

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-505588  
(P2005-505588A)

(43) 公表日 平成17年2月24日(2005.2.24)

(51) Int.Cl.<sup>7</sup>**A61K 31/65****A61P 31/04****A61P 35/00****C07C 235/84**

F 1

A 6 1 K 31/65

A 6 1 P 31/04

A 6 1 P 35/00

C 0 7 C 235/84

テーマコード(参考)

4 C 0 8 6

4 H 0 0 6

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 100 頁)

(21) 出願番号	特願2003-533853 (P2003-533853)	(71) 出願人	504135240 テトラジエネックス ファーマスティカルズ インク
(86) (22) 出願日	平成14年10月4日 (2002.10.4)	(72) 発明者	アメリカ合衆国 ニュージャージー州 O 7 6 5 6 パークリッジ メイナードドラ イブ 1
(85) 翻訳文提出日	平成16年4月5日 (2004.4.5)	(74) 代理人	100083138 弁理士 相田 伸二
(86) 國際出願番号	PCT/US2002/031730		ラヴカ ジョセフ アメリカ合衆国 ニューヨーク州 1 0 9 8 7 タキシードパーク タワーヒルロー ド
(87) 國際公開番号	W02003/030819		
(87) 國際公開日	平成15年4月17日 (2003.4.17)		
(31) 優先権主張番号	60/327,502		
(32) 優先日	平成13年10月5日 (2001.10.5)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】テトラサイクリン誘導体、及びそれを使用する方法

## (57) 【要約】

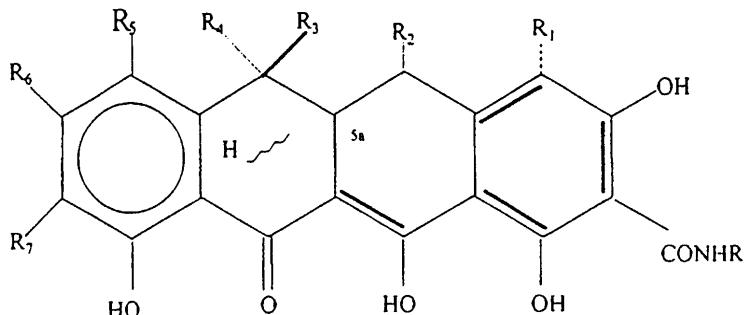
1 又はそれ以上のテトラサイクリン誘導体を効果的な量だけ治療を必要とする対象物に投与することからなる、微生物や腫瘍の成長を抑制するための治療方法が開示される。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

一般的な化学式、すなわち、

## 【化 1】

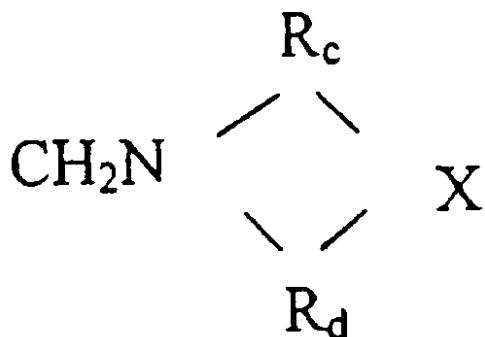


10

からなるテトラサイクリン合成物又はその塩を効果的な量だけ治療を必要とする対象物に投与することを含む、細菌や腫瘍の成長を抑制する治療方法。

R は、  $\text{CH}_2\text{N}(\text{R}_a\text{R}_b)$  か、

## 【化 2】



20

から選択される。

$\text{R}_a$   $\text{R}_b$  は  $\text{C}_1 \sim \text{C}_6$  のアルキル；

$\text{R}_c$  及び  $\text{R}_d$  は  $(\text{CH}_2)_n\text{CHR}_e$ 、  $n$  は 0 又は 1、  $\text{R}_e$  は、  $\text{H}$ 、  $\text{C}_1 \sim \text{C}_6$  のアルキル、 又は  $\text{NH}_2$ 、 そして  $\text{X}$  は、  $\text{NH}$ 、  $\text{S}$  又は  $\text{CH}_2$ ；

$\text{R}_1$  は  $\text{H}$  又は  $\text{OH}$ ；

$\text{R}_2$  は  $\text{H}$ 、  $\text{OH}$ 、  $=\text{O}$ 、 又は  $\text{OCOR}_8$ 、 ここで、  $\text{R}_8$  は  $\text{C}_1 \sim \text{C}_6$  のアルキル、

或いは、  $\text{R}_2$  は  $\text{N}(\text{R}_9)_2$ 、 ここで、  $\text{R}_9$  は水素、 又は  $\text{C}_1 \sim \text{C}_6$  の低級アルキル、 又は、

$\text{R}_2$  がケト (ketone) 又は  $\text{N}(\text{R}_9)_2$  のときに、  $\text{R}_3$  及び  $\text{R}_4$  は  $\text{H}$  又は  $\text{CH}_3$  であり、  $\text{R}_3$  及び  $\text{R}_4$  が両方  $\text{CH}_3$  又は  $\text{H}$  でないという条件付きで  $\text{R}_9\text{CO}$  である。

5a 水素は  $\text{H}$  である。

$\text{R}_3$  及び  $\text{R}_4$  は  $\text{H}$ 、  $\text{CH}_3$  又は  $\text{F}$  であり、  $\text{R}_3$  が  $\text{CH}_3$  のとき  $\text{R}_4$  は  $\text{H}$  又は  $\text{F}$  であり、  $\text{R}_4$  が  $\text{CH}_3$  のとき  $\text{R}_3$  は  $\text{H}$  又は  $\text{F}$  であり、  $\text{R}_4$  及び  $\text{R}_5$  の両方が  $\text{F}$  でないという条件が付く。

$\text{R}_5$  及び  $\text{R}_7$  はハロゲン、  $\text{H}$ 、  $\text{NO}_2$ 、  $\text{N}_3$ 、  $\text{N}_2^+$ 、  $\text{C}_2\text{H}_5\text{OC}(\text{S})\text{S}^-$ 、  $\text{CN}$ 、  $\text{NR}_{10}\text{R}_{11}$  である。ここで、  $\text{R}_{10}$  及び  $\text{R}_{11}$  は  $\text{H}$ 、  $\text{C}_1 \sim \text{C}_{10}$  のアルキル、 及び  $\text{R}_{12}(\text{CH}_2)_n\text{CO}^-$  である。ここで、  $n$  は 0 ~ 5 であり、  $\text{R}_9$  は  $\text{H}$ 、  $\text{NH}_2$ 、 直鎖、 分枝、 又は環化された  $\text{C}_1 \sim \text{C}_{10}$  のアルキル基から選ばれたモノ又は二置換のアミノ。  $\text{R}_{10}$  及び  $\text{R}_{11}$  の両方が  $\text{R}_{12}(\text{CH}_2)_n\text{CO}^-$  でないという条件付きで。

$\text{R}_7$  は第3ブチル (tertiary butyl) でもよく、  $\text{R}_6$  はハロゲン、 アセチレン、  $\text{R}_{13}-\text{C}_6\text{H}_5$  である。ここで、  $\text{R}_{13}$  は  $\text{NO}_2$ 、 ハロゲン、 アセチルアミノ、 アミノ、 フェニル、 アルキル又はアルコキシである。

30

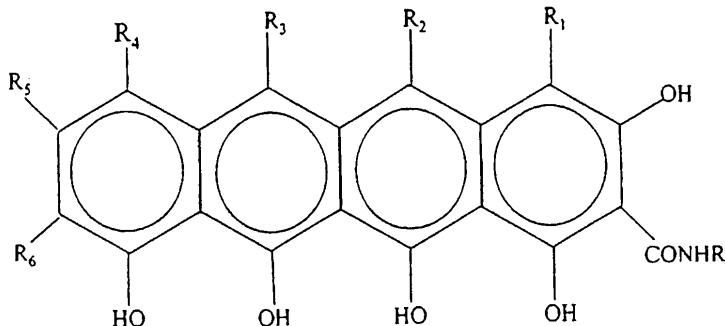
40

50

## 【請求項 2】

一般的な化学式、すなわち、

## 【化 3】

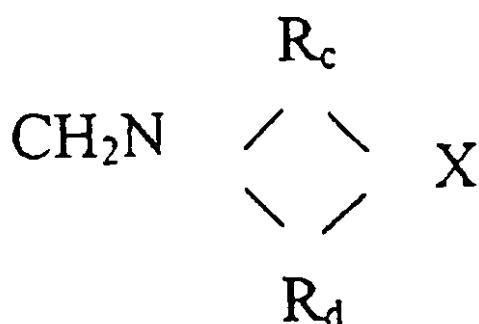


10

からなるテトラサイクリン合成物又はその塩を効果的な量だけ治療を必要とする対象物に投与することを含む、細菌や腫瘍の成長を抑制する治療方法。

R は、  $\text{CH}_2\text{N}(\text{R}_a\text{R}_b)$  か、

## 【化 4】



20

から選択される。

$\text{R}_a$   $\text{R}_b$  は  $\text{C}_1 \sim \text{C}_6$  のアルキル；

$\text{R}_c$  及び  $\text{R}_d$  は  $(\text{CH}_2)_n\text{CHR}_e$ 、 $n$  は 0 又は 1、 $\text{R}_e$  は、H、 $\text{C}_1 \sim \text{C}_6$  のアルキル、又は  $\text{NH}_2$ 、そして X は、 $\text{NH}$ 、 $\text{S}$  又は  $\text{CH}_2$

$\text{R}_1$  は H 又は  $\text{OH}$ ；

$\text{R}_2$  は H 又は  $\text{OH}$ ；

$\text{R}_3$  は H 又は  $\text{CH}_3$ ；

$\text{R}_4$  及び  $\text{R}_6$  はハロゲン、H、 $\text{NO}_2$ 、 $\text{N}_3$ 、 $\text{N}_2^+$ 、 $\text{C}_2\text{H}_5\text{OC(S)S-}$ 、 $\text{CN}$ 、 $\text{NR}_7\text{R}_8$  である。ここで、 $\text{R}_7$  及び  $\text{R}_8$  は H、 $\text{C}_1 \sim \text{C}_{10}$  のアルキル、及び  $\text{R}_9(\text{CH}_2)_n\text{CO-}$  である。ここで、n は 0 ~ 5 であり、 $\text{R}_9$  は H、 $\text{NH}_2$ 、直鎖、分枝、又は環化された  $\text{C}_1 \sim \text{C}_{10}$  のアルキル基から選ばれたモノ又は二置換のアミノ。 $\text{R}_7$  及び  $\text{R}_8$  の両方が  $\text{R}_9(\text{CH}_2)_n\text{CO-}$  でないという条件付きで。

$\text{R}_6$  は H、ハロゲン、アセチレン、 $\text{R}_{10}-\text{C}_6\text{H}_5$  である。ここで、 $\text{R}_{10}$  は  $\text{NO}_2$ 、ハロゲン、アセチルアミノ、アミノ、フェニル、アルキル又はアルコキシである。

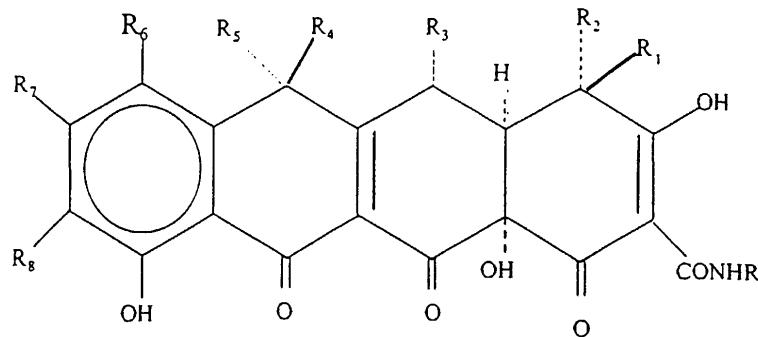
## 【請求項 3】

30

一般的な化学式、すなわち、

40

## 【化5】

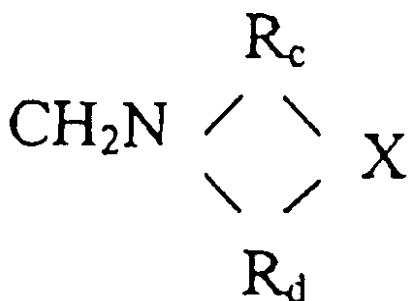


10

からなるテトラサイクリン合成物又はその塩を効果的な量だけ治療を必要とする対象物に投与することを含む、細菌や腫瘍の成長を抑制する治療方法。

R は、  $\text{CH}_2\text{N}(\text{R}_a\text{R}_b)$  か、

## 【化6】



20

から選択される。

$\text{R}_a$   $\text{R}_b$  は  $\text{C}_1 \sim \text{C}_6$  のアルキル；

$\text{R}_c$  及び  $\text{R}_d$  は  $(\text{CH}_2)_n\text{CHR}_e$ 、  $n$  は 0 又は 1、  $\text{R}_e$  は、 H、  $\text{C}_1 \sim \text{C}_6$  のアルキル、 又は  $\text{NH}_2$ 、 そして X は、 NH、 S 又は  $\text{CH}_2$

$\text{R}_1$  及び  $\text{R}_2$  は H 又は  $\text{N}(\text{R}_9)_2$  である。ここで、  $\text{R}_1$  及び  $\text{R}_2$  の両方が  $\text{N}(\text{R}_9)_2$  でないという条件付きで、  $\text{R}_9$  は H、 又は  $\text{C}_1 \sim \text{C}_6$  のアルキルである。  $\text{R}_1$  及び  $\text{R}_2$  は  $\text{N}(\text{R}_{10})_3\text{I}$  でも良い。また、  $\text{R}_1$  及び  $\text{R}_2$  が共に  $\text{N}(\text{R}_{10})_3\text{I}$  でないという条件付きで  $\text{R}_{10}$  が  $\text{C}_1 \sim \text{C}_6$  のアルキルである。

$\text{R}_3$  は H である；

$\text{R}_4$  及び  $\text{R}_5$  は H、  $\text{CH}_3$  又は F であり、  $\text{R}_4$  が  $\text{CH}_3$  のとき  $\text{R}_5$  は H 又は F であり、  $\text{R}_5$  が  $\text{CH}_3$  のとき  $\text{R}_4$  は H 又は F であり、  $\text{R}_4$  及び  $\text{R}_5$  の両方が F でないという条件が付く。

$\text{R}_6$  及び  $\text{R}_8$  はハロゲン、 H、  $\text{NO}_2$ 、  $\text{N}_3$ 、  $\text{N}_2^+$ 、  $\text{C}_2\text{H}_5\text{OC}(\text{S})\text{S}^-$ 、  $\text{CN}$ 、  $\text{NR}_{11}\text{R}_{12}$  である。ここで、  $\text{R}_{11}$  及び  $\text{R}_{12}$  は H、  $\text{C}_1 \sim \text{C}_{10}$  のアルキル、 及び  $(\text{CH}_2)_n\text{CO}^-$  である。ここで、  $n$  は 0 ~ 5 であり、  $\text{R}_{13}$  は H、  $\text{NH}_2$ 、 直鎖、 分枝、 又は環化された  $\text{C}_1 \sim \text{C}_{10}$  のアルキル基から選ばれたモノ又は二置換のアミノ。  $\text{R}_{10}$  及び  $\text{R}_{11}$  の両方が  $(\text{CH}_2)_n\text{CO}^-$  でないという条件付きで。

$\text{R}_8$  は第3ブチル (tertiary butyl) でも良く、  $\text{R}_7$  は水素かハロゲンである。

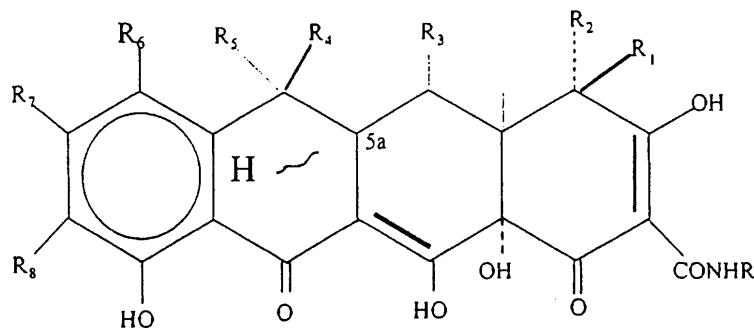
30

40

## 【請求項 4】

一般的な化学式、 すなわち、

## 【化7】

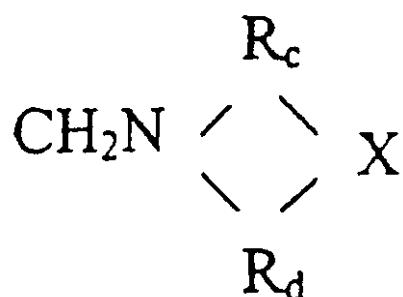


10

からなるテトラサイクリン合成物又はその塩を効果的な量だけ治療を必要とする対象物に投与することを含む、細菌や腫瘍の成長を抑制する治療方法。

R は、  $\text{CH}_2\text{N}(\text{R}_a\text{R}_b)$  か、

## 【化8】



20

から選択される。

$\text{R}_a$   $\text{R}_b$  は  $\text{C}_1 \sim \text{C}_6$  ;

$\text{R}_c$  及び  $\text{R}_d$  は  $(\text{CH}_2)_n\text{CHR}_e$  、  $n$  は 0 又は 1、  $\text{R}_e$  は、 H、  $\text{C}_1 \sim \text{C}_6$  のアルキル、 又は  $\text{NH}_2$ 、 そして X は、 NH、 S 又は  $\text{CH}_2$

$\text{R}_1$  及び  $\text{R}_2$  は H 又は  $\text{N}(\text{R}_9)_2$  である。ここで、  $\text{R}_9$  は水素、 又は  $\text{C}_1 \sim \text{C}_6$  の低級アルキルであり、  $\text{R}_1$  及び  $\text{R}_2$  の両方を  $\text{N}(\text{R}_9)_2$  にできないという条件が付く。

30

$\text{R}_3$  は H、 OH、 =O、 又は  $\text{OCOR}_{10}$  、 ここで、  $\text{R}_{10}$  は  $\text{C}_1 \sim \text{C}_6$  、

或いは、  $\text{R}_3$  は  $\text{N}(\text{R}_9)_2$  、 ここで、  $\text{R}_9$  は水素、 又は  $\text{C}_1 \sim \text{C}_6$  、

$\text{R}_2$  が =O 又は  $\text{N}(\text{R}_9)_2$  のとき、  $\text{R}_4$  及び  $\text{R}_5$  は H 又は  $\text{CH}_3$  であり、  $\text{R}_4$  及び  $\text{R}_5$  が共に  $\text{CH}_3$  又は H でないという条件が付く。

5a 水素は 又は である。

$\text{R}_4$  及び  $\text{R}_5$  は H、  $\text{CH}_3$  又は F であり、  $\text{R}_4$  が  $\text{CH}_3$  のとき  $\text{R}_5$  は H 又は F であり、  $\text{R}_5$  が  $\text{CH}_3$  のとき  $\text{R}_4$  は H 又は F であり、  $\text{R}_4$  及び  $\text{R}_5$  の両方が F でないという条件が付く。

$\text{R}_6$  及び  $\text{R}_8$  はハロゲン、 H、  $\text{NO}_2$ 、  $\text{N}_3$ 、  $\text{N}_2^+$ 、  $\text{C}_2\text{H}_5\text{OC}(\text{S})\text{S}$ 、  $\text{CN}$ 、  $\text{NR}_{10}\text{R}_{11}$  である。ここで、  $\text{R}_{10}$  及び  $\text{R}_{11}$  は H、  $\text{C}_1 \sim \text{C}_{10}$  のアルキル、 及び  $\text{R}_{12}(\text{CH}_2)_n\text{CO}$  である。ここで、  $n$  は 0 ~ 5 であり、  $\text{R}_{12}$  は H、  $\text{NH}_2$ 、 直鎖、 分枝、 又は環化された  $\text{C}_1 \sim \text{C}_{10}$  の基から選ばれたモノ又は二置換のアミノ。  $\text{R}_{10}$  及び  $\text{R}_{11}$  の両方が  $\text{R}_{12}(\text{CH}_2)_n\text{CO}$  でなく、 又は  $\text{R}_8$  が第3ブチル (tertiary butyl) であるという条件付きで。

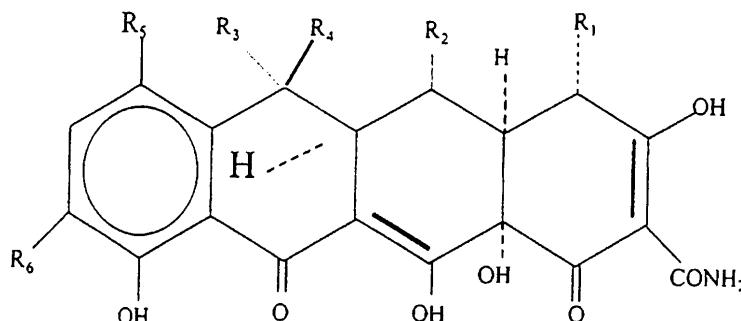
40

$\text{R}_7$  は H、 ハロゲン、 アセチレン、  $\text{R}_{12}-\text{C}_6\text{H}_5$  である。ここで、  $\text{R}_{12}$  は  $\text{NO}_2$ 、 ハロゲン、 アセチルアミノ、 アミノ、 フェニル、 アルキル又はアルコキシである。

## 【請求項5】

一般的な化学式、 すなわち、

## 【化9】



10

からなるテトラサイクリン合成物又はその塩を効果的な量だけ治療を必要とする対象物に投与することを含む、細菌や腫瘍の成長を抑制する治療方法。

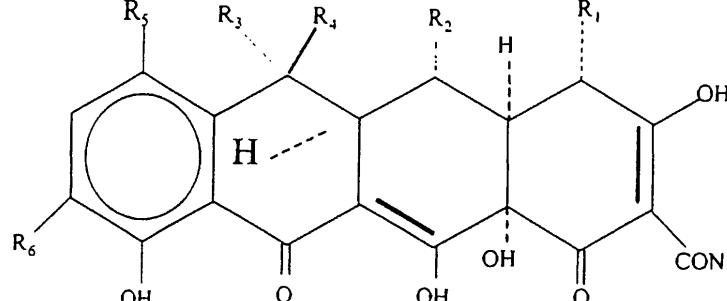
ここで、R<sub>1</sub>はH又はN(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>；R<sub>2</sub>はH、CH<sub>3</sub>、又はOCOCH<sub>3</sub>；R<sub>3</sub>はH又はCH<sub>3</sub>；R<sub>4</sub>はH；R<sub>5</sub>はH、N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>、NH<sub>2</sub>、N(C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>)<sub>2</sub>、N(C<sub>6</sub>H<sub>13</sub>)<sub>2</sub>、N(3,3-dimethylbutyl)<sub>2</sub>、N<sub>3</sub>、N<sub>2</sub><sup>+</sup>、NO<sub>2</sub>、NHCOCH<sub>3</sub>、NH(n-propyl)<sub>2</sub>、NH-isobutyl、NH-isobutylmethyl、NH(cyclobutyl)、NH(cyclobutylmethyl)；そして、R<sub>6</sub>はH、NO<sub>2</sub>、NH<sub>2</sub>、(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CHNH、N<sub>3</sub>、NHCOCH<sub>3</sub>、N<sub>2</sub><sup>+</sup>、N<sub>3</sub>、又は(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>Cである。

20

## 【請求項6】

一般的な化学式、すなわち、

## 【化10】



30

からなるテトラサイクリン合成物又はその塩を効果的な量だけ治療を必要とする対象物に投与することを含む、細菌や腫瘍の成長を抑制する治療方法。

ここで、R<sub>1</sub>はH又はN(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>；R<sub>2</sub>はH、OH、又はOCOCH<sub>3</sub>；R<sub>3</sub>はH又はCH<sub>3</sub>；R<sub>4</sub>はH；R<sub>5</sub>はH、N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>、N(C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>)<sub>2</sub>、N(C<sub>6</sub>H<sub>13</sub>)<sub>2</sub>、N(3,3-dimethylbutyl)<sub>2</sub>；N<sub>3</sub>、N<sub>2</sub><sup>+</sup>、NO<sub>2</sub>、NHCOCH<sub>3</sub>、NH(n-propyl)<sub>2</sub>、NH-isobutyl、NH-isobutylmethyl、N(CH<sub>3</sub>CO)(isobutyl)、NH(cyclobutyl)、NH(cyclobutylmethyl)，又はNH<sub>2</sub>；そして、R<sub>6</sub>はH、NO<sub>2</sub>、NH<sub>2</sub>、(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CHNH、N<sub>3</sub>、NHCOCH<sub>3</sub>、N<sub>2</sub><sup>+</sup>、N<sub>3</sub>、又は(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>Cである。

40

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、新規なテトラサイクリン誘導体、該新規な誘導体の製造方法、及び該誘導体の使用方法に関する。

