性差异，即P<0.05

¹ IC₅₀的单位是 μm，除非特别指出

5 2 预测值

+ 增加入侵

NE 未评价

R 待重复（数目次数重复）

表V中化合物

- 10
- 1: 9-硝基-6-脱氧-5-羟基四环素硫酸盐
- 2: 9-氨基-6-脱氧-5-羟基四环素硫酸盐
- 3: 9-异丙基氨基-6-脱氧-5-羟基四环素硫酸盐
- 4: 7-二甲氨基-6-脱甲基-6-脱氧-9-硝基四环素硫酸盐
- 5: 同2
- 15
- 6: 9-叠氮-6-脱氧-5-羟基四环素硫酸盐
- 7: 9-氨基-7-二甲氨基-6-脱甲基-6-脱氧四环素硫酸盐
- 8: 9-乙酰氨基-7-二甲氨基-6-脱甲基-6-脱氧四环素硫酸盐
- 9: 7-二甲氨基-6-脱甲基-6-脱氧四环素-9-重氮硫酸盐盐酸盐

- 10: 9-叠氮-7-脱甲基氨基-6-脱甲基-6-脱氧四环素硫酸盐
- 11: 6-脱氧-5-羟基四环素-9-重氮硫酸盐
- 12: 7-氨基-6-脱氧-5-羟基四环素硫酸盐
- 13: 7, 9-二溴-6-脱甲基-6-脱氧四环素硫酸盐
- 5 14: 7-氨基-6-脱氧-5-羟基-9-硝基四环素硫酸盐
- 15: 7-二甲氨基-6-脱氧-5-羟基四环素硫酸盐
- 16: 9-乙酰氨基-6-脱氧-5-羟基四环素硫酸盐
- 17: 7-二正丁氨基-6-脱氧-5-羟基四环素硫酸盐
- 18: 7-二正己氨基-6-脱氧-5-羟基四环素硫酸盐
- 10 19: 7-二-(3, 3-二甲丁基)氨基-6-脱氧-5-羟基四环素硫酸盐
- 20: 7-叠氮-6-脱氧-5-羟基四环素硫酸盐
- 21: 6-脱氧-5-羟基四环素-7-重氮硫酸盐
- 22: 7-乙酰氨基-9-硝基-6-脱氧-5-羟基四环素硫酸盐
- 23: 7-乙酰氨基-6-脱氧-5-羟基四环素硫酸盐
- 15 24: 7-二正丙氨基-6-脱氧-5-羟基四环素硫酸盐
- 25: 7-异丁氨基-6-脱氧-5-羟基四环素硫酸盐
- 26: 7-乙酰氨基-9-氨基-6-脱氧-5-羟基四环素硫酸盐
- 27: 7-异丁基甲氨基-6-脱氧-5-羟基四环素硫酸盐
- 28: 6-脱氧-5-乙酰基-四环素硫酸盐
- 20 29: 7-乙酰异丁基氨基-6-脱氧-5-羟基四环素硫酸盐
- 30: 7-乙酰氨基-6-脱氧-5-羟基四环素-9-重氮硫酸盐
- 31: 7-二甲氨基-6-脱氧-5-羟基四环素-9-重氮硫酸盐
- 32: 7-环丁基氨基-6-脱氧-5-羟基四环素硫酸盐
- 33: 7-环丁基甲基氨基-6-脱氧-5-羟基四环素硫酸盐
- 25 34: 4-脱二甲氨基-6-脱氧-5-羟基四环素
- 35: 4-脱二甲氨基-6-脱氧-5-羟基-9-硝基四环素
- 36: 9-氨基-4-脱二甲氨基-6-脱氧-5-羟基四环素硫酸盐
- 37: 4-脱二甲氨基-6-脱氧-5-羟基四环素-9-重氮硫酸盐
- 38: 7-硝基-9-叔丁基-6-脱氧-5-羟基四环素硫酸盐
- 30 39: 9-叔丁基-6-脱氧-5-羟基四环素硫酸盐

- 40: 7-硝基-9-叔丁基-4-脱二甲氨基-6-脱氧-5-羟基四环素硫酸盐
- 41: 4-脱二甲氨基-7-二甲氨基-6-脱甲基-6-脱氧四环素硫酸盐
- 42: 7-乙酰氨基-9-叠氮-6-脱氧-5-羟基-四环素
- 43: 9-叔丁基-6-脱氧-5-羟基四环素-7-重氮硫酸盐
- 5 44: 7-氨基-9-叔丁基-6-脱氧-5-羟基四环素硫酸盐
- 45: 7-叠氮-9-叔丁基-6-脱氧-5-羟基四环素硫酸盐
- 46: 6-脱氧-5-羟基四环素-4-甲碘化物
- 47: 7-(1, 2-苄基羧基肼)-6-脱氧-5-羟基-四环素盐酸盐
- 48: 4-脱二甲氨基-7-氨基-6-脱氧-5-羟基1四环素硫酸盐
- 10 49: 7-氨基-9-叔丁基-4-脱二甲基-6-脱氧-5-羟基四环素硫酸盐
- 50: 4-脱二甲氨基-9-叔丁基-6-脱氧-5-羟基四环素-7-重氮硫酸盐
- 51: 9-(4-氟苯基)-6-脱氧-5-羟基四环素
- 52: 4-表-7-氯四环素盐酸盐
- 53: 6-脱甲基-6-脱氧四环素盐酸盐

15

虽然本发明记述了一些具体的例子,但显然对本领域的技术人员来说,其它一些形式以及对本发明的一些修改是很容易的。本发明所附的权利要求及说明书已经基本覆盖了所有这些显而易见的形式及改变,所有这些改变都不能脱离本发明真正的精神实质和范围。