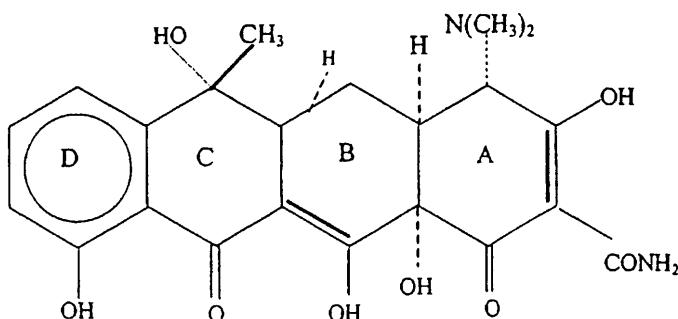
## 【背景技術】

## 【0002】

テトラサイクリンは次のような一般的な構造を示す。

## 【化11】

50

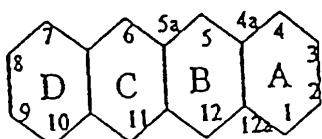


【0003】

10

円環の番号付けは次の通りである。

【化12】



【0004】

20

テトラサイクリンは、5-OH（テラマイシン）や7-Cl（オーレオマイシン）誘導体と同様に自然界に存在し、良く知られた抗生物質である。天然のテトラサイクリンは、抗生物質としての特質を失わずに改良されるかも知れない。基本的なテトラサイクリン・ストラクチャを構成するかもしないかも知れない変形は、Mitscherにより、The Chemistry of Tetracyclines, 6章、Marcel Dekker, Publishers、ニューヨーク（1978）にて研究してきた。Mitscherによれば、テトラサイクリンの円環の5-9の位置で置換基は、抗生物質としての特質を失わずに改良されるかも知れない。しかしながら、基本的な円環に対する変更や、1-4や10-12の位置での置換基の入れ換えは、一般的には、抗菌力が全く無いか、実質的にほとんど無い合成のテトラサイクリンをもたらすこととなる。化学的に改質された非抗菌性（non-antimicrobial）のテトラサイクリン（CMTの後）の幾つかの例は、4-dedimethylaminotetracycline、4-dedimethyl-aminosancycline（6-demethyl-6-deoxy-4-dedimethylaminotetracycline）、4-dedimethylaminominocycline（7-dimethylamino-4-dedimethylaminotetracycline）、そして、4-dedimethylaminodoxycycline（5-hydroxy-6-deoxy-4-dedimethylaminotetracycline）である。

30

【0005】

40

幾つかの4-dedimethylaminotetracyclineの誘導体は、米国特許第3,029,284号明細書や第5,122,519号明細書に開示されている。それらは、D環のC7やC9の位置に、水素を伴う6-demethyl-6-deoxy-4-dedimethylaminotetracycline及び5-hydroxy-6-deoxy-4-dedimethylaminotetracyclineや、他の置換基を含んでいる。これらの置換基は、アミノや、ニトロや、ジ（低級アルキル）アミノや、モノ（低級アルキル）アミノ、又はハロゲンを含む。6-demethyl-6-deoxy-4-dedimethylaminotetracycline誘導体や5-hydroxy-6-deoxy-4-dedimethylaminotetracycline誘導体は、抗菌剤として役に立つと言われている。

【0006】

50

A環のC4位置にオキシム基を伴う、他の4-dedimethylaminotetraacyclineの誘導体は、米国特許第3,622,627号明細書や第3,824,285号明細書に開示されている。これらのオキシム誘導体は、C7位置に置換基としての水素やハロゲンを有し、7-halo-6-demethyl-6-deoxy-4-dedimethylamino-4-oximinotetraacyclineや、7-halo-5-hydroxy-6-deoxy-4-dedimethylamino-4-oximinotetraacyclineを含んでいる。

## 【0007】

アルキルアミノ基(NH-alkyl)やアルキルヒドrazin基(N-NH-alkyl)は、4-dedimethylaminotetraacyclineのC4位置でA環に置換される。これらの化合物はその抗菌特性で知られている。米国特許第3,345,370号、第3,609,188号、第3,622,627号、第3,502,660号、第3,509,184号、第3,502,696号、第3,515,731号、第3,265,732号、第5,122,519号、第3,849,493号、第3,772,363号、第3,829,453号を参照のこと。

## 【0008】

テトラサイクリンは、その抗菌の特質に加え、多くの他の用途を持っていると述べられてきている。例えば、テトラサイクリンは、コラゲナーゼ(MMP-1)やゼラチナーゼ(MMP-2)やストロムライシン(MMP-3)を含むマトリックス・メタロプロテアーゼ(MMP)のように、酵素を分解するコラーゲンの活動を抑制することが知られている。ゴルブ(Golub)ら、J. Periodont. Res. 20:12-23(1985);ゴルブ(Golub)ら、Crit. Revs. Oral Biol. Med. 2:297-322(1991);米国特許第4,666,897号、第4,704,383号、第4,935,411号、第4,935,412号。また、テトラサイクリンは、哺乳類骨格筋における消耗(wasting)や蛋白質分解を抑制すること(米国特許第5,045,538号)や、哺乳類細胞におけるIL-10の産生を増進することが知られてきている。

## 【0009】

さらに、テトラサイクリンが骨の蛋白質合成を高めることはU.S.Pat.No. Re.34,656に報告されており、器官培養における骨吸収を減少させることは米国特許第4,704,383号にて報告されている。

## 【0010】

同様に、米国特許第5,532,227号は、ゴルブ(Golub)らに、テトラサイクリンは、蛋白質の過度のグリコシル化を軽減できることを開示している。特に、テトラサイクリンは、糖尿病での、コラーゲンのグリコシル化に起因するところの、過度のコラーゲンの架橋を抑制する。

## 【0011】

テトラサイクリンは、米国特許第5,532,227号に開示されているように、乾癬のように、炎症状態に関わる、過度のホスホリパーゼA2活性を抑制することが知られている。加えて、テトラサイクリンが、シクロオキシゲナーゼ-(COX-2)や、腫瘍怪死因子(TNF)や、一酸化窒素や、IL-1(インターロイキン-1)を抑制することが知られている。

## 【0012】

これらの特質は、テトラサイクリンが多くの病気を治療するのに役立つように仕向けている。例えば、非抗菌性(non-antimicrobial)テトラサイクリンを含むテトラサイクリンが関節炎の治療に効果があるという提唱が数多くなされてきている。例えば、グリーンワルド(Greenwald)ら、“アジュバント関節炎やFluoribiprofeneにおける、テトラサイクリンの金属プロテアーゼの阻害活性、骨損傷の軽減”、Journal of Rheumatology 19:927-938(1992);

10

20

30

40

50

グリーンワルド (Greenwald) ら、"MMP 抑制剤での破壊的関節炎の治療 ; マトリックス・メタロプロテーゼの抑制におけるテトラサイクリンの潜在的役割 : 治療の可能性" ニューヨーク科学アカデミー年報、732 : 181 - 198 (1994) ; クロッペンバーグ (Kloppenburg) ら、"慢性関節リウマチにおけるミノサイクリン"、Arthritis Rheum 37 : 629 - 636 (1994) ; ライアンら、"変形性関節炎における軟骨破壊を改善するためのテトラサイクリンの可能性" Current Opinion in Rheumatology 8 : 238 - 247 (1996) ; O'Dell ら、"ミノサイクリンやプラセボによる早期関節リウマチの治療"、Arthritis Rheum 40 : 842 - 848 (1997)

## 【0013】

10

テトラサイクリンは、皮膚病の治療への使用が提案されてきた。例えば、ホワイトら、Lancet, Apr. 29, p. 966 (1989) は、テトラサイクリン ミノサイクリンがジストロフィー型表皮水疱症 (コラゲナーゼに関係があると信じられている、生命にかかわる皮膚の状態) の治療に効果があることを報告している。

## 【0014】

さらに、テトラサイクリン及び金属プロテアーゼ・インヒビターが腫瘍の進行を抑制することや、抗炎症特性を持つことは、研究により示唆されてきている。

デクラーク (Declercq) ら、ニューヨーク科学アカデミー年報 (Annals of the New York Academy of Sciences)、732 : 222 - 232 (1994) 、骨吸収リフキン (Rifkin) ら、ニューヨーク科学アカデミー年報 (Annals of the New York Academy of Sciences)、732 : 165 - 180 (1994) 、血管新生

20

マラゴウダキス (Maragoudakis) ら、Br. J. Pharmacol. 111 : 894 - 902 (1994)

Ramamurthy ら、Annals N. Y. Acad. Sci., 732, 427 - 430 (1994)

## 【発明の開示】

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【0015】

前述に基づき、テトラサイクリンが数多くの病気に効果があることは見出されてきている。それ故、新しく、より役に立つ誘導体が必要とされている。

## 【発明を実施するための最良の形態】

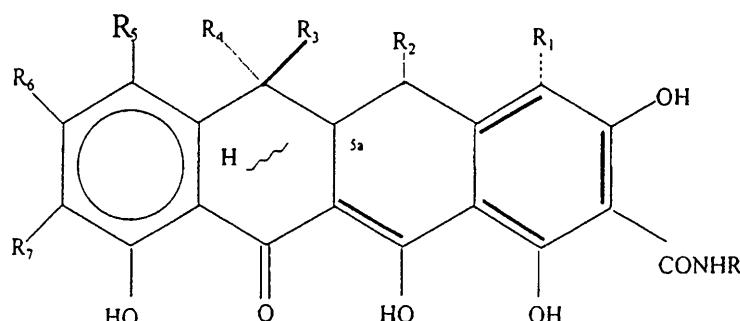
## 【0016】

ここで開示される化合物は、抗細菌、及び / 又は抗癌の活性を示すテトラサイクリンの誘導体である。

## 【0017】

好ましい実施形態では、本発明は、細菌や腫瘍の成長を抑制する治療方法、つまり、一般的な化学式、すなわち、

## 【化13】

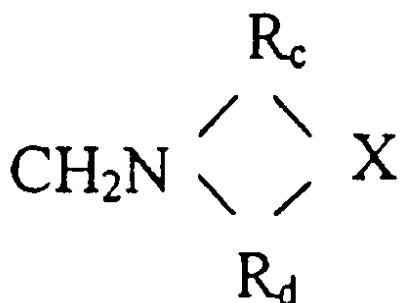


40

からなるテトラサイクリン合成物又はその塩を効果的な量だけ、治療を必要とされる対象物に投与することからなる治療方法に関する。

50

R は、  $\text{CH}_2\text{N}(\text{R}_a\text{R}_b)$  か、  
【化 14】



10

から選択される。

$\text{R}_a$   $\text{R}_b$  は  $\text{C}_1 \sim \text{C}_6$  のアルキル；

$\text{R}_c$  及び  $\text{R}_d$  は  $(\text{CH}_2)_n\text{CHR}_e$ 、 $n$  は 0 又は 1、 $\text{R}_e$  は、  $\text{H}$ 、 $\text{C}_1 \sim \text{C}_6$  のアルキル、又は  $\text{NH}_2$ 、そして  $\text{X}$  は、  $\text{NH}$ 、 $\text{S}$  又は  $\text{CH}_2$ ；

$\text{R}_1$  は  $\text{H}$  又は  $\text{OH}$ ；

$\text{R}_2$  は  $\text{H}$ 、 $\text{OH}$ 、 $=\text{O}$ 、又は  $\text{OCOR}_8$ 、ここで、 $\text{R}_8$  は  $\text{C}_1 \sim \text{C}_6$  のアルキル、

或いは、 $\text{R}_2$  は  $\text{N}(\text{R}_9)_2$ 、ここで、 $\text{R}_9$  は水素、又は  $\text{C}_1 \sim \text{C}_6$  の低級アルキル、又は、

$\text{R}_2$  がケト (keto) 又は  $\text{N}(\text{R}_9)_2$  のときに、 $\text{R}_3$  及び  $\text{R}_4$  は  $\text{H}$  又は  $\text{CH}_3$  であり 20  
、 $\text{R}_3$  及び  $\text{R}_4$  が共に  $\text{CH}_3$  又は  $\text{H}$  でないという条件付きで  $\text{R}_9\text{CO}$  である。

5 a 水素は か である。

$\text{R}_3$  及び  $\text{R}_4$  は  $\text{H}$ 、 $\text{CH}_3$  又は  $\text{F}$  である。ただし、 $\text{R}_3$  が  $\text{CH}_3$  のとき  $\text{R}_4$  は  $\text{H}$  又は  $\text{F}$  で  
あり、 $\text{R}_4$  が  $\text{CH}_3$  のとき  $\text{R}_3$  は  $\text{H}$  又は  $\text{F}$  であり、 $\text{R}_4$  及び  $\text{R}_5$  の両方が  $\text{F}$  でないという  
条件が付く。

$\text{R}_5$  及び  $\text{R}_7$  はハロゲン、 $\text{H}$ 、 $\text{NO}_2$ 、 $\text{N}_3$ 、 $\text{N}_2^+$ 、 $\text{C}_2\text{H}_5\text{OC}(\text{S})\text{S}$ 、 $\text{CN}$ 、  
 $\text{NR}_{10}\text{R}_{11}$  である。ここで、 $\text{R}_{10}$  及び  $\text{R}_{11}$  は  $\text{H}$ 、 $\text{C}_1 \sim \text{C}_{10}$  のアルキル、及び  
 $\text{R}_{12}(\text{CH}_2)_n\text{CO}$  である。ここで、 $n$  は 0 ~ 5 であり、 $\text{R}_9$  は  $\text{H}$ 、 $\text{NH}_2$ 、直鎖  
、分枝、又は環化された  $\text{C}_1 \sim \text{C}_{10}$  のアルキル基から選ばれたモノ又は二置換のアミノ  
。 $\text{R}_{10}$  及び  $\text{R}_{11}$  の両方が  $\text{R}_{12}(\text{CH}_2)_n\text{CO}$  でないという条件付きで。 30

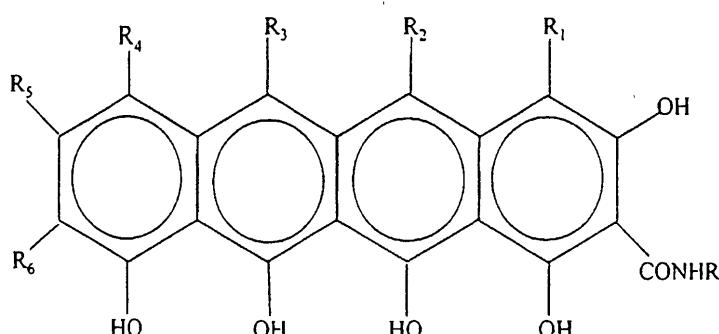
$\text{R}_7$  は第3ブチル (tertiary butyl) とすることもできる。 $\text{R}_6$  はハロゲン、アセチレン、 $\text{R}_{13}-\text{C}_6\text{H}_5$  である。ここで、 $\text{R}_{13}$  は  $\text{NO}_2$ 、ハロゲン、アセチ  
ルアミノ、アミノ、フェニル、アルキル又はアルコキシである。

【0018】

より好ましい実施形態において、本発明は、細菌や腫瘍の成長を抑制する治療方法、つまり、

一般的な化学式、すなわち、

【化 15】



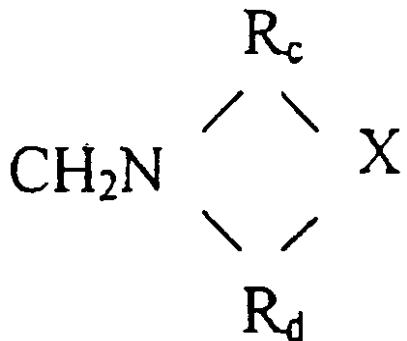
40

からなるテトラサイクリン合成物又はその塩を効果的な量だけ、治療を必要とされる対象  
物に投与することからなる治療方法に関する。

50

R は、  $\text{CH}_2\text{N}$  (  $\text{R}_a$   $\text{R}_b$  ) か、

【化 1 6】



10

から選択される。

$\text{R}_a$   $\text{R}_b$  は  $\text{C}_1 \sim \text{C}_6$  のアルキル；

$\text{R}_c$  及び  $\text{R}_d$  は  $(\text{CH}_2)_n\text{CHR}_e$ 、  $n$  は 0 又は 1、  $\text{R}_e$  は、 H、  $\text{C}_1 \sim \text{C}_6$  のアルキル、 又は  $\text{NH}_2$ 、 そして X は、  $\text{NH}$ 、 S 又は  $\text{CH}_2$

$\text{R}_1$  は H 又は  $\text{OH}$ ；

$\text{R}_2$  は H 又は  $\text{OH}$ ；

$\text{R}_3$  は H 又は  $\text{CH}_3$ ；

$\text{R}_4$  及び  $\text{R}_6$  はハロゲン、 H、  $\text{NO}_2$ 、  $\text{N}_3$ 、  $\text{N}_2^+$ 、  $\text{C}_2\text{H}_5\text{OC(S)S-}$ 、  $\text{CN}$ 、  $\text{NR}_7\text{R}_8$  である。ここで、  $\text{R}_7$  及び  $\text{R}_8$  は H、  $\text{C}_1 \sim \text{C}_{10}$  のアルキル、 及び  $\text{R}_9$  ( $\text{CH}_2)_n\text{CO-}$  である。ここで、  $n$  は 0 ~ 5 であり、  $\text{R}_9$  は H、  $\text{NH}_2$ 、 直鎖、 分枝、 又は環化された  $\text{C}_1 \sim \text{C}_{10}$  のアルキル基から選ばれたモノ又は二置換のアミノ。  $\text{R}_7$  及び  $\text{R}_8$  の両方が  $\text{R}_9$  ( $\text{CH}_2)_n\text{CO-}$  でないという条件付きで。

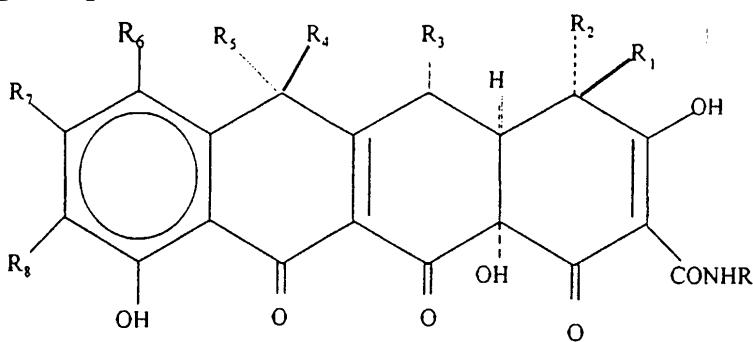
$\text{R}_6$  は H、 ハロゲン、 アセチレン、  $\text{R}_{10}-\text{C}_6\text{H}_5$  である。ここで、  $\text{R}_{10}$  は  $\text{NO}_2$ 、 ハロゲン、 アセチルアミノ、 アミノ、 フェニル、 アルキル又はアルコキシである。

【0019】

より好ましい実施形態において、本発明は、細菌や腫瘍の成長を抑制する治療方法、つまり、

一般的な化学式、すなわち、

【化 1 7】



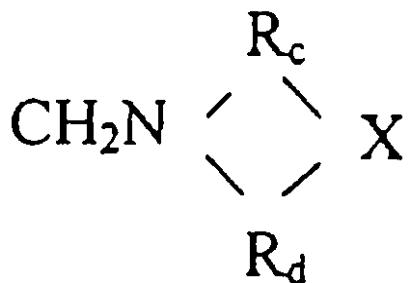
30

40

からなるテトラサイクリン合成物又はその塩を効果的な量だけ、治療を必要とされる対象物に投与することからなる治療方法に関する。

R は、  $\text{CH}_2\text{N}$  (  $\text{R}_a$   $\text{R}_b$  ) か、

【化 1 8】



10

から選択される。

$R_a$   $R_b$  は  $C_1 \sim C_6$  のアルキル；

$R_c$  及び  $R_d$  は  $(CH_2)_n CH R_e$ 、 $n$  は 0 又は 1、 $R_e$  は、H、 $C_1 \sim C_6$  のアルキル、又は  $NH_2$ 、そして  $X$  は、 $NH$ 、S 又は  $CH_2$

$R_1$  及び  $R_2$  は H 又は  $N(R_9)_2$  である。ここで、 $R_1$  及び  $R_2$  の両方が  $N(R_9)_2$  でないという条件付きで、 $R_9$  は H、又は  $C_1 \sim C_6$  のアルキルである。 $R_1$  及び  $R_2$  は  $N(R_{10})_3$  I でも良い。また、 $R_1$  及び  $R_2$  が共に  $N(R_{10})_3$  I でないという条件付きで  $R_{10}$  が  $C_1 \sim C_6$  のアルキルである。

$R_3$  は H である；

$R_4$  及び  $R_5$  は H、 $CH_3$  又は F であり、 $R_4$  が  $CH_3$  のとき  $R_5$  は H 又は F であり、 $R_5$  が  $CH_3$  のとき  $R_4$  は H 又は F であり、 $R_4$  及び  $R_5$  の両方が F でないという条件が付く。

$R_6$  及び  $R_8$  はハロゲン、H、 $NO_2$ 、 $N_3$ 、 $N_2^+$ 、 $C_2H_5OC(S)S^-$ 、 $CN$ 、 $NR_{11}R_{12}$  である。ここで、 $R_{11}$  及び  $R_{12}$  は H、 $C_1 \sim C_{10}$  のアルキル、及び  $R_{13}(CH_2)_nCO^-$  である。ここで、 $n$  は 0 ~ 5 であり、 $R_{13}$  は H、 $NH_2$ 、直鎖、分枝、又は環化された  $C_1 \sim C_{10}$  のアルキル基から選ばれたモノ又は二置換のアミノ。 $R_{10}$  及び  $R_{11}$  の両方が  $R_{12}(CH_2)_nCO^-$  でないという条件付きで。

$R_8$  は第 3 ブチル (tertiary butyl) でも良く、 $R_7$  は水素かハロゲンである。

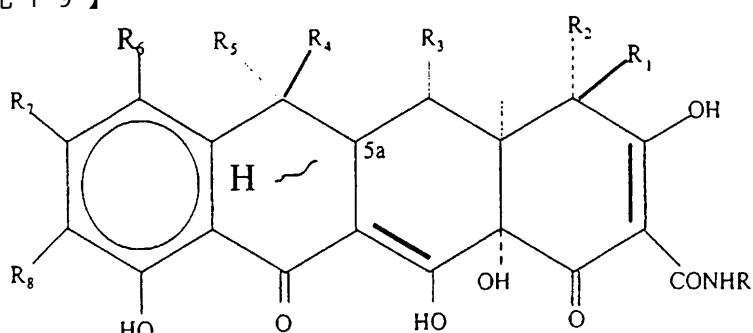
### 【0020】

30

より好ましい実施形態において、本発明は、細菌や腫瘍の成長を抑制する治療方法、つまり、

一般的な化学式、すなわち、

### 【化19】

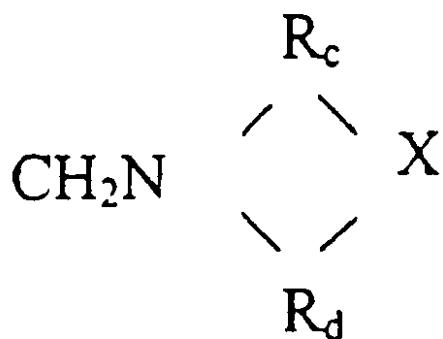


40

からなるテトラサイクリン合成物又はその塩を効果的な量だけ、治療を必要とされる対象物に投与することからなる治療方法に関する。

R は、 $CH_2N(R_aR_b)$  か、

### 【化20】



10

から選択される。

$R_a$   $R_b$  は  $C_1 \sim C_6$  ;

$R_c$  及び  $R_d$  は  $(CH_2)_n CH R_e$  、  $n$  は 0 又は 1 、  $R_e$  は、  $H$  、  $C_1 \sim C_6$  のアルキル、 又は  $NH_2$  、 そして  $X$  は、  $NH$  、  $S$  又は  $CH_2$

$R_1$  及び  $R_2$  は  $H$  又は  $N(R_9)_2$  である。ここで、  $R_9$  は水素、 又は  $C_1 \sim C_6$  の低級アルキルであり、  $R_1$  及び  $R_2$  の両方を  $N(R_9)_2$  にできないという条件が付く。

$R_3$  は  $H$  、  $OH$  、  $=O$  、 又は  $OCOR_{10}$  、 ここで、  $R_{10}$  は  $C_1 \sim C_6$  のアルキル、 或いは、  $R_3$  は  $N(R_9)_2$  、 ここで、  $R_9$  は水素、 又は  $C_1 \sim C_6$  、

$R_23$  が  $=O$  又は  $N(R_9)_2$  のとき、  $R_4$  及び  $R_5$  は  $H$  又は  $CH_3$  であり、  $R_4$  及び  $R_5$  が両方  $CH_3$  又は  $H$  でないという条件が付く。

20

$R_5$  水素は 又は である。

$R_4$  及び  $R_5$  は  $H$  、  $CH_3$  又は  $F$  である。この時、  $R_4$  が  $CH_3$  のとき  $R_5$  は  $H$  又は  $F$  であり、  $R_5$  が  $CH_3$  のとき  $R_4$  は  $H$  又は  $F$  であり、  $R_4$  及び  $R_5$  の両方が  $F$  でないという条件が付く。

$R_6$  及び  $R_8$  はハロゲン、  $H$  、  $NO_2$  、  $N_3$  、  $N_2^+$  、  $C_2H_5OC(S)S^-$  、  $CN$  、  $NR_{10}R_{11}$  である。ここで、  $R_{10}$  及び  $R_{11}$  は  $H$  、  $C_1 \sim C_{10}$  のアルキル、 及び  $R_{12}(CH_2)_nCO^-$  である。ここで、  $n$  は 0 ~ 5 であり、  $R_{12}$  は  $H$  、  $NH_2$  、 直鎖、 分枝、 又は環化された  $C_1 \sim C_{10}$  の基から選ばれたモノ又は二置換のアミノ。  $R_{10}$  及び  $R_{11}$  の両方が  $R_{12}(CH_2)_nCO^-$  であるか、 又は  $R_8$  が第3ブチル(*tertiary butyl*)であるという条件付きで。

30

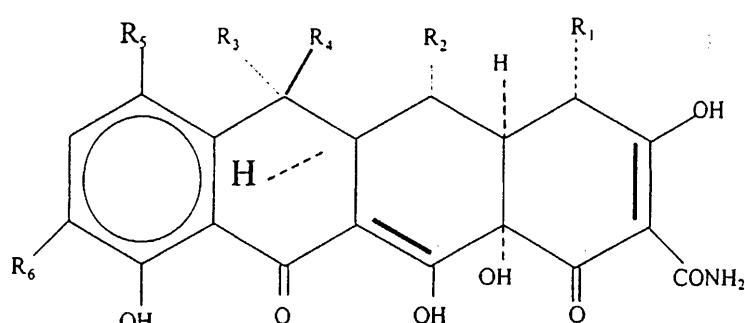
$R_7$  は  $H$  、 ハロゲン、 アセチレン、  $R_{12}-C_6H_5$  である。ここで、  $R_{12}$  は  $NO_2$  、 ハロゲン、 アセチルアミノ、 アミノ、 フェニル、 アルキル又はアルコキシである。

【0021】

より好ましい実施形態において、 本発明は、 細菌や腫瘍の成長を抑制する治療方法、 つまり、

一般的な化学式、 すなわち、

【化21】



40

からなるテトラサイクリン合成物又はその塩を効果的な量だけ、 治療を必要とされる対象物に投与することからなる治療方法に関する。

ここで、  $R_1$  は  $H$  又は  $N(CH_3)_2$  ;  $R_2$  は  $H$  、  $CH_3$  、 又は  $OCOCH_3$  ;  $R_3$  は  $H$

50

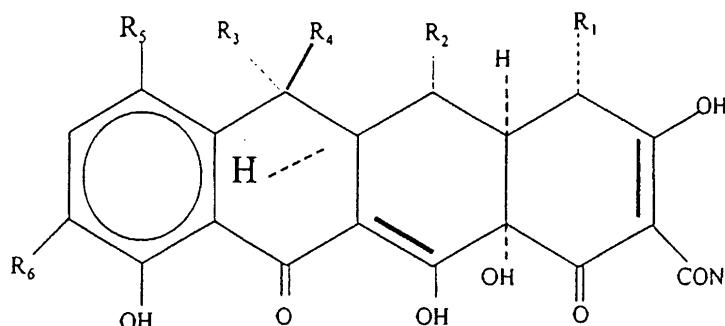
又は  $\text{CH}_3$  ;  $\text{R}_4$  は  $\text{H}$  ;  $\text{R}_5$  は  $\text{H}$ 、 $\text{N}(\text{CH}_3)_2$ 、 $\text{NH}_2$ 、 $\text{N}(\text{C}_4\text{H}_9)_2$ 、 $\text{N}(\text{C}_6\text{H}_{13})_2$ 、 $\text{N}(3,3\text{-dimethylbutyl})_2$ 、 $\text{N}_3$ 、 $\text{N}_2^+$ 、 $\text{NO}_2$ 、 $\text{NHCOCH}_3$ 、 $\text{NH}(\text{n-propyl})_2$ 、 $\text{NH(isobutyl)}$ 、 $\text{NH(isobutylmethyl)}$ 、 $\text{NH(cyclobutyl)}$ 、 $\text{NH(cyclobutylmethyl)}$ ；そして、 $\text{R}_6$  は  $\text{H}$ 、 $\text{NO}_2$ 、 $\text{NH}_2$ 、 $(\text{CH}_3)_2\text{CHNH}$ 、 $\text{N}_3$ 、 $\text{NHCOCH}_3$ 、 $\text{N}_2^+$ 、 $\text{N}_3$ 、又は  $(\text{CH}_3)_3\text{C}$  である。

## 【0022】

より好ましい実施形態において、本発明は、細菌や腫瘍の成長を抑制する治療方法、つまり、

一般的な化学式、すなわち、

## 【化22】



10

20

からなるテトラサイクリン合成物又はその塩を効果的な量だけ、治療を必要とされる対象物に投与することからなる治療方法に関する。

ここで、 $\text{R}_1$  は  $\text{H}$  又は  $\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ； $\text{R}_2$  は  $\text{H}$ 、 $\text{OH}$ 、又は  $\text{OCOCH}_3$ ； $\text{R}_3$  は  $\text{H}$  又は  $\text{CH}_3$ ； $\text{R}_4$  は  $\text{H}$ ； $\text{R}_5$  は  $\text{H}$ 、 $\text{N}(\text{CH}_3)_2$ 、 $\text{N}(\text{C}_4\text{H}_9)_2$ 、 $\text{N}(\text{C}_6\text{H}_{13})_2$ 、 $\text{N}(3,3\text{-dimethylbutyl})_2$ ； $\text{N}_3$ 、 $\text{N}_2^+$ 、 $\text{NO}_2$ 、 $\text{NHCOCH}_3$ 、 $\text{NH}(\text{n-propyl})_2$ 、 $\text{NH(isobutyl)}$ 、 $\text{NH(isobutylmethyl)}$ 、 $\text{N}(\text{CH}_3\text{CO})(\text{isobutyl})$ 、 $\text{NH(cyclobutyl)}$ 、 $\text{NH(cyclobutylmethyl)}$ ，又は  $\text{NH}_2$ ；そして、 $\text{R}_6$  は  $\text{H}$ 、 $\text{NO}_2$ 、 $\text{NH}_2$ 、 $(\text{CH}_3)_2\text{CHNH}$ 、 $\text{N}_3$ 、 $\text{NHCOCH}_3$ 、 $\text{N}_2^+$ 、又は  $(\text{CH}_3)_3\text{C}$  である。

30

## 【0023】

本発明に従った種々の物質の製法を以下に述べる。

## 【0024】

HPLC 分析は、水 (0.1% の TFA を含む) と、溶離液としてのアセトニトリルとを用い、Waters の逆相  $\text{C}_{18}$  - symmetry カラムで行った。

## 【0025】

分析的な LC / MS は、シリーズ 1100 MSD ディテクターを装備したヒューレット・パッカード・シリーズ 1100 液体クロマトグラフィ装置で行った。それは、流速が 0.4 mL / min で  $4.6 \times 100$  mm のカラムを使用し、ES イオン化モードと、270 nm の UV 検出を備えている。予備の HPLC は、流速が 1.5 mL / min で  $19 \times 1$  50 mm のカラムを使用し、270 nm の UV 検出を備えたギルソンの serial HPLC で行った。 $^1\text{H}$  NMR は Bruker 300 MHz 分光計で重水素化メタノール中で記録された。

## 9-ニトロ-ドキシサイクリン 硫酸塩

## 【0026】

3.0 mL の 0 の濃硫酸に塩酸ドキシサイクリン (1 g、2.08 mol) を攪拌した溶液に、硝酸カリウム (252 mg、2.49 mmol) が加えられた。生成された混合物が 0 で 20 分間攪拌され、その後、攪拌しながら、1.2 L の冷たいエーテルの中に注入された。沈殿した固体がフィルタにより抽出され、冷たいエーテルで洗浄され、真空中で乾燥された。そして、1.22 g のクリーム色の生成物が得られた。必要ならば、そ

40

50

の生成物は、メタノールに溶かし、フィルタ処理し、その濾過液をエーテルに注入することによって精製される。分離された、その固形物は、フィルタにより抽出され、乾かされた。

#### 9 - アミノ - ドキシサイクリン 硫酸塩

##### 【0027】

35 mL のエチレン・グリコール・モノメチル・エーテルと 5 mL のメタノールの中に 9 - ニトロ - ドキシサイクリン硫酸塩 (1 g、1.7 mmol) を攪拌した溶液に、700 mg の 10% Pd / C が加えられた。その生成された混合物 (reaction mixture) は大気圧下で 6 時間 水素添加 (hydrogenated) された。その後、触媒がセライトにより濾別され、メタノールで洗浄された。その濾過液が集められ、800 mL の冷たいエーテルの中に掻き混ぜながら滴下された。分離された固形物がフィルタにより抽出され、冷たいエーテルで洗浄され、真空下で乾燥された。そして、843 mg のクリーム色の生成物が得られた。

#### 9 - イソプロピルアミノ - ドキシサイクリン 硫酸塩

##### 【0028】

10 mL のエチレングリコール = モノメチル = エーテルに 9 - アミノ - ドキシサイクリン硫酸塩 (100 mg、0.18 mmol) を攪拌した溶液に、0.05 mL の濃硫酸、0.5 mL のアセトン、及び 100 mg の 10% Pd / C が加えられた。生成された混合物は大気圧下で 1 時間 15 分水素添加 (hydrogenated) された。その後、触媒はセライトで濾別され、メタノールで洗浄された。その濾過液が集められ、150 mL の冷たいエーテルの中に掻き混ぜながら滴下された。分離された固形物がフィルタにより抽出され、冷たいエーテルで洗浄され、真空下で乾燥された。そして、109 mg のクリーム色の生成物が得られた。その生成物は、メタノールに溶かし、フィルタ処理し、その濾過液をエーテルに注入することによって精製された。生成された、その固形物は、フィルタにより抽出され、乾かされた。

#### 9 - アセトアミド - ドキシサイクリン 硫酸塩

##### 【0029】

1.5 mL の 1,3 - ジメチル - 2 - イミダゾリジノンに 9 - アセトアミド - ドキシサイクリン硫酸塩 (72 mg、0.13 mmol) を攪拌した溶液に、0.05 mL の塩化アセチル (acetyl chloride) を伴った 70 mg の重炭酸ナトリウム (sodium bicarbonate) が加えられた。その混合物は室温で 1 時間攪拌され、その後、フィルタ処理された。その濾過液が集められ、攪拌しながら、100 mL の冷たいエーテルの中に注入された。分離された、その固形物が、フィルタにより抽出され、真空下で乾燥され、そして、92 mg が得られた。

#### 9 - ジアゾニウム - ドキシサイクリン 硫酸 塩酸

##### 【0030】

アイス・バス (ice bath) にて冷却された、0.1 N 塩酸を含むメタノール (9 mL) に 9 - アミノ - ドキシサイクリン硫酸 (300 mg、0.54 mmol) を攪拌した溶液に、0.3 mL の亜硝酸 n - ブチル (n-butylnitrite) が加えられた。その溶液は 0 度で 30 分間攪拌された後、300 mL の冷たいエーテルの中に攪拌しながら注入された。分離された固形物がフィルタにより抽出され、真空下で乾燥され、そして、256 mg のオレンジ - ブラウンの生成物が得られた。

#### 9 - アジド - ドキシサイクリン 硫酸塩

##### 【0031】

0.1 N 塩酸を含むメタノール (4.5 mL) に 9 - ジアゾニウム - ドキシサイクリン硫酸 塩酸 (80 mg、0.14 mmol) を攪拌した溶液に、10 mg のアジ化ナトリウム (sodium azide) が加えられた。その溶液は室温で 2 時間攪拌された後、100 mL の冷たいエーテルの中に攪拌しながら注入された。分離された固形物がフィルタにより抽出され、真空下で乾燥され、そして、43 mg の生成物が得られた。

#### 9 - (4 - フルオロフェニル) - ドキシサイクリン

10

20

30

40

50

## 【0032】

4 mL のメタノールに、9-ジアゾニウム-ドキシサイクリン硫酸塩酸(358mg、0.59mmol)と4-フルオロフェニルボロン酸(107mg、0.76mmol)を攪拌した溶液に、18mgの酢酸パラジウム(II)(palladium(II)acetate)が加えられた。生成された混合物は室温で16時間攪拌された。触媒は濾別され、そして、残渣が集められて、分取用HPLCにより精製された。HPLCから採取されたフラクションが集められ、20mLの冷たいエーテルの中に注入された。分離された固体物は、フィルタにより抽出され、真空下で乾燥され、そして、32mgの生成物が得られた。

## 7-[1,2-ビス(カルボベンジルオキシ)ヒドラジノ]-ドキシサイクリン

10

## 【0033】

0 の 2.5 mL の THF 及び 3.2 mL のメタスルホン酸にドキシサイクリン塩酸塩(300mg、0.62mmol)を攪拌した溶液に、230mgの dibenzoylazodicarboxylate が加えられた。生成された混合物は 0 で 2 時間攪拌された後、400mL の冷たいエーテルの中に注入された。分離された固体物は、フィルタにより抽出され、真空下で乾燥され、そして、479mg のオフ・ホワイトの生成物が得られた。

## 7-アミノ-ドキシサイクリン

## 【0034】

30mL のエチレン・グリコール・モノメチル・エーテルに 7-[1,2-ビス(カルボベンジルオキシ)ヒドラジノ]-ドキシサイクリン(478mg)を入れた溶液に、200mgの 10% Pd/C が加えられた。その生成された混合物(reaction mixture)は室温で 3 時間 水素添加(hydrogenated)された。触媒はセライトで濾過され、メタノールで洗浄された。その濾過液が集められ、500mL の冷たいエーテルの中に注入された。分離された固体物がフィルタにより抽出され、真空下で乾燥された。そして、268mg の生成物が得られた。

## 7-ジメチルアミノ-ドキシサイクリン硫酸塩

## 【0035】

8 mL のエチレン・グリコール・モノメチル・エーテルに 7-アミノ-ドキシサイクリン(100mg)を入れた溶液に、1mL の 37% ホルムアルデヒド水溶液、0.05mL の濃硫酸、及び 100mg の 10% Pd/C が加えられた。生成された混合物は、大気圧下で 6 時間水素添加された。触媒はセライトで濾過され、メタノールで洗浄された。その残渣が集められ、100mL の冷たいエーテルの中に搔き混ぜながら注入された。よく粘り着く、分離された固体物がかろうじてフィルタにより抽出された。その固体物は、直ぐにメタノールに溶かされ、100mL の冷たいエーテルに搔き混ぜながら注入された。分離された、その固体物は、フィルタにより抽出され、真空下で乾燥され、89mg の生成物が得られた。

## 7-ジプロピル-ドキシサイクリン硫酸塩

## 【0036】

8 mL のエチレン・グリコール・モノメチル・エーテルに 7-アミノ-ドキシサイクリン(90mg)を入れた溶液に、0.5mL のプロピオンアルデヒド、0.05mL の濃硫酸、及び 80mg の 10% Pd/C が加えられた。生成された混合物は、大気圧下で 5 時間水素添加され、触媒はセライトで濾過され、メタノールで洗浄された。その残渣が集められ、100mL の冷たいエーテルの中に搔き混ぜながら注入された。分離された固体物は、フィルタにより抽出され、真空下で乾燥され、415mg の生成物が得られた。

## 7-ジブチルアミノ-ドキシサイクリン硫酸塩

## 【0037】

6 mL のエチレン・グリコール・モノメチル・エーテルに 7-アミノ-ドキシサイクリン(100mg、0.2mmol)を入れた溶液に、0.6mL のブチルアルデヒド、0.05mL の濃硫酸、及び 100mg の 10% Pd/C が加えられた。生成された混合物

50

は、大気圧下で4時間水素添加され、触媒はセライトで濾過され、メタノールで洗浄された。その残渣が集められ、100mLの冷たいエーテルの中に掻き混ぜながら注入された。分離された固体物は、フィルタにより抽出され、真空下で乾燥され、103mgの生成物が得られた。

7-ジ(3,3-ジメチル)ブチルアミノ-ドキシサイクリン 硫酸塩

【0038】

6mLのエチレン・グリコール・モノメチル・エーテルに7-アミノ-ドキシサイクリン(100mg、0.2mmol)を入れた溶液に、0.5mLの3,3-ジメチルブチルアルデヒド、0.05mLの濃硫酸、及び100mgの10%Pd/Cが加えられた。生成された混合物は、大気圧下で4時間水素添加され、触媒はセライトで濾過され、メタノールで洗浄された。その残渣が集められ、100mLの冷たいエーテルの中に掻き混ぜながら注入された。分離された固体物は、フィルタにより抽出され、真空下で乾燥され、122mgの生成物が得られた。

7-ジヘキシルアミノ-ドクシサイクリン 硫酸塩

【0039】

6mLのエチレン・グリコール・モノメチル・エーテルに7-アミノ-ドキシサイクリン(100mg、0.2mmol)を入れた溶液に、0.6mLのヘキサンール、0.05mLの濃硫酸、及び100mgの10%Pd/Cが加えられた。生成された混合物は、大気圧下で4時間水素添加され、触媒はセライトで濾過され、メタノールで洗浄された。その残渣が集められ、100mLの冷たいエーテルの中に掻き混ぜながら注入された。分離された固体物は、フィルタにより抽出され、真空下で乾燥され、129mgの生成物が得られた。

7-イソプロピルアミノ-ドキシサイクリン 硫酸塩

【0040】

8mLのエチレン・グリコール・モノメチル・エーテルに7-アミノ-ドキシサイクリン(90mg、0.2mmol)を入れた溶液に、0.5mLのイソブチルアルデヒド、0.05mLの濃硫酸、及び90mgの10%Pd/Cが加えられた。生成された混合物は、大気圧下で6時間水素添加され、触媒はセライトで濾過され、メタノールで洗浄された。その残渣が集められ、100mLの冷たいエーテルの中に掻き混ぜながら注入された。分離された固体物は、フィルタにより抽出され、真空下で乾燥され、142mgの生成物が得られた。

7-メチル-7-イソプロピルアミノ-ドキシサイクリン 硫酸塩

【0041】

4mLのエチレン・グリコール・モノメチル・エーテルに7-イソプロピルアミノ-ドキシサイクリン(60mg)を入れた溶液に、0.4mLの37%ホルムアルデヒド水溶液、0.05mLの濃硫酸、及び50mgの10%Pd/Cが加えられた。生成された混合物は、大気圧下で2時間水素添加され、その後、触媒はセライトで濾過され、メタノールで洗浄された。その残渣が集められ、80mLの冷たいエーテルの中に掻き混ぜながら注入された。分離された固体物は、フィルタにより抽出され、真空下で乾燥され、52mgの生成物が得られた。

7-シクロブチルアミノ-ドキシサイクリン 硫酸塩

【0042】

7mLのエチレン・グリコール・モノメチル・エーテルに7-アミノ-ドキシサイクリン(80mg)を入れた溶液に、0.3mLのシクロブタノン、0.04mLの濃硫酸、及び60mgの10%Pd/Cが加えられた。生成された混合物は、大気圧下で24時間水素添加され、触媒はセライトで濾過され、メタノールで洗浄された。その残渣が集められ、100mLの冷たいエーテルの中に掻き混ぜながら注入された。分離された固体物は、フィルタにより抽出され、真空下で乾燥され、85mgの生成物が得られた。

7-メチル-7-シクロブチルアミノ-ドキシサイクリン 硫酸塩

【0043】

10

20

30

40

50

3.5 mL のエチレン・グリコール・モノメチル・エーテルに 7 - シクロブチルアミノ - ドキシサイクリン (40 mg) を入れた溶液に、0.3 mL の 37% ホルムアルデヒド水溶液、0.03 mL の濃硫酸、及び 40 mg の 10% Pd / C が加えられた。生成された混合物は、大気圧下で 6 時間水素添加され、触媒はセライトで濾過され、メタノールで洗浄された。その残渣が集められ、80 mL の冷たいエーテルの中に掻き混ぜながら注入された。分離された固体物は、フィルタにより抽出され、真空下で乾燥され、35 mg の生成物が得られた。

#### 7 - アセトアミド - ドキシサイクリン 硫酸塩

##### 【0044】

3 mL の 1,3 - ジメチル - 2 - イミダゾリジノンに 7 - アミノ - ドキシサイクリン (200 mg) を入れた溶液に、0.09 mL の塩化アセチル (acetyl chloride) を伴った 200 mg の重炭酸ナトリウム (sodium bicarbonate) が加えられた。その混合物は室温で 1 時間攪拌され、その後、フィルタ処理された。その濾過液が集められ、攪拌しながら、200 mL の冷たいエーテルの中に注入された。沈殿した生成物がフィルタにより抽出され、真空下で乾燥された。202 mg の生成物が得られた。

#### 7 - アセトアミド - 7 - イソプロピル - ドキシサイクリン 硫酸塩

##### 【0045】

1.5 mL の 1,3 - ジメチル - 2 - イミダゾリジノンに 7 - イソブチルアミノ - ドキシサイクリン (60 mg) を攪拌した溶液に、0.05 mL の塩化アセチル (acetyl chloride) を伴った 60 mg の重炭酸ナトリウム (sodium bicarbonate) が加えられた。その混合物は室温で 1 時間半攪拌され、その後、フィルタ処理された。その濾過液が集められ、攪拌しながら、80 mL の冷たいエーテルの中に注入された。沈殿した生成物がフィルタにより抽出され、真空下で乾燥された。

#### 7 - ジアゾニウム - ドキシサイクリン 塩酸 又は テトラフルオロ口ほう酸

##### 【0046】

アイス・バス (ice bath) にて冷却された、0.1 N 塩酸を含むメタノール (4 mL) に 7 - アミノ - ドキシサイクリン (200 mg、0.4 mmol) を攪拌した溶液に、0.2 mL の亜硝酸 n - ブチル (n-butylnitrite) が加えられた。その溶液は 0 度で 30 分間攪拌された後、200 mL の冷たいエーテルの中に攪拌しながら注入された。分離された固体物がフィルタにより抽出され、真空下で乾燥され、そして、173 mg の生成物が得られた。塩酸の代わりにテトラフルオロ口ほう酸 (tetrafluoroborate acid; エーテルに 54% 溶液) を用いることにより、テトラフルオロ口ほう酸ジアゾニウム塩 (diazonium tetrafluoroborate salt) が調製された。

#### 7 - アジド - ドキシサイクリン

##### 【0047】

アイス・バス (ice bath) にて冷却された、0.1 N 塩酸を含むメタノール (4.5 mL) に 7 - ジアゾニウム - ドキシサイクリン 塩酸 (80 mg、0.14 mmol) を攪拌した溶液に、12 mg のアジ化ナトリウム (sodium azide) が加えられた。その溶液は室温で 2 時間攪拌された後、100 mL の冷たいエーテルの中に攪拌しながら注入された。分離された固体物がフィルタにより抽出され、真空下で乾燥された。43 mg の生成物が得られた。

#### 7 - アミノ - ニトロ - ドキシサイクリン 硫酸塩

##### 【0048】

4 mL の濃硫酸に 0 度で 7 - アミノ - ドキシサイクリン (220 g、0.44 mmol) を攪拌した溶液に、硝酸カリウム (52 mg、0.51 mmol) が加えられた。生成された混合物が 0 度で 15 分間攪拌され、その後、攪拌しながら、300 mL の冷たいエーテルの中に注入された。分離された固体物がフィルタにより抽出され、冷たいエーテルで洗浄され、真空下で乾燥された。その生成物は、メタノールに溶かし、フィルタ処理され

、その濾過液はエーテルに注入された。分離された、その固形物は、フィルタにより抽出され、乾かされた。そして、222 g の生成物が得られた。

#### 7 - ジメチルアミノ - 9 - ニトロ - ドキシサイクリン 硫酸塩

##### 【0049】

1.5 mL の 0 の濃硫酸に 7 - ジメチルアミノ - ドキシサイクリン (40 g、0.07 mmol) が攪拌された溶液に、硝酸カリウム (12 mg、0.12 mmol) が加えられた。生成された混合物が 0 で 30 分間攪拌され、その後、攪拌しながら、60 mL の冷たいエーテルの中に注入された。分離された固形物がフィルタにより抽出され、冷たいエーテルで洗浄され、真空下で乾燥された。LC/MS は、大体において、2つのニトロ基（多分、望まれる生成物の硝酸エステル）を含む1つの生成物を示す。

10

#### 7 - ジメチルアミノ - 9 - ジアゾニウム - ドキシサイクリン 硫酸 塩酸

##### 【0050】

アイス・バス (ice bath) にて冷却された、0.1 N 塩酸を含むメタノール (1.5 mL) に 7 - ジメチルアミノ - 9 - アミノ - ドキシサイクリン (50 mg) を攪拌した溶液に、0.05 mL の亜硝酸 n - ブチル (n - butyl nitrite) が加えられた。その溶液は 0 で 30 分間攪拌された後、80 mL の冷たいエーテルの中に攪拌しながら注入された。分離された固形物はフィルタにより抽出され、真空下で乾燥され、そして、38 mg の生成物が得られた。

20

#### 7 - アセトアミド - 9 - ニトロ - ドキシサイクリン 硫酸塩

##### 【0051】

2 mL の 0 の濃硫酸に 7 - アセトアミノ - ドキシサイクリン (60 g、0.095 mmol) を攪拌した溶液に、硝酸カリウム (11 mg、0.11 mmol) が加えられた。生成された混合物が 0 で 5 分間攪拌され、その後、攪拌しながら、80 mL の冷たいエーテルの中に注入された。分離された固形物がフィルタにより抽出され、冷たいエーテルで洗浄され、真空下で乾燥された。

#### 7 - アセトアミド - 9 - アミノ - ドキシサイクリン 硫酸塩

##### 【0052】

7 mL のエチレン・グリコール・モノメチル・エーテルに 7 - アセトアミド - 9 - ニトロ - ドキシサイクリン 硫酸 (77 mg、0.12 mmol) を入れた溶液に、60 mg の 10% Pd/C が加えられた。生成された混合物は、大気圧下で 7 時間水素添加され、触媒はセライトにより濾過され、メタノールで洗浄された。その濾過液が集められ、100 mL の冷たいエーテルの中に掻き混ぜながら滴下された。分離された固形物がフィルタにより抽出され、冷たいエーテルで洗浄され、真空下で乾燥された。そして、62 mg の生成物が得られた。

30

#### 7 - アセトアミド - 9 - ジアゾニウム - ドキシサイクリン 硫酸 塩酸

##### 【0053】

アイス・バス (ice bath) にて冷却された、0.1 N 塩酸を含むメタノール (3 mL) に 7 - アセトアミド - 9 - アミノ - ドキシサイクリン (100 mg) を攪拌した溶液に、0.1 mL の亜硝酸 n - ブチル (n - butyl nitrite) が加えられた。その溶液は 0 で 30 分間攪拌された後、100 mL の冷たいエーテルの中に攪拌しながら注入された。分離された固形物はフィルタにより抽出され、真空下で乾燥され、そして、92 mg の生成物が得られた。

40

#### 7 - アセトアミド - 9 - アジド - ドキシサイクリン 硫酸塩

##### 【0054】

アイス・バス (ice bath) にて冷却された、0.1 N 塩酸を含むメタノール (6 mL) に 7 - アセトアミド - 9 - ジアゾニウム - ドキシサイクリン (112 mg、0.19 mmol) を攪拌した溶液に、14 mg (0.21 mmol) のアジ化ナトリウム (sodium azide) が加えられた。その溶液は 0 で 35 分間攪拌された後、150 mL の冷たいエーテルの中に攪拌しながら注入された。分離された固形物はフィルタにより抽出され、真空下で乾燥され、そして、94 mg の生成物が得られた。

50

## ドキシサイクリン ヨウ化メチル

## 【0055】

高純度のドキシサイクリン (315 mg) は、2 mL のメタノール及び 10 mL の THF の中に溶かされ、その後、1 mL のヨウ化メチルが加えられた。生成された混合物は 5 日間放置された。生成物には結晶は生じなかった。その生成された混合物は集められ、300 mL の冷たいエーテルの中に攪拌しながら注入された。分離された生成物はフィルタにより抽出され、真空下で乾燥され、そして、269 mg が得られた。LC/MS は純粋な生成物を示す。

## 5 - アセトキシ - ドキシサイクリン

## 【0056】

3 mL の 30% HBr / 醋酸溶液 (acetic acid solution) 中にドキシサイクリン (100 mg) を入れた溶液が室温で 3.5 日間攪拌された。その生成された混合物は、100 mL の冷たいエーテルの中に攪拌しながら注入された。そして、その分離された生成物はフィルタにより抽出された。LC/MS は出発物質の不完全な conversion を示す。そして、生成物 (86 mg) は反応状態に 9 時間置かれ、そして、同様の方法で分離された。

## 9 - tert ブチル - ドキシサイクリン

## 【0057】

2 mL の tert - ブタノールと 3 mL のメタンスルホン酸にドキシサイクリン (100 mg) を入れた溶液が室温で 18 時間攪拌され、その後、100 mL の冷たいエーテルの中に攪拌しながら注入され、n - ブタノールで抽出された。有機抽出物 (organic extracts) は、1 N 水酸化ナトリウム溶液で basified された。そして、pH は、濃塩酸により直ぐに 6.5 - 7 に調整された。沈殿した固体物がフィルタにより抽出され、その後、メタノールに溶かされ、集められ、エーテル / 石油エーテルの冷たい溶液 (30 mL) に攪拌しながら滴下された。分離された固体物は、フィルタにより抽出され、真空下で乾燥された。

## 9 - tert ブチル - 7 - ニトロ - ドキシサイクリン

## 【0058】

10 mL の tert - ブタノールと 30 mL のメタンスルホン酸に塩酸ドキシサイクリン (2 g) を入れた溶液が室温で 3 時間攪拌され、その後、500 mg の硝酸カリウムが加えられ、生成された混合物はさらに攪拌された。その生成された混合物は、100 mL の冷たい溶液 (23 mg の水酸化ナトリウムを含む水) に注入された。さらに、その生成混合物がアルカリ性になるまで、希 NaOH 溶液が滴下された。pH は、濃塩酸により直ぐに 6.5 - 7 に調整された。分離された、粘り気のある黒っぽい固体物がフィルタにより抽出された。液状の濾液 (aqueous filtrate) が n - ブタノールで抽出された。粗生成物 (crude product) は最小限の量のメタノールに溶かされ、HPLC により精製された。HPLC からのフラクションが濃縮され、メタノールに溶かされ、エーテル / 石油エーテル (PET ether) の 3 : 1 の混合物 (50 mL) に滴下された。分離された固体物は、フィルタにより抽出され、そして、788 mg の淡黄 (pale yellow) の生成物が得られた。

## 9 - tert ブチル - 7 - アミノ - ドキシサイクリン

## 【0059】

25 mL のエチレン・グリコール・モノメチル・エーテルに 9 - tert ブチル - 7 - ドキシサイクリン (500 mg) を入れた溶液に、350 mg の 10% Pd / C が加えられた。生成された混合物は、大気圧下で 17 時間水素添加され、触媒はセライトで濾過され、メタノールで洗浄された。その残渣が集められ、THF に溶かされ、エーテル / 石油エーテル (PET ether) の冷たい 1 : 1 の溶液の中に掻き混ぜながら滴下された。沈殿した固体物がフィルタにより抽出され、真空下で乾燥された。そして、452 mg の生成物が得られた。

## 9 - tert ブチル - 7 - ジアゾニウム - ドキシサイクリン

10

20

30

40

50

## 【0060】

アイス・バス (ice bath) にて冷却された、0.1N 塩酸を含むメタノール (2.5 mL) に 9-tert ブチル - 7 - アミノ - ドキシサイクリン (93 mg, 0.18 mmol) を攪拌した溶液に、0.1 mL の亜硝酸 n - ブチル (n-buty1 nitrite) が加えられた。その溶液は 0 で 30 分間攪拌された後、半分が、エーテル / 石油エーテル (P E T e t h e r) の 3 : 1 の冷たい混合物 (30 mL) の中に攪拌しながら注入された。生成物は、ガムのように、ビーカの底にこびり付いた。それが、メタノールに溶かされると共に集められ、残渣が 20 mL の冷たいエーテルの中に注入された。分離された固体物は直ちにフィルタにより抽出され、真空下で乾燥され、そして、42 mg の生成物が得られた。

10

## 9-tert ブチル - 7 - アジド - ドキシサイクリン

## 【0061】

9-tert ブチル - 7 - ジアゾニウム - ドキシサイクリン生成混合物 (1.5 mL) が 0 で攪拌された溶液に、8 mg (0.12 mmol) のアジ化ナトリウムが加えられた。その溶液は、室温まで加温される 3 時間の間、攪拌された。その生成された混合物を集めた後、残渣は、エーテル / 石油エーテル (P E T e t h e r) の 3 : 1 の冷たい混合物の中に攪拌しながら注入された。固体物は一切分離されなかったので、乾燥させて 35 mg の生成物を得るために溶液が集められた。

## 9-tert ブチル - 7 - ジメチルアミノ - ドキシサイクリン

## 【0062】

10 mL のエチレン・グリコール・モノメチル・エーテルと 115 mg の 10% P D / C で 167 mg の 9-tert ブチル - 7 - アミノ - ドキシサイクリンを含む 9-tert ブチル - 7 - アミノ - ドキシサイクリンから攪拌されて生成された混合物に、1.2 mL の 37% ホルムアルデヒド水溶液が加えられた。生成された混合物は大気圧下で 3.5 時間 水素添加 (hydrogenated) された。触媒はセライトで濾過され、メタノールで洗浄された。その濾過液が集められ、残渣が 10 mL の冷たいエーテルの中に掻き混ぜながら注入された。分離された固体物がフィルタにより抽出され、真空下で乾燥された。LC / MS は期待した生成物を示したが、baseline 不純物で汚染されていた。

20

## 9-tert ブチル - 7 - アセトアミノ - ドキシサイクリン

## 【0063】

2 mL の 1,3 - ジメチル - 2 - イミダゾリジノンに 9-tert ブチル - 7 - アミノ - ドキシサイクリン (100 mg) が攪拌された溶液に、0.07 mL のアセチル = クロリドを伴った 100 mg の重炭酸ナトリウムが加えられた。その混合物は室温で 1.5 時間攪拌され、その後、フィルタ処理された。その濾過液が集められ、100 mL の冷たいエーテルの中に掻き混ぜながら注入された。分離された生成物がフィルタにより抽出された。粗生成物 (crude product) はメタノールに溶かされ、フィルタにより抽出され、エーテル / 石油エーテル (P E T e t h e r) の 3 : 1 の冷たい混合物に、攪拌されながら滴下された。その生成物は、濾過により集められ、真空下で乾燥され、76 mg の生成物が得られた。

30

## 4 - dedimethylamino - ドキシサイクリン

## 【0064】

12 mL の酢酸と 12 mL の水の中に、テトラサイクリン = ヨウ化メチル (860 mg) が攪拌された溶液に、432 mg の亜鉛ダストが加えられた。15 分間攪拌した後、その亜鉛粉がフィルタにより抽出された。濾過液は、0.86 mL の濃塩酸溶液を含む 86 mL の水で希釈された。分離された生成物はフィルタにより抽出され、真空下で乾燥され、419 mg の生成物が得られた。

40

## 4 - dedimethylamino - 9 - ニトロ - ドキシサイクリン

## 【0065】

20 mL の 0 の濃硫酸に 4 - dedimethylamino - ドキシサイクリン (4

50

0.2 mg、1 mmol)を攪拌した溶液に、111 mgの硝酸カリウムが加えられた。20分間攪拌された後、生成された混合物は、100 mLの冷たい水の中に注入された。その生成物を含む水にn-ブタノールが加えられ、有機層が分離された。n-ブタノールを用いての抽出は2度繰り返された。その有機抽出物は集められ、冷たい水に攪拌しながら加えられた。分離された生成物はフィルタにより抽出された。n-ブタノールや、冷たい水への注入や、フィルタを用いた再抽出により、さらなる生成物が取り出された。真空乾燥により、353 mgの生成物が得られた。

#### 4 - dedimethylamino - 9 - アミノ - ドキシサイクリン

##### 【0066】

17 mLのエチレン・グリコール・モノメチル・エーテルに4 - dedimethylamino - 9 - ニトロ - ドキシサイクリン(353 mg)を攪拌した溶液に、0.1 mLの濃硫酸、及び200 mgの10% Pd/Cが加えられた。そして、生成された混合物は、大気圧下で10時間水素添加(hydrogenated)された。触媒はセライトで濾過され、メタノールで洗浄された。その濾過液が集められ、100 mLのエーテルの中に注入された。分離された固体物がフィルタにより抽出され、真空下で乾燥され、292 mgの生成物が得られた。

#### 4 - dedimethylamino - 9 - ジアゾニウム - ドキシサイクリン 塩酸

##### 【0067】

アイス・バス(ice bath)にて冷却された、0.1 N 塩酸を含むメタノール(5 mL)に4 - dedimethylamino - 9 - アミノ - ドキシサイクリン(220 mg)を攪拌した溶液に、0.2 mLの亜硝酸n-ブチル(n-butylnitrite)が加えられた。その溶液は0で30分間攪拌された後、エーテル/石油エーテル(PET ether)の2:1の冷たい混合物(150 mL)に、攪拌されながら注入された。分離された固体物は、フィルタにより抽出され、真空下で乾燥され、そして、191 mgの生成物が得られた。

#### 4 - dedimethylamino - 9 - アジド - ドキシサイクリン

##### 【0068】

アイス・バス(ice bath)にて冷却された、0.1 N 塩酸を含むメタノール(6.5 mL)に4 - dedimethylamino - 9 - ジアゾニウム - ドキシサイクリン(150 mg、0.32 mmol)を攪拌した溶液に、23 mgのアジ化ナトリウムが加えられた。そして、その溶液は0で1時間攪拌された。その後、その混合物は120 mLの冷たいエーテルの中に攪拌しながら注入された。いくらかの固体物が形成された。その固体物は、フィルタ処理されたが、取り出せなかった。その濾過液が濃縮され、メタノールが除去され、50 mLの冷たい水の中に攪拌しながら注入された。分離された固体物はフィルタにより抽出され、真空下で乾燥された。さらなる生成物が、n-ブタノールや、水への注入や、固体物のフィルタ処理で濾過液を抽出することにより得られた。そして、84 mgの生成物が得られた。

#### 4 - dedimethylamino - 7 - ニトロ - 9 - tertブチル - ドキシサイクリン

##### 【0069】

3 mLのtert - ブタノールと15 mLのメタンスルホン酸に4 - dedimethylamino - ドキシサイクリン(500 mg、1.25 mmol)を入れた溶液が、室温下で15時間攪拌され、その後、140 mgの硝酸カリウムが加えられ、生成された混合物はさらに攪拌された。その生成された混合物は、200 mLの冷たい水に注入された。分離された固体物がフィルタにより抽出され、空気乾燥された。粗生成物(crude product)は最小限の量のメタノールに溶かされ、HPLCにより精製された。HPLCからのフラクションが濃縮され、メタノールに溶かされ、50 mLの冷たい水の中に滴下された。分離された固体物は、フィルタにより抽出され、真空下で乾燥され、そして、217 mgの生成物が得られた。

#### 4 - dedimethylamino - 7 - アミノ - 9 - tertブチル - ドキシサイク

50

リン

【0070】

12 mL のエチレン・グリコール・モノメチル・エーテルに 4 - dedimethylamino - 7 - ニトロ - 9 - tert ブチル - ドキシサイクリン (217 mg, 0.42 mmol) を攪拌した溶液に、170 mg の 10% Pd / C が加えられた。そして、生成された混合物は、大気圧下で 13 時間水素添加 (hydrogenated) された。触媒はセライトで濾過され、メタノールで洗浄された。その濾過液が集められ、エーテル / 石油エーテル (PET ether) の 3 : 1 の混合物 (20 mL) に注入され、そして、40 mg の生成物が得られた。オレンジの濾過液が乾燥のために集められ、138 mg の生成物が得られた。

10

4 - dedimethylamino - 7 - ジアゾニウム - 9 - tert ブチル - ドキシサイクリン

【0071】

アイス・バス (ice bath) にて冷却された、0.1 N 塩酸を含むメタノール (5 mL) に 4 - dedimethylamino - 7 - アミノ - 9 - tert ブチル - ドキシサイクリン (165 mg) を攪拌した溶液に、0.15 mL の亜硝酸 n - ブチル (n - butyl nitrite) が加えられた。その溶液は 0 で 30 分間攪拌された。その半分が、50 mL の冷たいエーテルの中に攪拌しながら注入された。分離された固体物は、フィルタにより抽出され、真空下で乾燥され、そして、50 mg の生成物が得られた。

20

4 - dedimethylamino - 7 - アミノ - ドキシサイクリン

【0072】

4 mL の THF と 4.5 mL のメタンスルホン酸に 0 で 4 - dedimethylamino - ドキシサイクリン (400 mg) を攪拌した溶液に、418 mg (1.4 mmol) のジベンジル・azodicarboxylate が加えられた。そして、生成された混合物が、室温にまで暖められるまで 4 時間攪拌された。水と n - ブタノールが加えられて、2 つの層が分離された。aqueous Layer が、エーテル / n - ブタノールの混合物で抽出された。有機抽出物が濃縮され、そして、10 mL のエチレン・グリコール・モノメチル・エーテルが加えられた。その後、430 mg の 10% Pd / C が加えられ、生成された混合物が大気圧下で 12 時間水素添加された。触媒はセライトで濾過され、メタノールで洗浄された。その濾過液が集められ、エーテル / 石油エーテル (PET ether) の 3 : 1 の冷たい混合物に搔き混ぜながら注入された。分離された生成物がフィルタにより抽出され、真空下で乾燥され、そして、114 mg の生成物が得られた。

30

9 - ニトロ - ミノサイクリン硫酸

【0073】

30 mL の濃硫酸に 0 で塩酸ミノサイクリン (1 g, 2.02 mmol) が攪拌された溶液に、硝酸カリウム (246 mg) が加えられた。その生成された混合物は、45 分間 0 で攪拌され、その後、1.2 L の冷たいエーテルの中に攪拌されながら注入された。分離された固体物は、フィルタにより抽出され、冷たいエーテルで洗浄され、真空下で乾燥され、1.33 g の生成物が得られた。

40

9 - アミノ - ミノサイクリン硫酸

【0074】

10 mL のエチレン・グリコール・モノメチル・エーテルと 7 mL のメタノールに 9 - ニトロ - ミノサイクリン硫酸 (500 g, 0.83 mmol) が攪拌された溶液に、250 mg の 10% Pd / C が加えられた。その生成された混合物は、大気圧下で 4 時間水素添加された。触媒はセライトで濾過され、メタノールで洗浄された。その濾過液が集められ、600 mL の冷たいエーテルに搔き混ぜながら注入された。分離された固体物がフィルタにより抽出され、冷たいエーテルで洗浄され、真空下で乾燥され、そして、465 mg の生成物が得られた。

9 - ジアゾニウム - ミノサイクリン硫酸 塩酸

50

## 【0075】

アイス・バス(ice bath)にて冷却された、0.1N 塩酸を含むメタノール(3 mL)に9-アミノ-ミノサイクリン硫酸(100 mg)を攪拌した溶液に、0.1 mL の亜硝酸 tert-ブチル(又は、亜硝酸n-ブチル)が加えられた。その溶液は0で30分間攪拌された後、100 mLの冷たいエーテルの中に攪拌しながら注入された。分離された固形物がフィルタにより抽出され、真空下で乾燥され、そして、87 mgのオレンジ-ブラウンの生成物が得られた。

## 9-アジド-ミノサイクリン硫酸

## 【0076】

0.1N 塩酸を含むメタノール(18 mL)に9-ジアゾニウム-ミノサイクリン硫酸(485 mg、0.83 mmol)を攪拌した溶液に、59 mgのアジ化ナトリウムが加えられた。その溶液は室温で2時間攪拌され、その後、フィルタ処理され、その濾過液が500 mLの冷たいエーテルに攪拌しながら注入された。分離された固形物は、フィルタにより抽出され、真空下で乾燥され、そして、480 mgのベージュ色の生成物が得られた。

## 9-アセトアミド-ミノサイクリン

## 【0077】

1.5 mLの1,3-ジメチル-2-イミダゾリジノンに9-アミノ-ミノサイクリン硫酸(100 mg、0.175 mmol)を攪拌した溶液に、0.05 mLのアセチル・クロリドを伴う100 mgの重炭酸ナトリウムが加えられた。その混合物は室温で45分間攪拌され、その後、150 mLの冷たいエーテルの中に攪拌しながら注入された。分離された固形物がフィルターにより抽出され、真空下で乾燥され、そして、165 mgの生成物が得られた。

## 4-dedimethylamino-ミノサイクリン

## 【0078】

高純度のミノサイクリン(175 mg、0.38 mmol)が2 mLのTHFに溶かされ、その後、0.43 mLのヨウ化メチルが加えられた。生成物の結晶は生じなかった。生成された混合物が集められ、そして、エーテル/石油エーテルの40:60の冷たい混合物(200 mL)に掻き混ぜながら注入された。分離された生成物がフィルタにより抽出され、真空下で乾燥され、その生成物はさらに3日間反応条件に置かれ、その後、前のようにエーテルに析出させ、そして、123 mgのミノサイクリン=ヨウ化メチルが得られた。その粗生成物(crude product)が2 mLの酢酸に溶かされ、そして、2 mLの水と60 mgの亜鉛ダストが攪拌しながら加えられた。15分後、その亜鉛粉がフィルタにより抽出された。濾過液は、濃塩酸溶液を含む15 mLの水で希釀された。有機抽出物は硫酸マグネシウムで乾燥され、集められた。分離された固形物はフィルタにより抽出され、真空下で乾燥され、150 mgの黄色の生成物が得られた。

## 4-dedimethylamino-9-ニトロ-ミノサイクリン

## 【0079】

4-dedimethylamino-ミノサイクリン(415 mg、1 mmol)が30 mLの濃硫酸に室温で溶かされた。その溶液はアイスバスで冷却され、硝酸カリウム(110 mg、1.09 mmol)が攪拌しながら加えられた。生成された混合物は、15分間攪拌された後、300 mLの冷たいエーテルに攪拌しながら注入された。分離された生成物がフィルタにより抽出され、冷たいエーテルで洗浄され、真空下で乾燥された。LC/MSは出発物質の不完全なconversionを示す。そして、生成物は、15 mLの濃硫酸に溶かされ、50 mgの硝酸カリウムが0で加えられ、生成された混合物が45分間攪拌された。生成物は前と同様に分離され、542 mgの生成物が得られた。

## 7,9-ジブロモ sancycline

## 【0080】

1.5 mLの濃硫酸に0でsancycline(50 mg、0.12 mmol)が攪拌された溶液に、42 mgのN-ブロモサクシンイミド(N-bromosuccini

10

20

30

40

50

middle) が加えられた。30分後、生成された混合物は、60mLの冷たいエーテルの中に攪拌しながら注入された。分離された固体がフィルタにより抽出され、真空下で乾燥され、そして、70mgの黄色の生成物が得られた。

#### 7 - ニトロと 9 - ニトロ - sancycline の混合

##### 【0081】

1.5mLの濃硫酸に0で sancycline (40mg、0.09mmol) が攪拌された溶液に、10mgの硝酸カリウムが加えられた。20分後、生成された混合物は、50mLの冷たいエーテルの中に攪拌しながら注入された。分離された固体がフィルタにより抽出され、真空下で乾燥され、そして、59mgの生成物が得られた。LC/MSは、1.6:1の割合の2つのモノニトロ生成物を示す。

##### 【0082】

本発明のさらなるテストにおいて、異なる10の微生物株により、5つのテスト生成物(プロダクト)の最小発育阻止濃度(MIC)が評価された。その研究は、NCCLSドキュメントM7-A5 "Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically, Fifth Edition" に概略が述べられたMacro dilution Broth Methodの改良版を使って行われた、5つのテスト生成物のためのMIC評価である。各テスト生成物は、10の微生物株の試験用懸濁液試験用懸濁液を用いて2度づつ評価された。各生成物がテストに使用される前に、1000 $\mu$ g/mg, 160 $\mu$ g/mLの初期濃度を実現するために、sterile Mueller-Hinton Broth (MHB) にて希釀された。

生成物1;

テトラサイクリン誘導体

ロット・ナンバー: INN01182(MW615)

160 $\mu$ g/mLの初期濃度を実現するため、14.8mgの生成物が92.5mLのMHBに溶かされた。

生成物2;

テトラサイクリン誘導体

ロットナンバー: INN01183(MW627)

160 $\mu$ g/mLの初期濃度を実現するため、13.6mgの生成物が85.0mLのMHBに溶かされた。

生成物3;

テトラサイクリン誘導体

ロットナンバー: INN01185(MW655)

160 $\mu$ g/mLの初期濃度を実現するため、11.9mgの生成物が74.4mLのMHBに溶かされた。

生成物4;

テトラサイクリン誘導体

ロットナンバー: INN01189(MW625)

160 $\mu$ g/mLの初期濃度を実現するため、9.6mgの生成物が60.0mLのMHBに溶かされた。

生成物5;

テトラサイクリン誘導体

ロットナンバー: INN01195(MW643)

160 $\mu$ g/mLの初期濃度を実現するため、13.8mgの生成物が86.25mLのMHBに溶かされた。

##### 【0083】

テストを行う約48時間前に、トリプチック・ソイ・プロス(Tryptic Soy Broth)の分離された無菌のチューブは、下の表1に示されるような感染微生物がそれぞれ入れられた凍結乾燥薬瓶から接種された。そのプロス培養は、35°±2で約24時間放置された

。上述のようにして用意されたプロス培養は、ペトリ・プレートに入れられたトリプチック大豆培地の表面に接種され、35°±2で約24時間放置された。このようにして、培養プレートの表面には細菌の“芝地”が作られた。それは、試験用懸濁液を用意するために使われた。

【0084】

テストを開始する前に、約 $1.0 \times 10^9$  CFU/mLを含む、最初の試験用懸濁液が、各微生物のために用意された。その試験用懸濁液は、上述のように用意された、固体メディアのプレートから採取された細菌を塩化ナトリウムの流下されるテスト・チューブに混入することにより作成された。約 $1.0 \times 10^6$  CFU/mLを含む、最後の試験用懸濁液が、各微生物種のために用意された。この懸濁液は、200mLのミューラー・ヒントン・プロスが入れられた、滅菌された250mLのポリプロピレン・ボトルに $1.0 \times 10^9$  CFU/mLの懸濁液の0.2mLのアリコートを入れることにより作成された。最後の試験用懸濁液はテストに使用される前に攪拌された。最後のプレートにおける希釈度は $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ , 及び $10^{-5}$ であった。これらのプレートは、十分な成長が観察されるまで(表1)、35°±2で培養された。

【0085】

培養に続いて、プレートの上のコロニーが、手押し式のカウンタを使って手動でカウントされた。30から300CFUレンジの中の数が、計算に用いられた。

初期の細菌数(CFU/mL)は、各試験用懸濁液について次のように計算された。

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

10

ここで、

$C_i$  = カウントされた2プレートの平均

$D$  = 使用された培養菌数(プレートカウント)の希釈率

チューブの細菌数(CFU/mL)、各試験用懸濁液について次のように計算された。

$$CFU/mL = (C_i \times 10^{-D}) / 2$$

ここで、

$C_i$  = カウントされた2プレートの平均

$D$  = 使用されたプレートカウントの希釈率

【0086】

テストの手順は次の通りである。: 30mLのミューラー・ヒントン・プロスのアリコートが無菌のボトルに入れられた。30mLの生成物(160μg/mLの初期濃度)のアリコートが、11の一連の無菌ボトルの一番目に入れられた。それぞれは、30mLのミューラー・ヒントン・プロスが入れられ、生成物の1:2(v/v)の希釈度を実現するために十分にかき混ぜられた。1本の30mLアリコートが上述のように用意されたボトルから取り除かれて、1:2(v/v)の希釈度に用いられ、残りの10本のボトルが一連の希釈度のために使用された(製造時の希釈度が1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512, 1:1, 024、及び1:2, 048)。それぞれは30mLのミューラー・ヒントン・プロスを含む。各ボトルは、次の連の希釈度のために30mLアリコートが取り除かれる前に十分に混合された。用意された各製造時希釈度の1.0mLアリコート、及び最初の製造調合剤(160μg/mLの生成濃度)の1.0mLアリコートは、分離された無菌のチューブに移された。それぞれが1.0mLの製造時希釈度(1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512, 1:1, 024、及び1:2, 048)を含む12のチューブが用意された。

30

【0087】

最後の製造時希釈度が、1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512, 1:1, 024, 1:2, 048及び1:4, 096で、試験用微生物が約 $5.0 \times 10^5$  CFU/mLをそれぞれ含む合成希釈試験管を得るために、約 $1.0 \times 10^6$  CFU/mLを含む懸濁液の、1.0mLアリコートが、各製造時希釈度の一連の試験管チューブに入れられた。これは、最後の生成濃度が80μg/

40

50

mL から 0.039 μg / mL の幅にあることを示している。上述した実験の手順は、各微生物（表1）のテストのために、各生成物につき2度実行された。1.0mL の Mueller-Hinton Broth (MHB) のアリコート、及び 1.0mL の試験用懸濁液のアリコートを含む積極的に成長制御を行う試験管が、各微生物（表1）のために用意された。また、微生物の接種が行われていない、無菌の、成長制御を行わない、ミユーラー・ヒントン・プロスの入った試験管も用意された。

#### 【0088】

各製造時希釈度の 1.0mL アリコートを、別に用意された無菌のテスト・チューブに移すことにより、各生成物について試験管の依存度を制御した。1.0mL の無菌の Mueller-Hinton Broth (MHB) のアリコートが、各製造時希釈度の試験管に入れられ、ボルテックミキサーを使用して十分に混合された。こうして、上述したものとの同一の、最後の一連の製造時希釈度のものが出来た。試験用懸濁液 / 製造時希釈度の試験管、及び制御用試験管は、積極制御の試験管で良い成長が現れるまで、35° ± 2 で 20 時間培養された。10

#### 【0089】

培養に続いて、各チューブにおける微生物の成長が調べられた。濁り具合に基づいて目視で決定された。

#### 【0090】

各試験用微生物における各試料品の最小発育阻止濃度 (MIC) は、肉眼にて、微生物の成長を完全に抑制できた試料品の内、最高の希釈度が記録された。各試料品の各微生物に対する 2 つの結果は記録され、平均値が計算され、最終的な報告値が求められた。20

#### 【表1】

微生物の種類	ATCC#	培養時間* (MIC試験管)	培養温度*	培地
腸球菌 Enterococcus faecalis	29212	20時間	35° ± 2 °C	TSB/TSA/MHB
大腸菌 Escherichia coli	25922	20時間	35° ± 2 °C	TSB/TSA/MHB
大腸菌 Escherichia coli (Tetracycline Resistant)	51657	20時間	35° ± 2 °C	TSB/TSA/MHB
大腸菌 Escherichia coli (Tetracycline Resistant)	51658	20時間	35° ± 2 °C	TSB/TSA/MHB
大腸菌 Escherichia coli (Tetracycline Resistant)	51659	20時間	35° ± 2 °C	TSB/TSA/MHB
黄色ブドウ球菌 Staphylococcus aureus (Tetracycline Resistant)	27217	20時間	35° ± 2 °C	TSB/TSA/MHB
黄色ブドウ球菌 Staphylococcus aureus (Tetracycline Resistant)	27659	20時間	35° ± 2 °C	TSB/TSA/MHB
黄色ブドウ球菌 Staphylococcus aureus (Tetracycline Resistant)	27660	20時間	35° ± 2 °C	TSB/TSA/MHB
黄色ブドウ球菌 Staphylococcus aureus	29213	20時間	35° ± 2 °C	TSB/TSA/MHB

10

20

30

40

\* = 35° ± 2° で約72時間培養する前に、最初のプレート群は、室温(20° - 27°C)で約48時間培養した。

### 【 0 0 9 1 】

表2は、各試料と10の試験用微生物それぞれについて製造時希釀度として示された最小発育阻止濃度を示す。表3は、各試料と各10の試験用微生物について製造時濃度(μg / mL)として示された最小発育阻止濃度を示す。各生成物の溶液の初期濃度は、1000 μg / mg、160 μg / mLの濃度を基準にしている。

### 【表2】

微生物の種類	ATCC#	最小発育阻止濃度 (Product Dilutionとして示された)				
		product #1	product #2	product #3	product #4	product #5
腸球菌 <i>Enterococcus faecalis</i>	29212	<1:2	1:16	1:16	1:02	1:08
大腸菌 <i>Escherichia coli</i>	25922	1:02	<1:2	<1:2	<1:2	1:02
大腸菌 <i>Escherichia coli</i> (Tetracycline Resistant)	51657	<1:2	<1:2	<1:2	<1:2	<1:2
大腸菌 <i>Escherichia coli</i> (Tetracycline Resistant)	51658	<1:2	<1:2	<1:2	<1:2	<1:2
大腸菌 <i>Escherichia coli</i> (Tetracycline Resistant)	51659	<1:2	<1:2	<1:2	<1:2	<1:2
緑膿菌 ( <i>Pseudomonas aeruginosa</i> )	27853	<1:2	<1:2	<1:2	<1:2	<1:2
黄色ブドウ球菌 <i>Staphylococcus aureus</i> (Tetracycline Resistant)	27217	<1:2	1:32	1:32	1:08	1:16
黄色ブドウ球菌 <i>Staphylococcus aureus</i> (Tetracycline Resistant)	27659	<1:2	1:32	1:24	1:08	1:16
黄色ブドウ球菌 <i>Staphylococcus aureus</i> (Tetracycline Resistant)	27660	<1:2	1:32	1:16	1:08	1:32
黄色ブドウ球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	29213	1:08	1:32	1:32	1:08	1:32

10

20

30

40

【表3】

微生物の種類	ATCC#	最小発育阻止濃度 (Product Dilutionとして示された)				
		product #1	product #2	product #3	product #4	product #5
腸球菌 Enterococcus faecalis	29212	>80	10	10	80	20
大腸菌 Escherichia coli	25922	80	>80	>80	>80	80
大腸菌 Escherichia coli (Tetracycline Resistant)	51657	>80	>80	>80	>80	>80
大腸菌 Escherichia coli (Tetracycline Resistant)	51658	>80	>80	>80	>80	>80
大腸菌 Escherichia coli (Tetracycline Resistant)	51659	>80	>80	>80	>80	>80
緑膿菌 (Pseudomonas aeruginosa)	27853	>80	>80	>80	>80	>80
黄色ブドウ球菌 Staphylococcus aureus (Tetracycline Resistant)	27217	>80	5	5	20	10
黄色ブドウ球菌 Staphylococcus aureus (Tetracycline Resistant)	27659	>80	5	6.67	20	10
黄色ブドウ球菌 Staphylococcus aureus (Tetracycline Resistant)	27660	>80	5	10	20	5
黄色ブドウ球菌 Staphylococcus aureus	29213	20	5	5	20	5

10

20

30

40

50

## 【0092】

さらなる研究で、悪性腫瘍の成長や転移に必要とされるマトリックス金属プロテアーゼ (matrix degrading metalloproteinases, MMPs) の抑制剤としての、本発明におけるテトラサイクリンの誘導体の活性が調査された。その研究は、老齢の雄ラットの背部前立腺 (dorsal prostate) からのオリジナルな前立腺腫瘍から転移した、移植腫瘍から Copenhagen ラットに出来た、Dunning の MAT-LyLu の腫瘍モデルを使用した。その MAT-LyLu 腫瘍は、注入されるとリンパ節や肺に自然に転移し、受血動物の約 80 - 100 % で骨転移が生ずる。2 % カルボキシメチルセルロースの中に 10 mg / ml の各テスト品を含有する、新鮮な服用液が毎日用意され、テストで使用された。

## 【0093】

その研究は、最初は、腫瘍の無い5体の軟体動物のグループ2つ(2つのテトラサイクリン類似体(9-アミノ-ドキシサイクリンと、9-ニトロ-ドキシサイクリン)が、毎日40mg/kgの割合で7日間、それぞれに与えられた)について毒性を評価した。

## 【0094】

3グループの動物(1グループ10匹)は、3週間の間は毎日、そしてその後は、死ぬかsacrifice(犠牲になる)まで、毎週3度、基材か、又は前記2つの類似体の内の1つが、胃管栄養法(gavage)により投薬された。投薬は、尾静脈への注入によりM A T LyLu腫瘍細胞の着床が見られるまでは7日間行った。約0.1mlの腫瘍細胞懸濁液(tumor cell suspension)が、外側尾静脈(lateral tail veins)の1つに注入された。選択される投薬は、2つの因子に基づく。(1)効き目、(2)前記類似体に関連のある病性。次の表(下の表4)は、非投与群及び投与群に関して生存時間と動物達の毎週の体重を示す。その表に示されるように、9-アミノ-ドキシサイクリン及び9-ニトロ-ドキシサイクリンは腫瘍着床後の生存数において著しい増加を示しているが、非投与群と比較しても体重の変化は見分けが付かないという結果になっている。

## 【表4】

腫瘍移植の日数	生存数		
	9-アミノ-ドキシサイクリン	9-ニトロ-ドキシサイクリン	非投与
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

## 【0095】

さらなる研究において、MMPsの抑制活性が、種々のテトラサイクリン誘導体による種々の癌の阻害パーセントと同様に評価された。結果は、下記の表5-1~7に示す。そして、本発明の治療の有効性を示す。その研究の1つの目的は、MMP1, 2, 3, 7, 9, 14を含む、精製されたヒト・マトリックス・メタロプロテアーゼ(human matrix metalloproteinases)の抑制剤として、一連のテトラサイクリン誘導体を評価することである。テトラサイクリン誘導体は、mM- $\mu$ Mレンジにお

10

20

30

40

50

いては効果的な抑制剤であった。

#### 実験的プロトコル

##### 1. テトラサイクリンによるMMP1(コラゲナーゼ-1)の抑制を測定するためのプロトコル

MMP1活性は、<sup>14</sup>Cアセチル化されたラット・スキンのI型コラーゲン (Methods in Enzymology 80711, 1981) からの、可溶性の<sup>14</sup>Cで標識されたコラーゲン断片のリリースにより決定された。

分析成分；

100 µg <sup>14</sup>Cで標識されたラット・スキンのI型コラーゲン (5-6000 dpm)

10

50 mM トリス・塩酸 (pH 7.9)

15 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.02% azide

ヒト組換えMMP1, 3-4 nM

300 µlのトータルボリュームの中の、±Tetracycline (1 mM以上)

【0096】

35で5時間培養した。分解されていないコラーゲン線維（最初の10分以内に形成される）が、10,000g、4、10分の遠心分離により取り除かれた。200 µlの上澄みが、シンチレーション・カウンターを使ってパッカード・オプティ・フェーズ・スーパー・ミックス・シンチレーション液 (Packard Opti Phase Supermix scintillation fluid) で測定された。分析の直線部分 (10-70% コラーゲン分解) から引き出したデータだけが使われた。MMP1活性の抑制パーセントに基づき、各テトラサイクリンのためのIC50値が回帰分析により計算された。

##### 2. MMP2 (Gelatinese A) の抑制を測定するためのプロトコル

MMP2活性は、<sup>14</sup>Cアセチル化されたラット・スキンのI型ゼラチン (Methods in Enzymology 248, 470, 1995. Biochem. J. 195, 1981) からの可溶性の断片、トリクロロ酢酸 (TCA) のリリースにより決定された。

分析成分；

100 µg <sup>14</sup>Cで標識されたゼラチン (20分間60で変成されたI型コラーゲン)

30

50 mM トリス・塩酸 (pH 7.9)

15 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.02% azide

ヒト組換えMMP1, 0.1-0.5 nM

250 µlのトータルボリュームの中の、±Tetracycline (1 mM以上)

【0097】

37で16時間培養した。冷却すると共に、50 µlの冷たい90% (w/v) のトリクロロ酢酸を注意深くかき混ぜながら加えることにより反応を停止させた。4で15分間のTCA沈殿 (TCA precipitation) が、10000g 10分4の遠心分離を行う前に行われた。200 µlのTCAの上澄みが、シンチレーション・カウンティング (パッカード・オプティ・フェーズ・スーパー・ミックス・シンチレーション液; Packard Opti Phase Supermix scintillation fluid) による放射能測定のために採取された。分析の直線部分 (10-70% コラーゲン分解) から引き出したデータだけが使われた。MMP2活性の抑制パーセントが、回帰分析によりIC50値を引き出すためにプロットされた。

##### 3. MMP3 (ストロメリシン1) の抑制を測定するためのプロトコル

MMP3活性は、Methods in Enzymology 248, 451, (1995) にて説明されている、<sup>14</sup>Cアセチル化されたカゼイン (シグマ) からの可溶性の断片、トリクロロ酢酸 (TCA) のリリースにより決定された。

分析成分；

40

50

100 µg  $^{14}\text{C}$  カゼイン (7000 dpm)

50 mM トリス - 塩酸 (pH 7.9)

15 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.02% azide

ヒト組換え MMP3, 0.25-1.0 nM

250 µl のトータルボリュームの中の、 $\pm$  Tetracycline (1 mM以上)

【0098】

37で16時間培養した。500 µl の冷たい18% TCAを加えて、氷に15分間乗ることにより反応は停止した。TCA沈殿 (TCA precipitation) が、10000 g、4で10分の遠心分離により取り除かれた。200 µl の上澄みが、シンチレーション・カウンティングのために採取された。分析の直線部分 (10-60% 10 コラーゲン分解) から引き出したデータだけが使われた。MMP3活性の抑制パーセントが、回帰分析によりIC50値を引き出すためにプロットされた。

4. MMP7 (マトリライシン) の抑制を測定するためのプロトコル

MMP7活性は、Methods in Enzymology 248, 451, (1995) にて説明されている、 $^{14}\text{C}$ アセチル化されたカゼイン (シグマ) からの可溶性の断片、トリクロロ酢酸 (TCA) のリリースにより決定された。

分析成分：

100 µg  $^{14}\text{C}$  カゼイン (7000 dpm)

50 mM トリス - 塩酸 (pH 7.9)

15 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.02% azide

ヒト組換え MMP7, 1.5 nM

250 µl のトータルボリュームの中の、 $\pm$  Tetracycline (1 mM以上)

【0099】

37で16時間培養した。500 µl の冷たい18% TCAを加えて、氷に15分間乗ることにより反応は停止した。TCA沈殿 (TCA precipitation) が、10000 g、4で10分の遠心分離により取り除かれた。200 µl の上澄みが、シンチレーション・カウンティングのために採取された。分析の直線部分 (10-60% 20 コラーゲン分解) から引き出したデータだけが使われた。MMP7活性の抑制パーセントが、IC50値を引き出すためにプロットされた。

5. MMP9 (ゼラチナーゼ B) の抑制を測定のためのプロトコル

MMP9活性は、 $^{14}\text{C}$ アセチル化されたラット・スキンのI型 (Methods in Enzymology 248, 470, 1995. Biochem. J. 195, 1981) からの可溶性の断片、トリクロロ酢酸 (TCA) のリリースにより決定された。

分析成分：

100 µg  $^{14}\text{C}$ で標識されたゼラチン (20分間 60 で変成されたコラーゲン)

50 mM トリス - 塩酸 (pH 7.9)

15 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.02% azide

ヒト組換え MMP9, 1.2-2 nM

250 µl のトータルボリュームの中の、 $\pm$  Tetracycline (1 mM以上)

【0100】

37で16時間培養した。その培養は、冷却しつつ、50 µl の冷たい90% (w/v) のトリクロロ酢酸を注意深くかき混ぜながら加えることにより停止した。15分4のTCA沈殿 (TCA precipitation) が行われ、次に10000 g 10分4の遠心分離を行った。200 µl のTCAの上澄みが、シンチレーション・カウンティング (パックカード・オプティ・フェーズ・スーパーミックス・シンチレーション液; Packard Opti Phase Supermix scintillation fluid) による放射能測定のために採取された。分析の直線部分 (10-70% 40 コラーゲン分解) から引き出したデータだけが使われた。MMP9活性の抑制パーセントが、IC50値を引き出すためにプロットされた。

6. テトラサイクリン誘導体による MMP14 (MTI-MMP) の抑制を測定するため

10

20

30

40

50

## のプロトコル

MMP14活性は、<sup>14</sup>Cアセチル化されたラット・スキンのI型コラーゲン (Methods in Enzymology 80, 711, 1981) からの可溶性の<sup>14</sup>Cで標識されたコラーゲン断片のリリースにより決定された。

分析成分；

100 µg <sup>14</sup>Cで標識されたコラーゲン (5 - 6000 dpm)

50 mM トリス・塩酸 (pH 7.9)

15 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.02% azide

ヒト組換えMMP14, 50 - 100 nM

250 µl のトータルボリュームの中の、±Tetracycline (1 mM以上) 10

### 【0101】

35で15時間培養した。分解されていないコラーゲン線維（最初の10分以内に形成される）が、10,000g、4、10分の遠心分離により取り除かれた。200 µl の上澄みが、シンチレーション・カウンターを使ってパックカード・オブティ・フェーズ・スーパーミックス・シンチレーション液 (Packard Opti Phase Supermix scintillation fluid) にて測定された。分析の直線部分 (10 - 70% コラーゲン分解) から引き出したデータだけが使われた。MMP1活性の抑制パーセントに基づき、各テトラサイクリンのためのIC50値が計算された。

### 【0102】

別の目的は、テトラサイクリン誘導化合物 (tetracycline derived compounds) の効果を、生体外での化学浸潤ポテンシャルにおいて分析することであった。

C8161 ヒトメラノーマ細胞

MDA-MB-231 ヒト乳癌細胞

PC3 ヒト前立腺癌細胞

RPMI8226 ヒト骨髄腫癌細胞

Ark ヒト骨髄癌細胞

Arp-1 ヒト骨髄癌細胞

### 【0103】

膜浸潤培養システム (Membrane Invasion Culture System; MICS) の、生体外での化学浸潤分析 (chemo-invasion assay) は、テトラサイクリン誘導化合物 (tetracycline derived compounds) に応答する、ヒト癌細胞の浸潤ポテンシャルの変化を測定するためを選ばれた。各合成物の標準溶液 (Stock solution) は、2%のDMSOを含むpH 10.0の水に水和された。可溶化することにより、7.5 - 8.0のpHにするために、その溶液に塩酸が加えられた。この溶液は、ホイルでラップされて、分析の24時間の間、4に保持された。各分析のために、フレッシュな合成物が用意された。腫瘍細胞侵襲性 (tumor cell invasiveness) のための生体外化学浸潤解析 (chemoinvasion analyses) が、上述したMICSを使って行われる。

MICSシステムは、熱的に処理されたプラスチック・マニフォールド・システムであり、直径が13 mmの、14個のウェル (wells) を有するプレート2枚を合わせたものである。これらのプレートの間に挟まるのはポリカーボネート・フィルターである。そのフィルターは、10 µmの細孔を有し、MICSのウェル (wells) のトップとボトム・セクションとの間に35 µm厚さのバリアを形成するヒト・ラミニン / コラーゲンIV / ゼラチンからなる所定の基質で被覆されている。このバリアを所々に配置する前に、下方のウェルを0.45 µmの無菌フィルターにより濾過されるか、遠心分離されることにより、細胞及び細胞片が除去された人間の纖維芽細胞を、2日間培養することにより得られた培地に調整された、作られた50%の無血清RPMI培地で満たす。その後、バリアは、下方のウェル上に配置され、フレッシュな無血清培地は、システムの組み立て

後に上方のウェルに付加された。5万個の腫瘍細胞が合成物の存在する、又は、D M S O 媒質（制御用）のウェル（w e l l s ）に加えられた。それぞれのマニフォールドの12の組み合わせウェルの内、無作為に抽出されたいずれか3個のウェル（w e l l s ）は制御用として機能し、3個のウェル（w e l l s ）は合成物の1 $\mu$ g / m lを受け取り、3個のウェル（w e l l s ）は10 $\mu$ g / m lを受け取り、3個のウェル（w e l l s ）は25 $\mu$ g / m lを受け取る。24時間後、細胞と媒地は下方のウェルから取り除かれ、2mM E D T Aの付加されたリン酸塩により置き換えられた。この溶液は下方のウェルから全ての細胞を取り除くために使用された。この洗浄は、同じウエルから回収された細胞と培地に対しても行われる。これらのサンプルはD o t - B l o t マニフォールドシステムを使用する3 $\mu$ mの細孔を含むポリカーボネイト薄膜を有するポリリシン（polylysine）上に集められる。これらの収集フィルターはメタノール内に固定され、現場でW r i g h t 染色（Leukostat staininig kit）を用いて染色される。これらのフィルターは（細孔からの光の反射を減少させる）顕微鏡浸潤オイルを用いて、顕微鏡のスライド上にマウントされ、5つの顕微鏡視野が集計され、24時間以上の期間で薄膜を介して進入した細胞の数を計算する。これらの数は、以下に議論するように、統計的に分析された。

【表5-1】

化合物 No.	マトリックス・メタロプロテアーゼ (MMP s) <sup>-1</sup> の抑制活性						評価されたヒト細胞の種類、及び 阻害ペーセント					
	MMP-1	MMP-2	MMP-3	MMP-7	MMP-9	MMP-14	乳 MDA-MB-231	メラノーマ C8161	骨髄腫 RPMI-8226	前立腺 PC-3 ML		
1	267	>700	258	815	43	86	7B 20B 25B 25B	5 20 35B 40B 49B 56B	20 10 15 21B 21B 29B	2 47B 60B 13B 24B 24B		
2	479	80	348	>1000	117	119	20 15 30B	20B 25B 27B	+8 +10B +11 1B +4B 7B	20 8 15 20 8 15		
3	>1000	>1000	304	>1000	136	216	+8 +2 12	30B 22B 15B	+7 +23B 27B +22 +3 +24B	3 +1 25B 3 +1 25B		
4	409	421	219	278	36	61	5 6 2	27B 24B 17	+4 +5 +14	10 +8 3		
5	647	86	237	441	194	447	6 +4 46B	15 27B 35B	6 4 36 17 37B 42B	44B 35 46B 13 32B 30B		
6	394	135	241	>1000	83	56	+5 +17B 27B 24 44B 42B	18 33B 32B 8 21B 33B	+6 +25B +5 12B 10 5	21 26 41B 13 32B 30B		
7	R(5)	>1000	300	335	64	>1000	+18 +41B +27	7 14 16	+14B 12 +2	0 0 3		
8	>1000	599	232	388	>1000	>1000	+10 +5 +13	13B 41B 40B	11 3 +2	0 +4 0		
9	372	337	154	507	28	29						

化合物 No.	マトリックス・メタロプロテアーゼ (MMP s) <sup>-1</sup> の抑制活性						評価されたヒト細胞の種類、及び 阻害ペーセント			
	MMP-1	MMP-2	MMP-3	MMP-7	MMP-9	MMP-14	乳 MDA-MB-231	メラノーマ C8161	骨 髄腫 RPMI-8226	前立 腺 PC-3 ML
10	499	484	96	>1000	41	53	9 27 <sup>B</sup> 37 <sup>B</sup> +5 0 8	21 22 11 7 28 <sup>B</sup> 30 <sup>B</sup>	3 5 29 <sup>B</sup> 9 16 5	40 <sup>B</sup> 50 <sup>B</sup> 65 <sup>B</sup>
11	427	>1000	270	>1000	96	46	6 15 36 <sup>B</sup> >1000	16 46 <sup>B</sup> 41 <sup>B</sup> +11 +13 +12	+3 0 36 <sup>B</sup>	
12	>1000	>1000	390 <sup>2</sup>	503	270					
13	126	48	206	>1000	64	14	4 0 +9	6 12 14	+11 +13 +12	8 23 <sup>B</sup> 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				

化合物 No.	マトリックス・メタロプロテアーゼ (MMPs) <sup>1</sup> の抑制活性						評価されたヒト細胞の種類、及び 阻害パーセント			
	MMP-1	MMP-2	MMP-3	MMP-7	MMP-9	MMP-14	乳 MDA-MB-231	メラノーマ C8161	骨髓腫 RPMI-8226	前立腺 PC-3 ML
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 <sup>B</sup>	0 +1 73	24 <sup>B</sup> 6 42 <sup>B</sup>	17 <sup>B</sup> 35 <sup>B</sup> 70
28	>1000		>1000	231	125	49	+24 +36 <sup>B</sup> 54 <sup>B</sup>	+20 34 <sup>B</sup> 40 <sup>B</sup>	4 +10 34 <sup>B</sup>	7 +11 <sup>B</sup> 80

化合物 No.	マトリックス・メタプロテアーゼ (MMPs) <sup>1</sup> の抑制活性					評価されたヒト細胞の種類、及び 阻害ノーパーセント				
	MMP-1	MMP-2	MMP-3	MMP-7	MMP-9	MMP-14	乳 MDA-MB-231	メラノーマ C8161	骨腫 RPMI-8226	前立腺 PC-3 ML
29	895	983	213		172	98	+41 <sup>B</sup> 7 +13 +25 <sup>B</sup> 17	59 <sup>B</sup> +20	61 <sup>B</sup> +10 +14 <sup>B</sup> 1	13 12 8 29 <sup>B</sup> 13 35 <sup>B</sup>
30	576	>1000	983		>1000	>1000				28 <sup>B</sup> 50 <sup>B</sup> 58 8 8 69
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 <sup>B</sup>	+1 20 69 <sup>B</sup>	10 5 69 <sup>B</sup>	11 26 36

化合物 No.	マトリックス・メタロプロテアーゼ (MMPs) <sup>1</sup> の抑制活性							評価されたヒト細胞の種類、及び 阻害ペーセント						
	MMP-1	MMP-2	MMP-3	MMP-7	MMP-9	MMP-14	MDA-MB-231	乳	メラノーマ	C8161	RPMI-8226	骨髄腫	前立腺	PC-3 ML
38	230	175	95		215	69	+17 37 <sup>B</sup>	70 <sup>B</sup>	3 1	66 <sup>B</sup>	33 <sup>B</sup> 13	+11	37 <sup>B</sup> 41 <sup>B</sup>	41
39	860	186	682		114	83	18 <sup>B</sup> 29 <sup>B</sup>	76 <sup>B</sup>	10 11	24	4 +49 <sup>B</sup>	+8	38 <sup>B</sup> 27 <sup>B</sup>	52
40	560	362	91		R	29	9 15	20 <sup>B</sup>	+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 <sup>B</sup> +5	+1	21 .. 7	10	7 +11	12	20 16	27 <sup>B</sup>

化合物 No.	マトリックス・メタプロテアーゼ (MMPs) <sup>-1</sup> の抑制活性					評価されたヒト細胞の種類、及び 阻害ペーセント				
	MMP-1	MMP-2	MMP-3	MMP-7	MMP-9	MMP-14	乳 MDA-MB-231	メラノーマ C8161	骨鰐腫 RPMI-8226	前立腺 PC-3 ML
47	318	117	68		88	60	+17 +16 <sup>B</sup> 0	+30 +4 +2	28 18 60 <sup>B</sup>	3 3 5
48	12831	1929	506		424	354				
49	372	1572	141		489	87	6 +5 +1	27 <sup>B</sup> 7 30 <sup>B</sup>	11 +2 15	4 +5 6
59	211	2533	48		34	40	7 0 2	5 +2 1	+14 +8 +13	+14 +17 +10
51							+15 <sup>B</sup> +18 25 <sup>B</sup>	+9 +31 <sup>B</sup> +122 <sup>B</sup>	14 +26 <sup>B</sup> +2	+4 +13 4
52	>1000	250	>1000	>1000	32	68	5 12 52 <sup>B</sup>	5 15 30	2 26 <sup>B</sup> 68 <sup>B</sup>	52 <sup>B</sup> 68 <sup>B</sup> 70 <sup>B</sup>
53							9 49 <sup>B</sup> 83 <sup>B</sup>	+40 <sup>B</sup> +158 <sup>B</sup> 83 <sup>B</sup>	+95 <sup>B</sup> 18 84 <sup>B</sup>	29 <sup>B</sup> 21 45 <sup>B</sup>

化合物 No.	マトリクス・メタロプロテアーゼ (MMP s) <sup>1</sup> の抑制活性						評価された細胞の種類、及び 阻害/ペーセント 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 <sup>B</sup> 21 <sup>B</sup> 29 <sup>B</sup>	+9 +13 1	9 +9 +8 13 8 17 <sup>B</sup>	
2	479	80	348	>1000	117	119	+8 +10 <sup>B</sup> +11 1 <sup>B</sup> +4 <sup>B</sup> 7 <sup>B</sup>	10 7 6	20 <sup>B</sup> 9 <sup>B</sup> 10	
3	>1000	>1000	304	>1000	136	216	+7 +23 <sup>B</sup> +27 <sup>B +22 +3 +24<sup>B</sup></sup>	+13 +1 +16	+11 +6 +15	
5	647	86	237	441	194	447	+6 4 36 17 37 <sup>B</sup> 42 <sup>B</sup>	+25 <sup>B</sup> 1 4 <sup>B</sup>	+7 22 <sup>B</sup> 21 <sup>B</sup>	
6	394	135	241	<1000	83	56	+6 +25 <sup>B</sup> +5 12 <sup>B</sup> 10 5	NE	12 0 8	
9	372	337	154	507	28	98	21 <sup>B</sup> 24 <sup>B</sup> 28 <sup>B</sup>	+14 +21 <sup>B</sup> 7	17 <sup>B</sup> 24 <sup>B</sup> 8	
10	499	484	96	>1000	41	53	3 5 29 <sup>B</sup>	NE	6 +7 1	
13	126	48	206	>1000	64	14	+11 +13 +12	NE	2 +7 1	

表5において:

<sup>A</sup> 1, 10及び2.5  $\mu$ g/mLの濃度が使用された。<sup>B</sup>の記号は、すなはち、P<0.05である。<sup>1</sup> 特に指定されなければ  $\mu$ Mの中の IC<sub>50</sub>

2 予報された。

+ = 増加している。

NE = 評価されなかつた。

R = 繰り返すこと (繰り返された回数)

表5 - 1 ~ 7 の化合物

1 ; 9 - ヒドロキシ - 5 - ヒドロキシテトラサイクリン H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

2 ; 9 - アミノ - 6 - デオキシ - 5 - ヒドロキシテトラサイクリン  $H_2SO_4$   
 3 ; 9 - イソプロピルアミノ - 6 - デオキシ - 5 - ヒドロキシテトラサイクリン  
 $H_2SO_4$   
 4 ; 7 - ジメチルアミノ - 6 - ジメチル - 6 - デオキシ - 9 - ニトロテトラサイク  
 リン  $H_2SO_4$   
 5 ; 2と同じ  
 6 ; 9 - アジド - 6 - デオキシ - 5 - ヒドロキシテトラサイクリン  $H_2SO_4$   
 7 ; 9 - アミノ - 7 - ジメチルアミノ - 6 - ジメチル - 6 - デオキシテトラサイク  
 リン  $H_2SO_4$   
 8 ; 9 - アセトアミド - 7 - ジメチルアミノ - 6 - ジメチル - 6 - デオキシテトラ 10  
 サイクリン  $H_2SO_4$   
 9 ; 7 - ジメチルアミノ - 6 - ジメチル - 6 - デオキシテトラサイクリン - 9 - ジ  
 アゾニウム  $H_2SO_4$   $HCl$   
 10 ; 9 - アジド - 7 - ジメチルアミノ - 6 - ジメチル - 6 - デオキシテトラサイ  
 クリン  $H_2SO_4$   
 11 ; 6 - デオキシ - 5 - ヒドロキシテトラサイクリン - 9 - ジアゾニウム  $H_2$   
 $SO_4$   
 12 ; 7 - アミノ - 6 - デオキシ - 5 - ヒドロキシテトラサイクリン  $H_2SO_4$   
 13 ; 7, 9 - ジブロモ - 6 - ジメチル - 6 - デオキシテトラサイクリン  $H_2S$  20  
 $SO_4$   
 14 ; 7 - アミノ - 6 - デオキシ - 5 - ヒドロキシ - 9 - ニトロテトラサイクリン  
 $H_2SO_4$   
 15 ; 7 - ジメチルアミノ - 6 - デオキシ - 5 - ヒドロキシ - テトラサイクリン  
 $H_2SO_4$   
 16 ; 9 - アセトアミド - 6 - デオキシ - 5 - ヒドロキシテトラサイクリン  $H_2$   
 $SO_4$   
 17 ; 7 - ジ - n - ブチルアミノ - 6 - デオキシ - 5 - ヒドロキシテトラサイクリ 30  
 $H_2SO_4$   
 18 ; 7 - ジ - n - ヘキシルアミノ - 6 - デオキシ - 5 - ヒドロキシテトラサイク  
 リン  $H_2SO_4$   
 19 ; 7 - ジ - (3, 3 - ジメチルブチル) アミノ - 6 - デオキシ - 5 - ヒドロキ  
 シテトラサイクリン  $H_2SO_4$   
 20 ; 7 - アジド - 6 - デオキシ - 5 - ヒドロキシテトラサイクリン  $H_2SO_4$   
 21 ; 6 - デオキシ - 5 - ヒドロキシテトラサイクリン - 7 - ジアゾニウム  $H_2$   
 $SO_4$   
 22 ; 7 - アセトアミド - 9 - ニトロ - 6 - デオキシ - 5 - ヒドロキシテトラサイ  
 クリン  $H_2SO_4$   
 23 ; 7 - アセトアミド - 6 - デオキシ - 5 - ヒドロキシテトラサイクリン  $H_2$   
 $SO_4$   
 24 ; 7 - ジ - n - ブロピルアミノ - 6 - デオキシ - 5 - ヒドロキシテトラサイク 40  
 リン  $H_2SO_4$   
 25 ; 7 - イソブチルアミノ - 6 - デオキシ - 5 - ヒドロキシテトラサイクリン  
 $H_2SO_4$   
 26 ; 7 - アセトアミド - 9 - アミノ - 6 - デオキシ - 5 - ヒドロキシテトラサイ  
 クリン  $H_2SO_4$   
 27 ; 7 - イソブチルメチルアミノ - 6 - デオキシ - 5 - ヒドロキシテトラサイク  
 リン  $H_2SO_4$   
 28 ; 6 - デオキシ - 5 - アセトキシ - テトラサイクリン  $H_2SO_4$   
 29 ; 7 - アセチルイソブチルアミノ - 6 - デオキシ - 5 - ヒドロキシテトラサイ 50  
 クリン  $H_2SO_4$

3 0 ; 7 - アセトアミド - 6 - デオキシ - 5 - ヒドロキシテトラサイクリン - 9 -  
 ジアゾニウム  $\text{H}_2\text{SO}_4$   
 3 1 ; 7 - ジメチルアミノ - 6 - デオキシ - 5 - ヒドロキシテトラサイクリン - 9  
 - ジアゾニウム  $\text{H}_2\text{SO}_4$   
 3 2 ; 7 - サイクロブチルアミノ - 6 - デオキシ - 5 - ヒドロキシテトラサイクリン  
 $\text{H}_2\text{SO}_4$   
 3 3 ; 7 - サイクロブチルメチルアミノ - 6 - デオキシ - 5 - ヒドロキシテトラサイクリン  
 $\text{H}_2\text{SO}_4$   
 3 4 ; 4 - Dedimethylamino - 6 - デオキシ - 5 - ヒドロキシテトラサイクリン 10  
 3 5 ; 4 - Dedimethylamino - 6 - デオキシ - 5 - ヒドロキシテトラサイクリン  
 3 6 ; 9 - アミノ - 4 - dedimethylamino - 6 - デオキシ - 5 - ヒドロキシテトラサイクリン 硫酸  
 3 7 ; 4 - Dedimethylamino - 6 - デオキシ - 5 - ヒドロキシテトラサイクリン - 9 - ジアゾニウム 硫酸  
 3 8 ; 7 - ニトロ - 9 - tertブチル - 6 - デオキシ - 5 - ヒドロキシテトラサイクリン  
 $\text{H}_2\text{SO}_4$   
 3 9 ; 9 - tertブチル - 6 - デオキシ - 5 - ヒドロキシテトラサイクリン H 20  
 $\text{SO}_4$   
 4 0 ; 7 - ニトロ - 9 - tertブチル - 4 - dedimethylamino - 6 - デオキシ - 5 - ヒドロキシテトラサイクリン  $\text{H}_2\text{SO}_4$   
 4 1 ; 4 - Dedimethylamino - 7 - ジメチルアミノ - 6 - ジメチル - 6 - デオキシテトラサイクリン  $\text{H}_2\text{SO}_4$   
 4 2 ; 7 - アセチルアミノ - 9 - アジド - 6 - デオキシ - 5 - ヒドロキシテトラサイクリン  
 4 3 ; 9 - tertブチル - 6 - デオキシ - 5 - ヒドロキシテトラサイクリン - 7  
 - ジアゾニウム  $\text{H}_2\text{SO}_4$   
 4 4 ; 7 - アミノ - 9 - tertブチル - 6 - デオキシ - 5 - ヒドロキシテトラサイクリン 30  
 $\text{H}_2\text{SO}_4$   
 4 5 ; 7 - アジド - tertブチル - 6 - デオキシ - 5 - ヒドロキシテトラサイクリン  
 $\text{H}_2\text{SO}_4$   
 4 6 ; 6 - デオキシ - 5 - ヒドロキシテトラサイクリン - 4 - ヨウ化メチル  
 4 7 ; 7 - (1, 2 - benzylcarboxyhydrazine) - 6 - デオキシ - 5 - ヒドロキシテトラサイクリン  $\text{HCl}$   
 4 8 ; 4 - Dedimethylamino - 7 - アミノ - 6 - デオキシ - 5 - ヒドロキシテトラサイクリン  $\text{H}_2\text{SO}_4$   
 4 9 ; 7 - アミノ - 9 - tertブチル - 4 - dedimethyl - 6 - デオキシ - 5 - ヒドロキシテトラサイクリン  $\text{H}_2\text{SO}_4$   
 5 0 ; 4 - Dedimethylamino - 9 - tertブチル - 6 - デオキシ - 5 - ヒドロキシテトラサイクリン - 7 - ジアゾニウム  $\text{H}_2\text{SO}_4$  40  
 5 1 ; 9 - (4 - フルオロフェニル) - 6 - デオキシ - 5 - ヒドロキシテトラサイクリン  
 5 2 ; 4 - エピ - クロロテトラサイクリン 塩酸  
 5 3 ; 6 - Dedimethyl - 6 - デオキシテトラサイクリン  $\text{HCl}$   
**【0104】**

一般的な実施例に関して本発明が述べられてきたが、その発明の多くの構成や変更は当業者にとって明白である。添付した特許請求の範囲や本発明は、そのような構成や変更の全てをカバーしていると解釈されるべきである。

## 【国際公開パンフレット】

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

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau(43) International Publication Date  
17 April 2003 (17.04.2003)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 03/030819 A2

(51) International Patent Classification: A61K

(81) Designated States (national): AE, AG, AI, AM, AT, AU,

(21) International Application Number: PCT/US02/31730

AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CI, CN, CO, CR, CU,

(22) International Filing Date: 4 October 2002 (04.10.2002)

CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GI,

(25) Filing Language: English

GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KU, KG, KP, KR, KZ, LC,

(26) Publication Language: English

LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,

(30) Priority Data: 60/327,502 5 October 2001 (05.10.2001) US

MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG,

(71) Applicant (for all designated States except US): TETRA-

SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,

GENEX PHARMACEUTICALS, INC. [US/US]; 1  
Maynard Drive, Park Ridge, NJ 07656 (US).

VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(72) Inventors; and

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GL, GM,

(75) Inventors/Applicants (for US only): HLAVKA, Joseph  
[US/US]; Tower Hill Road, Tuxedo Park, NY 10987 (US),  
ABLIN, Richard, J. [US/US]; 69 Buena Vista Drive,  
Ringwood, NJ 07656 (US).KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW);  
Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TU, TM);  
European patent (AL, BI, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,  
ES, IT, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SI, SK,  
TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,  
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).(74) Agent: PAIKOFF, Richard, A.; Duane Morris LLP, One  
Liberty Place, Philadelphia, PA 19103-7396 (US).Published:  
— without international search report and to be republished  
upon receipt of that reportFor two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-  
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-  
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 03/030819 A2

(54) Title: TETRACYCLINE DERIVATIVES AND METHODS OF USE THEREOF

(57) Abstract: A treatment for inhibiting microbial or tumor growth is disclosed, which comprises adding to a subject in need of treatment an effective amount of one or more tetracycline derivatives.

WO 03/030819

PCT/US02/31730

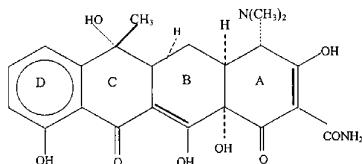
## TETRACYCLINE DERIVATIVES AND METHODS OF USE THEREOF

## FIELD OF INVENTION

[0001] The present invention relates to novel tetracycline derivatives, methods for producing the novel derivatives and methods of using these derivatives.

## 5 BACKGROUND OF THE INVENTION

[0002] The compound tetracycline, exhibits the following general structure



[0003] The numbering system of the ring nucleus is as follows:



[0004] Tetracycline as well as the 5-OH (Terramycin) and 7-Cl (Aureomycin) derivatives exist in nature, and are well known antibiotics. Natural tetracycline may be modified without losing their antibiotic properties, although certain elements of the structure must be retained. The modifications that may and may not be made to the basic tetracycline structure have been reviewed by Mitscher in *The Chemistry of Tetracyclines*, Chapter 6, Marcel Dekker, Publishers, New York (1978). According to 10 Mitscher, the substituents at positions 5-9 of the tetracycline ring system may be modified without the complete loss of antibiotic properties. Changes to the basic ring system or replacement of the substituents at positions 1-4 and 10-12, however, 15 generally lead to synthetic tetracyclines with substantially less or effectively no antimicrobial activity. Some examples of chemically modified non-antimicrobial

WO 03/030819

PCT/US02/31730

tetracyclines (hereinafter CMT) are 4-dedimethylaminotetracycline, 4-dedimethylaminosacycline (6-demethyl-6-deoxy-4-dedimethylaminotetracycline), 4-dedimethylaminominoacycline (7-dimethylamino-4-dedimethylaminotetracycline), and 4-dedimethylaminodoxycycline (5-hydroxy-6-deoxy-4-dedimethylaminotetracycline).

5 [0005] Some 4-dedimethylaminotetracycline derivatives are disclosed in U.S. Pat. Nos. 3,029,284 and 5,122,519. They include 6-demethyl-6-deoxy-4-dedimethylaminotetracycline and 5-hydroxy-6-deoxy-4-dedimethylaminotetracycline with hydrogen and other substituents at C7, and the C9 positions on the D ring. These substituents include amino, nitro, di (lower alkyl) amino, and mono (lower alkyl) 10 amino or halogen. The 6-demethyl-6-deoxy-4-dedimethylaminotetracycline derivatives and 5-hydroxy-6-deoxy-4-dedimethylaminotetracycline derivatives are said to be useful as antimicrobial agents.

[0006] Other 4-dedimethylaminotetracycline derivatives with an oxime group at the C4 position on the A ring are disclosed in U.S. Patent Nos. 3,622,627 and 15 3,824,285. These oxime derivatives have hydrogen and halogen as substituents at the C7 position and include 7-halo-6-demethyl-6-deoxy-4-dedimethylamino-4-oximinotetracycline, and 7-halo-5-hydroxy-6-deoxy-4-dedimethylamino-4-oximinotetracycline.

[0007] Alkylamino (NH-alkyl), and alkylhydrazone (N-NH-alkyl) groups have 20 been substituted on the A ring at the C4 position of 4-dedimethylaminotetracycline. These compounds are known for their antimicrobial properties. See U.S. Patent 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, and 3,829,453.

[0008] In addition to their antimicrobial properties, tetracyclines have been 25 described as having a number of other uses. For example, tetracyclines are also known to inhibit the activity of collagen destructive enzymes, such as matrix metalloproteinases (MMP), including collagenases (MMP-1), gelatinase (MMP-2) and stromelysin (MMP-3). Golub et al., *J. Periodont. Res.* 20:12-23 (1985); Golub et al. *Crit. Revs. Oral Biol. Med.* 2:297-322 (1991); U.S. Pat. Nos. 4,666,897; 4,704,383; 30 4,935,411; 4,935,412. Also, tetracyclines have been known to inhibit wasting and protein degradation in mammalian skeletal muscle, U.S. Pat. No. 5,045,538, and to enhance IL-10 production in mammalian cells.

WO 03/030819

PCT/US02/31730

[0009] Furthermore, tetracyclines were reported to enhance bone protein synthesis in U.S. Pat. No. Re. 34,656, and to reduce bone resorption in organ culture in U.S. Pat. No. 4,704,383.

[00010] Similarly, U.S. Pat. No. 5,532,227 to Golub et al, discloses that tetracyclines can ameliorate the excessive glycosylation of proteins. In particular, tetracyclines inhibit the excessive collagen cross linking which results from excessive glycosylation of collagen in diabetes.

[00011] Tetracyclines are known to inhibit excessive phospholipase A<sub>2</sub> activity involved in inflammatory conditions such as psoriasis as disclosed in U.S. Pat. No. 5,532,227. In addition, tetracyclines are also known to inhibit cyclooxygenase-2 (COX-2), tumor necrosis factor (TNF), nitric oxide and IL-1 (interleukin-1).

[00012] These properties cause the tetracyclines to be useful in treating a number of diseases. For example, there have been a number of suggestions that tetracyclines, including non-antimicrobial tetracyclines, are effective in treating arthritis. See, for example, Greenwald, et al. "Tetracyclines Suppress Metalloproteinase Activity in Adjuvant Arthritis and, in Combination with Flurbiprofen, Ameliorate Bone Damage," *Journal of Rheumatology* 19:927-938 (1992); Greenwald et al., "Treatment of Destructive Arthritic Disorders with MMP Inhibitors; Potential Role of Tetracyclines in Inhibition of Matrix Metalloproteinases: Therapeutic Potential," *Annals of the New York Academy of Sciences* 732:181-198 (1994); Kloppenburg, et al. "Minocycline in Active Rheumatoid Arthritis," *Arthritis Rheum* 37:629-636 (1994); Ryan et al., "Potential of Tetracycline to Modify Cartilage Breakdown in Osteoarthritis," *Current Opinion in Rheumatology* 8:238-247 (1996); O'Dell et al, "Treatment of Early Rheumatoid Arthritis with Minocycline or Placebo," *Arthritis Rheum* 40:842-848 (1997).

[00013] Tetracyclines have also been suggested for use in treating skin diseases. For example, White et al., *Lancet*, Apr. 29, p. 966 (1989) report that the tetracycline minocycline is effective in treating dystrophic epidermolysis bullosa, which is a life-threatening skin condition believed to be related to excess collagenase.

[00014] Furthermore, studies have also suggested that tetracyclines and inhibitors of metalloproteinases inhibit tumor progression, DeClerck et al., *Annals N.Y. Acad. Sci.*, 732:222-232 (1994), bone resorption, Rifkin et al., *Annals N.Y. Acad. Sci.*,

WO 03/030819

PCT/US02/31730

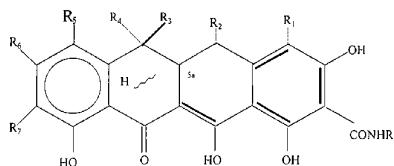
732:165-180 (1994), angiogenesis, Maragoudakis et al., *Br. J. Pharmacol.*, 111:894-902 (1994), and may have anti-inflammatory properties, Ramamurthy et al., *Annals N.Y. Acad. Sci.*, 732, 427-430 (1994).

[00015] Based on the foregoing, tetracyclines have been found to be effective in 5 treating numerous diseases and conditions. Therefore, there is a need for new and even more useful derivatives.

#### DESCRIPTION OF THE PREFERRED EMBODIMENTS

[00016] Compounds disclosed herein are derivatives of tetracycline, which exhibit 10 antimicrobial and/or anti-cancer activity.

[00017] In a preferred embodiment, the present invention relates to a treatment for inhibiting microbial or tumor growth which comprises adding to a subject in need of said treatment an effective amount of a tetracycline composition or salt thereof, comprising a general formula:



15

wherein R is selected from  $\text{CH}_2\text{N}(\text{R}_5\text{R}_6)$  or  $\text{CH}_2\text{N} \begin{array}{c} \diagup \\ \diagdown \end{array} \text{R}_c \text{X} \begin{array}{c} \diagdown \\ \diagup \end{array} \text{R}_d$ ;

20  $\text{R}_5\text{R}_6$  are  $\text{C}_1$  to  $\text{C}_6$  alkyl;  $\text{R}_c$  and  $\text{R}_d$  are  $(\text{CH}_2)_n \text{CHR}_e$ , n is 0 or 1 and  $\text{R}_e$  is H,  $\text{C}_1$  to  $\text{C}_6$  alkyl, or  $\text{NH}_2$ , and X is  $\text{NH}$ , S, or  $\text{CH}_2$ ;  $\text{R}_1$  is H or OH;  $\text{R}_2$  is H, OH,  $\text{O}$ , or  $\text{OCOR}_8$ , where  $\text{R}_8$  is  $\text{C}_1$  to  $\text{C}_6$  alkyl, or alternatively,  $\text{R}_2$  is  $\text{N}(\text{R}_9)_2$ , 25 where  $\text{R}_9$  is hydrogen or  $\text{C}_1$  to  $\text{C}_6$  lower alkyl, or  $\text{R}_9$  CO, with the proviso that when  $\text{R}_2$  is keto or  $\text{N}(\text{R}_9)_2$ , then  $\text{R}_3$  and  $\text{R}_4$  are H or  $\text{CH}_3$ , and  $\text{R}_3$  and  $\text{R}_4$  are not both  $\text{CH}_3$  or H;

WO 03/030819

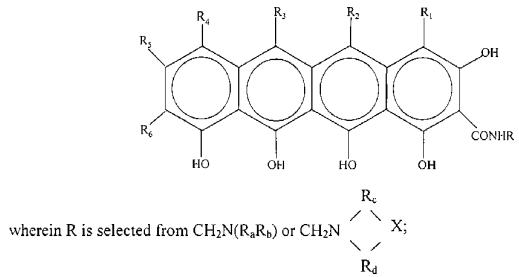
PCT/US02/31730

5a hydrogen is  $\alpha$  or  $\beta$ ;R<sub>3</sub> and R<sub>4</sub> are H, CH<sub>3</sub> or F, with the proviso that when R<sub>3</sub> is CH<sub>3</sub>, then R<sub>4</sub> is H or F, and when R<sub>4</sub> is CH<sub>3</sub>, then R<sub>3</sub> is H or F and R<sub>4</sub> and R<sub>5</sub> are not both F;

5 R<sub>5</sub> and R<sub>7</sub> are halogen, H, NO<sub>2</sub>, N<sub>3</sub>, N<sub>2</sub><sup>+</sup>, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OC(S)S-, CN, NR<sub>10</sub>R<sub>11</sub>, where R<sub>10</sub> and R<sub>11</sub> are H, C<sub>1</sub> to C<sub>10</sub> alkyl, and R<sub>12</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CO-, where n is 0 to 5 and R<sub>9</sub> is H, NH<sub>2</sub>, mono or disubstituted amino selected from straight, branched or cyclized C<sub>1</sub> to C<sub>10</sub> alkyl groups, with the proviso that R<sub>10</sub> and R<sub>11</sub> are not both R<sub>12</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CO-; R<sub>7</sub>, alternatively, is tertiary butyl; and R<sub>6</sub> is halogen, acetylene, R<sub>13</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>, where R<sub>13</sub> is NO<sub>2</sub>, halogen, acetylamino, amino, phenyl, alkyl, or alkoxy.

10 [00018] In a further preferred embodiment, the present invention relates to a treatment for inhibiting microbial or tumor growth which comprises adding to a subject in need of said treatment an effective amount of a tetracycline composition or salt thereof, comprising a general formula:

15



20 where R<sub>a</sub>R<sub>b</sub> are C<sub>1</sub> to C<sub>6</sub> alkyl; R<sub>c</sub> and R<sub>d</sub> are (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CHR<sub>c</sub>, n is 0 or 1 and R<sub>c</sub> is H, C<sub>1</sub> to C<sub>6</sub> alkyl, or NH<sub>2</sub>, and X is NH, S, or CH<sub>2</sub>; R<sub>1</sub> is H or OH; R<sub>2</sub> is H or OH;

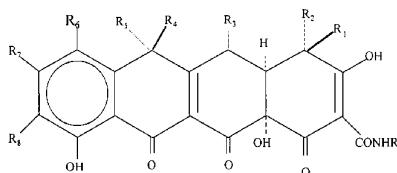
25 R<sub>3</sub> is H or CH<sub>3</sub>; R<sub>4</sub> and R<sub>6</sub> are halogen, H, NO<sub>2</sub>, N<sub>3</sub>, N<sub>2</sub><sup>+</sup>, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OC(S)S-, CN, NR<sub>7</sub>R<sub>8</sub>, where R<sub>7</sub> and R<sub>8</sub> are H, C<sub>1</sub> to C<sub>10</sub> alkyl, and R<sub>9</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CO-, where n is 0 to 5 and R<sub>9</sub> is H, NH<sub>2</sub>, mono or

WO 03/030819

PCT/US02/31730

disubstituted amino selected from straight, branched or cyclic C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> alkyl, with the proviso that R<sub>7</sub> and R<sub>8</sub> are not both R<sub>9</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CO-; and R<sub>6</sub> is H or halogen, acetylene, R<sub>10</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>, where R<sub>10</sub> is NO<sub>2</sub>, halogen, acetylarnino, amino, phenyl, alkyl, or alkoxy.

5 [00019] In a further preferred embodiment, the present invention relates to a treatment for inhibiting microbial or tumor growth which comprises adding to a subject in need of said treatment an effective amount of a tetracycline composition or salt thereof, comprising a general formula:



10

wherein R is selected from CH<sub>2</sub>N(R<sub>a</sub>R<sub>b</sub>) or CH<sub>2</sub>N(R<sub>c</sub>)<sub>2</sub> X;

R<sub>d</sub>

where R<sub>a</sub>R<sub>b</sub> are C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> alkyl;

15 R<sub>c</sub> and R<sub>d</sub> are (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CHR<sub>e</sub>, n is 0 or 1 and R<sub>e</sub> is H, C<sub>1</sub> to C<sub>6</sub> alkyl, or NH<sub>2</sub>, and X is NH, S, or CH<sub>2</sub>;

R<sub>1</sub> and R<sub>2</sub> are H or N(R<sub>9</sub>)<sub>2</sub>, where R<sub>9</sub> is H or C<sub>1</sub> to C<sub>6</sub> alkyl with the proviso that R<sub>1</sub> and R<sub>2</sub> are not both N(R<sub>9</sub>)<sub>2</sub>, R<sub>1</sub> and R<sub>2</sub> are also N(R<sub>10</sub>)<sub>3</sub> I, where R<sub>10</sub> is C<sub>1</sub> to C<sub>6</sub> alkyl, with the proviso that R<sub>1</sub> and R<sub>2</sub> are not both N(R<sub>10</sub>)<sub>3</sub> I;

20 R<sub>3</sub> is H;

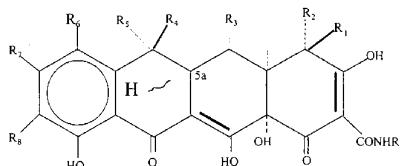
R<sub>4</sub> and R<sub>5</sub> are H, CH<sub>3</sub> or F, with the proviso that when R<sub>4</sub> is CH<sub>3</sub>, then R<sub>5</sub> is H or F, and when R<sub>5</sub> is CH<sub>3</sub>, then R<sub>4</sub> is H or F, and R<sub>4</sub> and R<sub>5</sub> are not both F;

25 R<sub>6</sub> and R<sub>8</sub> are halogen, H, NO<sub>2</sub>, N<sub>3</sub>, N<sub>2</sub><sup>+</sup>, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OC(S)S<sup>-</sup>, CN, NR<sub>11</sub>R<sub>12</sub>, where R<sub>11</sub> and R<sub>12</sub> are H, C<sub>1</sub> to C<sub>10</sub> alkyl, and R<sub>13</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CO-, where n is 0 to 5 and R<sub>13</sub> is H, NH<sub>2</sub>, mono or disubstituted amino selected from straight, branched or cyclized C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> alkyl groups, with the proviso that R<sub>10</sub> and R<sub>11</sub> are not both R<sub>12</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CO-; and R<sub>8</sub> can also be tertiary butyl and R<sub>7</sub> is H or halogen.

WO 03/030819

PCT/US02/31730

[00020] In an additional preferred embodiment, the present invention relates to a treatment for inhibiting microbial or tumor growth which comprises adding to a subject in need of said treatment an effective amount of a tetracycline composition or salt thereof, comprising a general formula:



5

wherein R is selected from  $\text{CH}_2\text{N}(\text{R}_a\text{R}_b)$  or  $\text{CH}_2\text{N}$   
 $\begin{array}{c} \diagup \\ \diagdown \end{array} \begin{array}{c} \text{R}_c \\ \text{X} \\ \text{R}_d \end{array}$

$\text{R}_a$   $\text{R}_b$  are  $\text{C}_1\text{-C}_6$ ;

10

$\text{R}_c$  and  $\text{R}_d$  are  $(\text{CH}_2)_n\text{CHR}_c$ , n is 0 or 1,  $\text{R}_c$  is H, alkyl ( $\text{C}_1$  to  $\text{C}_6$ ),  $\text{NH}_2$ , and X is  $\text{NH}$ ,  
 $\text{S}$ , or  $\text{CH}_2$ ;

$\text{R}_1$  and  $\text{R}_2$  are H or  $\text{N}(\text{R}_9)_2$  where  $\text{R}_9$  is hydrogen or lower alkyl ( $\text{C}_1$  to  $\text{C}_6$ ), with the  
15 proviso that  $\text{R}_1$  and  $\text{R}_2$  can not both be  $\text{N}(\text{R}_9)_2$ .

$\text{R}_3$  is H, OH,  $=\text{O}$ ,  $\text{OCOR}_{10}$ , where  $\text{R}_{10}$  is  $\text{C}_1$  to  $\text{C}_6$ , or alternatively,  $\text{R}_3$  is  $\text{N}(\text{R}_9)_2$   
where  $\text{R}_9$  is hydrogen or  $\text{C}_1$  to  $\text{C}_6$ , with the proviso that when  $\text{R}_{23}$  is  $=\text{O}$  or  $\text{N}(\text{R}_9)_2$ ,  
then  $\text{R}_4$  and  $\text{R}_5$  are H or  $\text{CH}_3$  and  $\text{R}_4$  and  $\text{R}_5$  are not both  $\text{CH}_3$  or H;

20

$\text{R}_{23}$  hydrogen is  $\alpha$  or  $\beta$ ;

$\text{R}_4$  and  $\text{R}_5$  are H,  $\text{CH}_3$  or F, with the proviso that when  $\text{R}_4$  is  $\text{CH}_3$ , then  $\text{R}_5$  is H or F,  
and when  $\text{R}_5$  is  $\text{CH}_3$  then  $\text{R}_4$  is H or F and  $\text{R}_4$  and  $\text{R}_5$  are not both F;

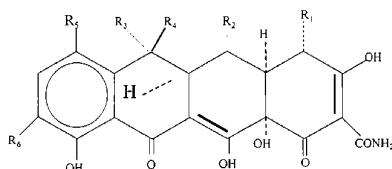
$\text{R}_6$  and  $\text{R}_8$  are halogen, H,  $\text{NO}_2$ ,  $\text{N}_3$ ,  $\text{N}_2^+$ ,  $\text{C}_2\text{H}_5\text{OC}(\text{S})\text{S}^-$ ,  $\text{CN}$ ,  $\text{NR}_{10}\text{R}_{11}$ , where  $\text{R}_{10}$  and  
25  $\text{R}_{11}$  are H, alkyl ( $\text{C}_1$  to  $\text{C}_{10}$ ), and  $\text{R}_{12}(\text{CH}_2)_n\text{CO}^-$ , where n is 0 to 5 and  $\text{R}_{12}$  is H,  $\text{NH}_2$ ,  
mono or disubstituted amino selected from straight, branched or cyclized  $\text{C}_1$  to  $\text{C}_{10}$

WO 03/030819

PCT/US02/31730

groups, with the proviso that  $R_{10}$  and  $R_{11}$  are both  $R_{12} (CH_2)_n CO-$ , or, alternatively,  $R_8$  is tertiary butyl;  
 $R_7$  is H or halogen, acetylene,  $R_{12}-C_6H_5$ , where  $R_{12}$  is  $NO_2$ , halogen, acetylarnino, amino, phenyl, alkyl, or alkoxy.

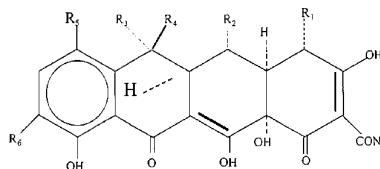
5 [00021] In a further preferred embodiment, the present invention relates to a treatment for inhibiting microbial or tumor growth which comprises adding to a subject in need of said treatment an effective amount of a tetracycline composition or salt thereof, comprising a general formula:



10

wherein  $R_1$  is H or  $N(CH_3)_2$ ;  $R_2$  is H,  $CH_3$  or  $OCOCH_3$ ;  $R_3$  is H or  $CH_3$ ;  $R_4$  is H;  $R_5$  is H,  $N(CH_3)_2$ ,  $NH_2$ ,  $N(C_4H_9)_2$ ,  $N(C_6H_5)_2$ ,  $N(3,3 - \text{dimethylbutyl})_2$ ,  $N_3$ ,  $N_2^+$ ,  $NO_2$ ,  $NHCOCH_3$ ,  $NH(n\text{-propyl})_2$ ,  $NH\text{-isobutyl}$ ,  $NH\text{-isobutylmethyl}$ ,  $NH(\text{cyclobutyl})$ ,  $NH(\text{cyclobutyl methyl})$ ; and  $R_6$  is  $NO_2$ ,  $NH_2$ ,  $(CH_3)_2 CHNH$ ,  $N_3$ ,  $NHCOCH_3$ ,  $N_2^+$ ,  $N_3$  or  $(CH_3)_3C$ .

15 [00022] In a further preferred embodiment, the present invention relates to a treatment for inhibiting microbial or tumor growth which comprises adding to a subject in need of said treatment an effective amount of a tetracycline composition or salt thereof, comprising a general formula:



8

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 03/030819

PCT/US02/31730

wherein R<sub>1</sub> is H or N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>; R<sub>2</sub> is H, OH or OCOCH<sub>3</sub>; R<sub>3</sub> is H or CH<sub>3</sub>; R<sub>4</sub> is H; R<sub>5</sub> is H, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>; N(C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>2</sub>; N(C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>)<sub>2</sub>; N(3,3-dimethylbutyl)<sub>2</sub>; N<sub>3</sub>, N<sub>2</sub><sup>+</sup>, NO<sub>2</sub>, NHCOCH<sub>3</sub>, 5 NH(n-propyl)<sub>2</sub>, NH-isobutyl, NH-isobutylmethyl, N(CH<sub>3</sub>CO)(isobutyl), NH(cyclobutyl), NH(cyclobutyl methyl), or NH<sub>2</sub>; and R<sub>6</sub> is H, NO<sub>2</sub>, NH<sub>2</sub>, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> CHNH, N<sub>3</sub>, NHCOCH<sub>3</sub>, N<sub>2</sub><sup>+</sup>, or (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>C.

[00023] The following examples describe the preparation of various substances in 10 accordance with the present invention.

[00024] HPLC analyses were performed on Waters reverse phase C<sub>18</sub>-symmetry columns using water (containing 0.1% TFA) and acetonitrile as eluents

[00025] Analytical LC/MS runs were performed on a Hewlett Packard Series 1100 liquid chromatographer equipped with a series 1100 MSD detector, with ES 15 ionization mode and UV detection at 270 nm, using a 4.6 x 100 mm column with a flow rate of 0.4 mL/min. Preparative HPLC was performed on a Gilson serial HPLC with UV detection at 270 nm, using a 19 x 150 mm column and a flow rate of 15 mL/min. <sup>1</sup>H NMR were recorded on a Bruker 300 MHz spectrometer in deuterated methanol.

20

#### 9-Nitro-doxycycline sulfate

[00026] To a stirred solution of doxycycline hydrochloride (1 g, 2.08 mmol) in 30 mL of concentrated sulfuric acid at 0 °C was added potassium nitrate (252 mg, 2.49 mmol). The resulting mixture was stirred for 20 min at 0 °C, then poured into 1.2 L 25 cold ether with stirring. The solid which precipitated was filtered out, washed with cold ether and dried under vacuum, and 1.22 g of cream colored product was obtained. If needed, the product was purified by dissolving in methanol, filtering and pouring the filtrate into ether. The solid which separated was filtered out and dried.

30 9-Amino-doxycycline sulfate

WO 03/030819

PCT/US02/31730

[00027] To a stirred solution of 9-nitro-doxycycline sulfate (1 g, 1.7 mmol) in 35 mL of ethylene glycol monomethyl ether and 5 mL of methanol was added 700 mg of 10% Pd/C. The reaction mixture was hydrogenated at atmospheric pressure for 6 hrs. The catalyst was filtered off through celite washing with methanol. The filtrate was 5 concentrated, then added dropwise to 800 mL cold ether with stirring. The solid that separated was filtered out, washed with cold ether and dried under vacuum, and 843 mg of cream colored product was obtained.

## 9-Isopropylamino-doxycycline sulfate

10 [00028] To a stirred solution of 9-amino-doxycycline sulfate (100 mg, 0.18 mmol) on 10 mL of ethylene glycol monomethyl ether was added 0.05 ml of concentrated sulfuric acid, 0.5 mL acetone and 100 mg of 10% Pd/C. The resulting mixture was hydrogenated at atmospheric pressure for 1 h 15 min, then the catalyst was filtered through celite, washing with methanol. The filtrate was concentrated, then poured 15 into 150 mL of cold ether with stirring. The solid that separated was filtered out, washed with cold ether and dried under vacuum, and 109 mg of cream colored product was obtained. The product was purified by dissolving in methanol, filtering and pouring the filtrate into ether. The solid which formed was filtered out and dried.

## 20 9-Acetamido-doxycycline sulfate

[00029] To a stirred solution of 9-amino-doxycycline sulfate (72 mg, 0.13 mmol) in 1.5 mL of 1,3-dimethyl-2-imidazolidinone were added 70 mg sodium bicarbonate followed by 0.05 mL of acetyl chloride. The mixture was stirred at room temperature for 1 hour and then filtered. The filtrate was concentrated and poured into 100 ml 25 cold ether with stirring. The solid that separated was filtered out and dried under vacuum, and 92 mg was obtained.

## 9-Diazonium-doxycycline sulfate hydrochloride

30 [00030] To a stirred solution of 9-amino-doxycycline sulfate (300 mg, 0.54 mmol) in 9 mL of 0.1N hydrochloric acid in methanol cooled in an ice bath was added 0.3 mL of n-butyl nitrite. The solution was stirred at 0 °C for 30 minutes then poured into

WO 03/030819

PCT/US02/31730

300 mL of cold ether with stirring. The solid that separated was filtered out and dried under vacuum, and 256 mg of an orange-brown product was obtained.

9-Azido-doxycycline sulfate

5 [00031] To a stirred solution of 9-diazonium-doxycycline sulfate hydrochloride (80 mg, 0.14 mmol) in 4.5 mL of 0.1N hydrochloric acid in methanol was added 10 mg of sodium azide. The solution was stirred at room temperature for 2 hours, then poured into 100 mL of cold ether with stirring. The solid that separated was filtered out and dried under vacuum, and 43 mg of product was obtained.

10

9-(4-fluorophenyl)-doxycycline

[00032] To a solution of 9-diazonium-doxycycline sulfate hydrochloride (358 mg, 0.59 mmol) and 4-fluorophenyl boronic acid (107 mg, 0.76 mmol) in 4 mL of methanol was added 18 mg of palladium(II)acetate and the resulting mixture was stirred at 15 room temperature for 16 hours. The catalyst was filtered off and the residue was concentrated and purified by preparative HPLC. The collected fractions from HPLC were concentrated and poured into 20 mL of cold ether. The solid that was separated was filtered out and dried under vacuum, and 32 mg of product was obtained.

20 7-[1,2-bis(carbobenzyloxy)hydrazino]-doxycycline

[00033] To a stirred solution of doxycycline hydrochloride (300 mg, 0.62 mmol) in 2.5 mL of THF and 3.2 mL of methanesulfonic acid at 0 °C was added 230 mg of dibenzoyazodicarboxylate. The resulting mixture was stirred at 0 °C for 2 hours, then poured into 400 mL of cold ether. The solid that separated was filtered out and dried 25 under vacuum, and 479 mg of an off-white product was obtained.

7-Amino-doxycycline

[00034] To a solution of 7-[1,2-bis(carbobenzyloxy)hydrazino]-doxycycline (478 mg) in 30 mL of ethylene glycol monomethyl ether was added 200 mg of 10% Pd/C and the resulting mixture was hydrogenated for 3 hours at room temperature. The catalyst was filtered through celite washing with methanol and the filtrate was

WO 03/030819

PCT/US02/31730

concentrated and poured into 500 mL cold ether. The solid that separated was filtered out and dried under vacuum, and 268 mg of product was obtained.

7-Dimethylamino-doxycycline sulfate

5 [00035] To a solution of 7-amino-doxycycline (100 mg) in 8 mL of ethylene glycol monomethyl ether were added 1 mL of a 37% aqueous formaldehyde solution, 0.05 mL of concentrated sulfuric acid and 100 mg of 10% Pd/C. The resulting mixture was hydrogenated at atmospheric pressure for 6 hours, then the catalyst was filtered through celite, washing with methanol. The residue was concentrated and poured into 100 ml cold ether with stirring. The solid that separated was filtered out with difficulty, being very gluey. The solid was immediately redissolved in methanol and poured into 100 ml cold ether with stirring. The solid that separated was filtered out and dried under vacuum, and 89 mg of product was obtained.

15 7-Dipropyl-doxycycline sulfate

[00036] To a solution of 7-amino-doxycycline (90 mg) in 8 mL of ethylene glycol monomethyl ether were added 0.5 mL of propionaldehyde, 0.05 mL of concentrated sulfuric acid and 80 mg of 10% Pd/C. The resulting mixture was hydrogenated at atmospheric pressure for 5 hours, then the catalyst was filtered through celite, washing with methanol. The residue was concentrated and poured into 100 ml cold ether with stirring. The solid that separated was filtered out and dried under vacuum, and 415 mg of product was obtained.

7-Butyrylaminodoxycycline sulfate

25 [00037] To a solution of 7-amino-doxycycline (100 mg, 0.2 mmol) in 6 mL of ethylene glycol monomethyl ether were added 0.6 mL of butyraldehyde, 0.05 mL of concentrated sulfuric acid and 100 mg of 10% Pd/C. The resulting mixture was hydrogenated at atmospheric pressure for 4 hours, then the catalyst was filtered through celite, washing with methanol. The residue was concentrated and poured into 100 ml cold ether with stirring. The solid that separated was filtered out and dried under vacuum, and 103 mg of product was obtained.

7-Di(3,3-dimethyl)butylamino-doxycycline sulfate

WO 03/030819

PCT/US02/31730

[00038] To a solution of 7-amino-doxycycline (100 mg, 0.2 mmol) in 6 mL of ethylene glycol monomethyl ether were added 0.5 mL of 3,3-dimethyl butyraldehyde, 0.05 mL of concentrated sulfuric acid and 100 mg of 10% Pd/C. The resulting mixture was hydrogenated at atmospheric pressure for 4 hrs, then the catalyst was 5 filtered through celite, washing with methanol. The residue was concentrated and poured into 100 ml cold ether with stirring. The solid that separated was filtered out and dried under vacuum, and 122 mg of product was obtained.

7-Dihexylamino-doxycycline sulfate

10 [00039] To a solution of 7-amino-doxycycline (100 mg, 0.2 mmol) in 6 mL of ethylene glycol monomethyl ether were added 0.6 mL of hexanal, 0.05 mL of concentrated sulfuric acid and 100 mg of 10% Pd/C. The resulting mixture was hydrogenated at atmospheric pressure for 4 hours, then the catalyst was filtered through celite, washing with methanol. The residue was concentrated and poured into 15 100 ml cold ether with stirring. The solid that separated was filtered out and dried under vacuum, and 129 mg of product was obtained.

7-Isopropylamino-doxycycline sulfate

20 [00040] To a solution of 7-amino-doxycycline (90 mg, 0.2 mmol) in 8 mL of ethylene glycol monomethyl ether were added 0.5 mL of isobutyraldehyde, 0.05 mL of concentrated sulfuric acid and 90 mg of 10% Pd/C. The resulting mixture was hydrogenated at atmospheric pressure for 6 hours, then the catalyst was filtered through celite, washing with methanol. The residue was concentrated and poured into 100 ml cold ether with stirring. The solid that separated was filtered out and dried 25 under vacuum, and 142 mg of product was obtained.

7-Methyl-7-isopropylamino-doxycycline sulfate

30 [00041] To a solution of 7-isopropylamino-doxycycline (60 mg) in 4 mL of ethylene glycol monomethyl ether were added 0.4 mL of a 37% aqueous solution of formaldehyde, 0.05 mL of concentrated sulfuric acid and 50 mg of 10% Pd/C. The resulting mixture was hydrogenated at atmospheric pressure for 2 hours, then the catalyst was filtered through celite, washing with methanol. The residue was concentrated and poured into 80 ml cold ether with stirring. The solid that separated was filtered out and dried under vacuum, and 52 mg of product was obtained.

WO 03/030819

PCT/US02/31730

## 7-Cyclobutylamino-doxycycline sulfate

[00042] To a solution of 7-amino-doxycycline (80 mg) in 7 mL of ethylene glycol monomethyl ether were added 0.3 mL of cyclobutanone, 0.04 mL of concentrated sulfuric acid and 60 mg of 10% Pd/C. The resulting mixture was hydrogenated at atmospheric pressure for 24 hours, then the catalyst was filtered through celite, washing with methanol. The residue was concentrated and poured into 100 ml cold ether with stirring. The solid that separated was filtered out and dried under vacuum, and 85 mg of product was obtained.

10

## 7-Methyl-7-cyclobutylamino-doxycycline sulfate

[00043] To a solution of 7-cyclobutylamino-doxycycline (40 mg) in 3.5 mL of ethylene glycol monomethyl ether were added 0.3 mL of a 37% aqueous solution of formaldehyde, 0.03 mL of concentrated sulfuric acid and 40 mg of 10% Pd/C. The resulting mixture was hydrogenated at atmospheric pressure for 6 hrs, then the catalyst was filtered through celite, washing with methanol. The residue was concentrated and poured into 80 ml cold ether with stirring. The solid that separated was filtered out and dried under vacuum, and 35 mg of product was obtained.

20 7-Acetamido-doxycycline sulfate

[00044] To a stirred solution of 7-amino-doxycycline (200 mg) in 3 mL of 1,3-dimethyl-2-imidazolidinone were added 200 mg sodium bicarbonate followed by 0.09 mL of acetyl chloride. The mixture was stirred at room temperature for 1 hr and then filtered. The filtrate was concentrated and poured into 200 ml cold ether with stirring. The product which precipitated was filtered out and dried under vacuum. Obtained 202 mg of product.

## 7-acetamido-7-isopropyl-doxycycline sulfate

[00045] To a stirred solution of 7-isobutylamino-doxycycline (60 mg) in 1.5 mL of 1,3-dimethyl-2-imidazolidinone were added 60 mg sodium bicarbonate followed by 0.05 mL of acetyl chloride. The mixture was stirred at room temperature for 1 hr 30 min and then filtered. The filtrate was concentrated and poured into 80 ml cold ether with stirring. The product which precipitated was filtered out and dried under vacuum.

WO 03/030819

PCT/US02/31730

## 7-Diazonium-doxycycline hydrochloride or tetrafluoroborate

[00046] To a stirred solution of 7-amino-doxycycline (200 mg, 0.4 mmol) in 4 mL of 0.1N hydrochloric acid in methanol cooled in an ice bath was added 0.2 mL of n-5 butyl nitrite. The solution was stirred at 0 °C for 30 minutes, then poured into 200 mL of cold ether with stirring. The solid that separated was filtered out and dried under vacuum, and 173 mg of product was obtained. The diazonium tetrafluoroborate salt was prepared by using tetrafluoroboric acid (54% solution in ether) instead of hydrochloric acid.

10

## 7-Azido-doxycycline

[00047] To a stirred solution of 7-diazonium-doxycycline hydrochloride (80 mg, 0.14 mmol) in 4.5 mL of 0.1N hydrochloric acid in methanol cooled on an ice bath was added 12 mg of sodium azide. The solution was stirred at 0 °C for 2 hours, then 15 poured into 100 mL of cold ether with stirring. The solid that separated was filtered out and dried under vacuum, and 43 mg of product was obtained.

## 7-Amino-9-nitro-doxycycline sulfate

[00048] To a stirred solution of 7-amino-doxycycline (220 g, 0.44 mmol) in 4 mL 20 of concentrated sulfuric acid at 0 °C was added potassium nitrate (52 mg, 0.51 mmol). The resulting mixture was stirred for 15 minutes at 0 °C, then poured into 300 mL cold ether with stirring. The solid that separated was filtered out, washed with cold ether and dried under vacuum. The product was redissolved in methanol, filtered and the filtrate was poured into ether. The solid that separated was filtered out and dried 25 under vacuum, and 222 g of product was obtained.

## 7-Dimethylamino-9-nitro-doxycycline sulfate

[00049] To a stirred solution of 7-dimethylamino-doxycycline (40 g, 0.07 mmol) in 1.5 mL of concentrated sulfuric acid at 0 °C was added potassium nitrate (12 mg, 0.12 30 mmol). The resulting mixture was stirred for 30 min at 0 °C, then poured into 60 mL cold ether with stirring. The solid that separated was filtered out, washed with cold ether and dried under vacuum. LC/MS shows mostly one product containing two nitro groups (possibly a nitrate ester of the desired product).

WO 03/030819

PCT/US02/31730

## 7-Dimethylamino-9-diazonium-doxycycline sulfate hydrochloride

[00050] To a stirred solution of 7-dimethylamino-9-amino-doxycycline (50 mg) in 1.5 mL of 0.1N hydrochloric acid in methanol cooled in an ice bath was added 0.05 mL of a n-butyl nitrite. The solution was stirred at 0 °C for 30 minutes, then poured into 80 mL of cold ether with stirring. The solid that separated was filtered out and dried under vacuum, and 38 mg of product was obtained.

## 7-Acetamido-9-nitro-doxycycline sulfate

[00051] To a stirred solution of 7-acetamino-doxycycline (60 g, 0.095 mmol) in 2 mL of concentrated sulfuric acid at 0 °C was added potassium nitrate (11 mg, 0.11 mmol). The resulting mixture was stirred for 5 minutes at 0 °C, then poured into 80 mL cold ether with stirring. The solid that separated was filtered out, washed with cold ether and dried under vacuum.

## 15 7-Acetamido-9-amino-doxycycline sulfate

[00052] To a stirred solution of 7-acetamido-9-nitro-doxycycline sulfate (77 mg, 0.12 mmol) in 7 mL of ethylene glycol monomethyl ether was added 60 mg of 10% Pd/C. The reaction mixture was hydrogenated at atmospheric pressure for 7 hours. The catalyst was filtered off through celite washing with methanol. The filtrate was concentrated, then added dropwise to 100 mL cold ether with stirring. The solid that separated was filtered out, washed with cold ether and dried under vacuum, and 62 mg of product was obtained.

## 7-Acetamido-9-diazonium-doxycycline sulfate hydrochloride

25 [00053] To a stirred solution of 7-acetamido-9-amino-doxycycline (100 mg) in 3 mL of 0.1N hydrochloric acid in methanol cooled in an ice bath was added 0.1 mL of n-butyl nitrite. The solution was stirred at 0 °C for 30 minutes, then poured into 100 mL of cold ether with stirring. The solid that separated was filtered out and dried under vacuum, and 92 mg of product was obtained.

30

## 7-Acetamido-9-azido-doxycycline sulfate

[00054] To a stirred solution of 7-acetamido-9-diazonium-doxycycline (112 mg, 0.19 mmol) in 6 mL of 0.1N hydrochloric acid in methanol cooled in an ice bath was added 14 mg (0.21 mmol) of sodium azide. The solution was stirred at 0 °C for 35

WO 03/030819

PCT/US02/31730

minutes, then poured into 150 mL of cold ether with stirring. The solid that separated was filtered out and dried under vacuum, and 94 mg of product was obtained.

Doxycycline methiodide

5 [00055] Doxycycline free base (315 mg) was dissolved in 2 mL of methanol and 10 mL of THF, then 1 mL of methyl iodide was added. The reaction mixture was kept for 5 days; no crystallization of the product occurred. The reaction mixture was concentrated and poured into 300 mL of cold ether with stirring. The product that separated was filtered out and dried under vacuum, and 269 mg was obtained; LC/MS  
10 shows pure product.

5-Acetoxy-doxycycline

15 [00056] A solution of doxycycline (100 mg) in 3 mL of a 30% HBr in acetic acid solution was stirred at room temperature for 3.5 days; the reaction mixture was then poured into 100 mL of cold ether with stirring and the product that separated was filtered out. LC/MS showed incomplete conversion of starting material, so the product (86 mg) was resubjected to the reaction conditions for 9 hrs, and then isolated in the same way.

20 9-*tert*-butyl-doxycycline

[00057] A solution of doxycycline (100 mg) in 2 mL of *tert*-butanol and 3 mL of methanesulfonic acid was stirred at room temperature for 18 hours, then poured into 100 mL of cold water and extracted with *n*-butanol. The organic extracts were basified with a 1N sodium hydroxide solution and the pH was quickly adjusted to 6.5-  
25 7 with concentrated hydrochloric acid. A solid precipitated which was filtered out, then dissolved in methanol, concentrated and added dropwise to 30 mL of an ether/PET ether cold solution with stirring. The solid that separated was filter out and dried under vacuum.

30 9-*tert*-butyl-7-nitro-doxycycline

[00058] A solution of doxycycline hydrochloride (2 g) in 10 mL of *tert*-butanol and 30 mL of methanesulfonic acid was stirred at room temperature for 3 hours, then 500 mg of potassium nitrate was added and the resulting mixture stirred for an additional hour. The reaction mixture was poured in 100 ml cold solution of water containing 23

WO 03/030819

PCT/US02/31730

g of sodium hydroxide; more dilute NaOH solution was added dropwise until the reaction mixture became basic. The pH was quickly adjusted to 6.5-7 with concentrated hydrochloric acid. The gluey dark solid that separated was filtered out. The aqueous filtrate was extracted once with n-butanol to recover more product. The 5 crude product was dissolved in the minimum amount of methanol and purified by HPLC. The combined fractions from HPLC were concentrated to dryness, dissolved in methanol and added dropwise to 50 mL of a 3:1 mixture of ether/PET ether. The solid that separated was filtered out, and 788 mg of pale yellow product was obtained.

10 9-*tert*-butyl-7-amino-doxycycline

[00059] To a solution of 9-*tert*-butyl-7-doxycycline (500 mg) in 25 mL of ethylene glycol monomethyl ether was added 350 mg of 10% Pd/C and the resulting mixture was hydrogenated at atmospheric pressure for 17 hours. The catalyst was filtered through celite, washing with methanol. The residue was concentrated, dissolved in 15 THF and added dropwise to a cold 1:1 solution of ether/PET ether with stirring. The product that precipitated was filtered out and dried under vacuum, and 452 mg of product was obtained.

9-*tert*-butyl-7-diazonium-doxycycline

20 [00060] To a stirred solution of 9-*tert*-butyl-7-amino-doxycycline (93 mg, 0.18 mmol) in 2.5 mL of 0.1N hydrochloric acid in methanol cooled in an ice bath was added 0.1 mL of n-butyl nitrite. The solution was stirred at 0 °C for 30 minutes, and then half was poured into 30 mL of a 3:1 cold mixture of ether/PET ether with stirring. The product stuck to the bottom of the beaker as a gum. It was redissolved 25 in methanol and concentrated, the residue was poured into 20 mL of cold ether and the solid that separated was filtered out immediately and dried under vacuum; 42 mg of product was obtained. The other half of the reaction mixture was used directly for the 9-*tert*-butyl material below.

30 9-*tert*-butyl-7-azido-doxycycline

[00061] To a stirred solution of 9-*tert*-butyl-7-diazonium-doxycycline reaction mixture (1.5 mL) at 0 °C were added 8 mg (0.12 mmol) of sodium azide. The solution was stirred for 3 hours while allowed to warm to room temperature. After concentration of the reaction mixture, the residue was poured into a cold 3:1 mixture

WO 03/030819

PCT/US02/31730

of ether/PET ether with stirring. No solid separated, so the solution was concentrated to dryness to obtain 35 mg of product.

9-*tert*-butyl-7-dimethylamino-doxycycline

5 [00062] To a stirred reaction mixture from 9-*tert*-butyl-7-amino-doxycycline containing 167 mg of 9-*tert*-butyl-7-amino-doxycycline in 10 mL of ethylene glycol monomethyl ether and 115 mg of 10% Pd/C was added 1.2 ml of a 37% aqueous solution of formaldehyde. The resulting mixture was hydrogenated for 3.5 hours at atmospheric pressure, then the catalyst was filtered through celite washing with 10 methanol. The filtrate was concentrated and the residue was poured into 10 mL of cold ether with stirring. The product that separated was filtered out and dried under vacuum. LC/MS showed the expected product, but was contaminated by baseline impurity.

15 9-*tert*-butyl-7-acetamido-doxycycline

[00063] To a stirred solution of 9-*tert*-butyl-7-amino-doxycycline (100 mg) in 2 mL of 1,3-dimethyl-2-imidazolidinone were added 100 mg of sodium bicarbonate followed by 0.07 mL of acetyl chloride. The mixture was stirred at room temperature for 1.5 hours and then filtered. The filtrate was concentrated and poured into 100 mL 20 of cold ether with stirring. The product that separated was filtered out. The crude product was redissolved in methanol, filtered and added dropwise to a cold 3:1 mixture of ether/PET ether with stirring. The product was collected by filtration and dried under vacuum, and 76 mg of product was obtained.

25

4-dedimethylamino-doxycycline

[00064] To a stirred solution of tetracycline methiodide (860 mg) in 12 mL of acetic acid and 12 mL of water were added 432 mg of zinc dust. After stirring for 15 30 min the zinc powder was filtered out. The filtrate was diluted with 86 mL of water containing 0.86 mL of concentrated hydrochloric acid. The product that separated was filtered out and dried under vacuum, and 419 mg of product was obtained.

4-dedimethylamino-9-nitro-doxycycline

19

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 03/030819

PCT/US02/31730

[00065] To a stirred solution of 4-dedimethylamino-doxycycline (402 mg, 1 mmol) in 20 mL of concentrated sulfuric acid at 0 °C was added 111 mg of potassium nitrate. After stirring for 20 minutes, the reaction mixture was poured into 100 mL of cold water. n-Butanol was added to the water containing the product and the organic layer was separated. Extraction with n-butanol was repeated twice. The combined organic extracts were concentrated and added to cold water with stirring. The product that separated was filtered out; more product was recovered by re-extracting the aqueous filtrate with n-butanol, concentrating, pouring into cold water and filtering. After drying under vacuum, 353 mg of product were obtained.

10

**4-dedimethylamino-9-amino-doxycycline**

[00066] To a stirred solution of 4-dedimethylamino-9-nitro-doxycycline (353 mg) in 17 mL of ethylene glycol monomethyl ether were added 0.1 mL of concentrated sulfuric acid and 200 mg of 10% Pd/C, and the resulting mixture was hydrogenated at atmospheric pressure for 10 hours. The catalyst was filtered through celite, washing with methanol. The filtrate was concentrated and poured into 100 mL of ether. The solid that separated was filtered out and dried under vacuum, and 292 mg of product was obtained.

20 4-dedimethylamino-9-diazonium-doxycycline hydrochloride

[00067] To a stirred solution of 4-dedimethylamino-9-amino-doxycycline (220 mg) in 5 mL of 0.1N hydrochloric acid in methanol cooled in an ice bath was added 0.2 mL of n-butyl nitrite. The solution was stirred at 0 °C for 30 minutes, then poured into 150 mL of a 2:1 cold mixture of ether/PET ether with stirring. The solid that separated was filtered out and dried under vacuum, and 191 mg of product was obtained.

**4-dedimethylamino-9-azido-doxycycline**

[00068] To a stirred solution of 4-dedimethylamino-9-diazonium-doxycycline (150 mg, 0.32 mmol) in 6.5 mL of 0.1N hydrochloric acid in methanol cooled in an ice bath were added 23 mg of sodium azide, and the resulting mixture was stirred for 1 hour at 0 °C. The mixture was then poured into 120 mL of cold ether with stirring. Some solid formed, which was filtered out and found not to be the expected product. The filtrate was concentrated to dryness, taken up in methanol and poured into 50 mL

WO 03/030819

PCT/US02/31730

of cold water with stirring. The solid that separated was filtered out and dried under vacuum; more product was obtained by extracting the filtrate with n-butanol, concentrating, pouring into water and filtering out the solid, and 84 mg of product was obtained.

5

4-dedimethylamino-7-nitro-9-*tert*-butyl-doxycycline

[00069] A solution of 4-dedimethylamino-doxycycline (500 mg 1.25 mmol) in 3 mL of *tert*-butanol and 15 mL of methanesulfonic acid was stirred at room temperature for 15 hours, then 140 mg of potassium nitrate was added and the 10 resulting mixture stirred for an additional hour. The reaction mixture was poured in 200 mL of cold water with stirring. The solid that separated was filtered out and air dried. The crude product was dissolved in the minimum amount of methanol and purified by HPLC. The combined fractions from HPLC were concentrated to dryness, dissolved in methanol and added dropwise to 50 mL of cold water. The solid that 15 separated was filtered out and dried under vacuum, and 217 mg of product was obtained.

4-dedimethylamino-7-amino-9-*tert*-butyl-doxycycline

[00070] To a stirred solution of 4-dedimethylamino-7-nitro-9-*tert*-butyl-doxycycline (217 mg, 0.42 mmol) in 12 mL of ethylene glycol monomethyl ether were added 170 mg of 10% Pd/C, and the resulting mixture was hydrogenated at atmospheric pressure for 13 hours. The catalyst was filtered through celite, washing with methanol. The filtrate was concentrated and poured into 20 of a 3:1 mixture of ether/PET ether, and 40 mg of product was obtained. The orange filtrate was 25 concentrated to dryness to obtain additional 138 mg of product.

4-dedimethylamino-7-diazonium-9-*tert*-butyl-doxycycline

[00071] To a stirred 4-dedimethylamino-7-amino-9-*tert*-butyl-doxycycline (165 mg) in 5 mL of 0.1N hydrochloric acid in methanol cooled in an ice bath was added 0.15 mL of n-butyl nitrite. The solution was stirred at 0 °C for 30 minutes; half of the material was poured into 50 mL of cold ether with stirring. The solid that separated was filtered out and dried under vacuum, and 50 mg of product was obtained.

WO 03/030819

PCT/US02/31730

## 4-dedimethylamino-7-amino-doxycycline

[00072] To a stirred solution of 4-dedimethylamino-doxycycline (400 mg) in 4 mL of THF and 4.5 mL of methanesulfonic acid at 0 °C were added 418 mg (1.4 mmol) of dibenzyl azodicarboxylate, and the resulting mixture was stirred for 4 hours while 5 warming to room temperature. Water and n-butanol were added and two layers separated. The aqueous layer was extracted with a mixture of ether/n-butanol. The combined organic extracts were concentrated to dryness, and 10 mL of ethylene glycol monomethyl ether were added. Then, 430 mg of 10% Pd/C were added and the resulting mixture hydrogenated at atmospheric pressure for 12 hours. The catalyst 10 was filtered off through celite, washing with methanol. The filtrate was concentrated and poured into a 3:1 cold mixture of ether/PET ether with stirring; the product that separated was filtered out and dried under vacuum, and 114 mg of product was obtained.

## 15 9-nitro-minocycline sulfate

[00073] To a stirred solution of minocycline hydrochloride (1 g, 2.02 mmol) in 30 mL of concentrated sulfuric acid at 0 °C was added potassiumnitrate (246 mg). The resulting mixture was stirred for 45 minutes at 0 °C, then poured into 1.2 L cold ether with stirring. The solid that separated was filtered out, washed with cold ether and 20 dried under vacuum, and 1.33 g of product was obtained.

## 9-amino-minocycline sulfate

[00074] To a stirred solution of 9-nitro-minocycline sulfate (500 g, 0.83 mmol) in 10 mL of ethylene glycol monomethyl ether and 7 mL of methanol were added 250 25 mg of 10% Pd/C. The reaction mixture was hydrogenated at atmospheric pressure for 4 hours. The catalyst was filtered off through celite, washing with methanol. The filtrate was concentrated, then added dropwise to 600 mL cold ether with stirring. The solid that separated was filtered out, washed with cold ether and dried under vacuum, and 465 mg of product was obtained.

30

## 9-diazonium-minocycline sulfate hydrochloride

[00075] To a stirred solution of 9-amino-minocycline sulfate (100 mg) in 3 mL of 0.1N hydrochloric acid in methanol cooled in an ice bath was added 0.1 mL of tert-butyl nitrite (or n-butyl nitrite). The solution was stirred at 0 °C for 30 minutes, then

WO 03/030819

PCT/US02/31730

100 mL of cold ether with stirring. The solid that separated was filtered out and dried under vacuum, and 87 mg of an orange-brown product was obtained.

9-azido-minocycline sulfate

5 [00076] To a stirred solution of 9-diazonium-minocycline sulfate hydrochloride (485 mg, 0.83 mmol) in 18 mL of 0.1N hydrochloric acid in methanol were added 59 mg of sodium azide. The solution was stirred at room temperature for 2 hours, then filtered, and the filtrate was poured into 500 mL of cold ether with stirring. The solid that separated was filtered out and dried under vacuum, and 480 mg of beige product

10 was obtained.

9-acetamido-minocycline

[00077] To a stirred solution of 9-amino-minocycline sulfate (100 mg, 0.175 mmol) in 1.5 mL of 1,3-dimethyl-2-imidazolidinone were added 100 mg of sodium bicarbonate followed by 0.05 mL of acetyl chloride. The mixture was stirred at room temperature for 45 minutes and then poured into 150 mL of cold ether with stirring. The solid that separated was filtered out and dried under vacuum, and 165 mg of product was obtained.

20 4-dedimethylamino-minocycline

[00078] Minocycline free base (175 mg, 0.38 mmol) was dissolved in 2 mL of THF, then 0.43 mL of methyl iodide was added. No crystallization of the product occurred. The reaction mixture was concentrated and poured into 200 mL of cold ether/PET ether 40:60 with stirring. The product that separated was filtered out and dried under vacuum; the product was resubjected to the reaction conditions for 3 additional days, then precipitated from ether as before, and 123 mg of minocycline methiodide was obtained. The crude product was dissolved in 2 mL of acetic acid, and 2 mL of water and 60 mg of zinc dust were added with stirring. After 15 minutes, the zinc powder was filtered out. The filtrate was diluted with 15 mL of water containing concentrated hydrochloric acid. The combined organic extracts were dried over magnesium sulfate and concentrated. The solid that separated was filtered out and dried under vacuum, and 150 mg of a yellow product was obtained.

4-dedimethylamino-9-nitro-minocycline

WO 03/030819

PCT/US02/31730

[00079] 4-Dedimethylamino minocycline (415 mg, 1 mmol) was dissolved in 30 mL of concentrated sulfuric acid at room temperature. The solution was cooled on an ice bath and potassium nitrate (110 mg, 1.09 mmol) was added with stirring. The resulting mixture was stirred for 15 minutes, then poured into 300 mL cold ether with stirring. The solid that separated was filtered out, washed with cold ether and dried under vacuum. LC/MS showed incomplete conversion of starting material so the product was redissolved in 15 mL of concentrated sulfuric acid, 50 mg of potassium nitrate were added at 0 °C and the resulting mixture was stirred for 45 minutes. The product was isolated as before, and 542 mg of product was obtained.

10

## 7,9-dibromo sacycline

[00080] To a stirred solution of sacycline (50 mg, 0.12 mmol) in 1.5 mL of concentrated sulfuric acid at 0 °C were added 42 mg of N-bromosuccinimide. After 30 minutes, the reaction mixture was poured into 60 mL of cold ether with stirring. The solid that separated was filtered out and dried under vacuum, and 70 mg of yellow product was obtained.

## Mix of 7-nitro and 9-nitro-sacycline

[00081] To a stirred solution of sacycline (40 mg, 0.09 mmol) in 1.5 mL of concentrated sulfuric acid at 0 °C was added 10 mg of potassium nitrate. After 20 minutes, the reaction mixture was poured into 50 mL of cold ether with stirring. The solid that separated was filtered out and dried under vacuum, and 59 mg of product was obtained. LC/MS shows a 1.6:1 ratio of two mono-nitrated products.

[00082] In further testing of the present invention, the Minimum Inhibitory Concentrations (MIC) of five test products when challenged with ten different microorganism strains were evaluated. The study was an MIC evaluation for five test products, performed using a modification of the Macrodilution Broth Method outlined in NCCLS document M7-A5, *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically*, Fifth Edition. Each test product was evaluated, in duplicate, against challenge suspensions of ten microorganism strains. Prior to using each product for testing, it was diluted (w/v) in sterile Mueller-Hinton Broth (MHB) to achieve an initial concentration, based on a potency of 1000 µg/mg, of 160 µg/mL.

WO 03/030819

PCT/US02/31730

Product 1 - Tetracycline Derivative Lot Number: INN01182 (MW 615)	14.8 mg of this product was dissolved in 92.5 mL of MHB to achieve the initial concentration of 160 $\mu$ g/mL
Product 2 - Tetracycline Derivative Lot Number: INN01183 (MW 627)	13.6 mg of this product was dissolved in 85.0 mL of MHB to achieve the initial concentration of 160 $\mu$ g/mL
Product 3 - Tetracycline Derivative Lot Number: INN01185 (MW 655)	11.9 mg of this product was dissolved in 74.4 mL of MHB to achieve the initial concentration of 160 $\mu$ g/mL
Product 4 - Tetracycline Derivative Lot Number: INN01189 (MW 625)	9.6 mg of this product was dissolved in 60.0 mL of MHB to achieve the initial concentration of 160 $\mu$ g/mL
Product 5 - Tetracycline Derivative Lot Number: INN01195 (MW 643)	13.8 mg of this product was dissolved in 86.25 mL of MHB to achieve the initial concentrations of 160 $\mu$ g/mL

- [00083] Approximately 48 hours prior to testing, separate sterile tubes of Tryptic Soy Broth were inoculated from lyophilized vials containing each of the challenge microorganisms, as found in Table I, below. The broth cultures were incubated at 35° ± 2°C for approximately 24 hours. The broth cultures prepared as described above were inoculated onto the surface of Tryptic Soy Agar contained in Petri plates, and incubated at 35° ± 2°C for approximately 24 hours. This produced "lawns" of the microorganisms on the surface of the agar plates, which were used to prepare the challenge suspensions.
- [00084] Prior to initiating testing, an initial challenge suspension containing approximately  $1.0 \times 10^9$  CFU/mL was prepared for each microorganism by inoculating a test tube of Sodium Chloride Irrigation with microorganisms taken from the plates of solid media, prepared as described above. The final challenge suspensions containing approximately  $1.0 \times 10^6$  CFU/mL were prepared for each microorganism species, by placing a 0.2 mL aliquot of the  $1.0 \times 10^9$  CFU/mL suspension into a sterile 250 mL polypropylene bottle, containing 200 mL of Mueller-Hinton Broth. The final challenge suspensions were mixed thoroughly prior to use in testing. The final plated dilutions were  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  and  $10^{-5}$ . These plates were incubated at 35° ± 2°C until sufficient growth was observed (Table I).

WO 03/030819

PCT/US02/31730

[00085] Following incubation, the colonies on the plates were counted manually using a hand-tally counter. Counts in the 30 to 300 CFU range were used in the data calculations.

5 The Initial Population (CFU/mL) was calculated for each challenge suspension as follows:

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

Where:

$C_i$  = Average of the 2 Plates Counted

$D$  = Dilution Factor of the Plate Counts Used

10 The population (CFU/mL) per tube of product/broth following inoculation was calculated for each challenge suspension as follows:

$$\text{Population per Tube (CFU/mL)} = \frac{(C_i \times 10^{-D})}{2}$$

Where:

15  $C_i$  = Average of the Two (2) Plates Counted

$D$  = Dilution Factor of the Plate Counts Used

2  $=$  Total Volume (mL) present in each product/broth tube following inoculation

20 [00086] The testing procedure was as follows: 30 mL aliquots of Mueller-Hinton Broth were dispensed into sterile bottles. A 30 mL aliquot of product (initial concentration of 160  $\mu$ g/mL) was dispensed into the first of a series of 11 sterile bottles, each containing 30 mL of Mueller-Hinton Broth, and mixed thoroughly in order to achieve the 1:2 (v/v) dilution of product. A 30 mL aliquot was removed from 25 the bottle prepared as described above, and used to initiate a 1:2 (v/v) dilution series through the remaining 10 bottles (1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512, 1:1,024 and 1:2,048 product dilutions), each containing 30 mL of Mueller-Hinton Broth. Each bottle was mixed thoroughly prior to removing the 30 mL aliquot required for the next dilution in the series. 1.0 mL aliquots of each product dilution 30 prepared and 1.0 mL aliquots of the initial product preparation (160  $\mu$ g/mL product concentration) were transferred to separate sterile test tubes. A series of 12 tubes, each containing 1.0 mL of the appropriate product dilution (1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512, 1:1,024, and 1:2,048) was prepared for each

WO 03/030819

PCT/US02/31730

microorganism evaluated against each product (Table I). This resulted in product concentrations ranging from 160  $\mu$ g/mL to 0.078  $\mu$ g/mL.

[00087] A 1.0 mL aliquot of a suspension containing approximately  $1.0 \times 10^6$  CFU/mL was introduced into each product dilution tube in the series, thereby resulting in a final product dilution series of 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512, 1:1,024, 1:2,048, and 1:4,096, with each dilution tube containing approximately  $5.0 \times 10^5$  CFU/mL of the challenge microorganism. This resulted in final product concentrations ranging from 80  $\mu$ g/mL to 0.039  $\mu$ g/mL. The test procedure described above was performed, in duplicate, for each microorganism species tested (Table I) against each test product. A positive control tube (growth control) containing a 1.0 mL aliquot of Mueller-Hinton Broth and a 1.0 mL aliquot of the challenge suspension was prepared for each microorganism (Table I). A negative (media) control tube (sterility control; no microbial inoculation) of Mueller-Hinton Broth was also prepared.

[00088] Product turbidity controls were prepared for each product by transferring 1.0 mL aliquots of each product dilution into separate sterile test tubes. A 1.0 mL aliquot of sterile Mueller-Hinton Broth was introduced into each product dilution tube created and mixed thoroughly using a vortex mixer, thereby resulting in a final product dilution series identical to that described above. The challenge suspension/product dilution tubes and the controls were incubated at  $35^\circ \pm 2^\circ\text{C}$  for 20 hours, until good growth was apparent in the positive control tubes.

[00089] Following incubation, the tubes were examined for growth of the microorganisms, determined visually on the basis of turbidity.

[00090] The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) for each test product versus each challenge microorganism was recorded as the highest dilution of test product that completely inhibited growth of the microorganism, as detected by the unaided eye. The results of the duplicate runs for each test product versus each microorganism were recorded and then averaged together to provide the final reported values.

30

TABLE I

Microorganism Species	ATCC #	Incubation Time* (MIC Tubes)	Incubation Temp.*	Media
Enterococcus faecalis	29212	20 Hours	$35^\circ \pm 2^\circ\text{C}$	TSB/TSA/MHB
Escherichia coli	25922	20 Hours	$35^\circ \pm 2^\circ\text{C}$	TSB/TSA/MHB
Escherichia coli (Tetracycline-)	51657	20 Hours	$35^\circ \pm 2^\circ\text{C}$	TSB/TSA/MHB

WO 03/030819

PCT/US02/31730

Resistant)				
Escherichia coli (Tetracycline-Resistant)	51658	20 Hours	35° ± 2°C	TSB/TSA/MHB
Escherichia coli (Tetracycline-Resistant)	51659	20 Hours	35° ± 2°C	TSB/TSA/MHB
Staphylococcus aureus (Tetracycline-Resistant)	27217	20 Hours	35° ± 2°C	TSB/TSA/MHB
Staphylococcus aureus (Tetracycline-Resistant)	27659	20 Hours	35° ± 2°C	TSB/TSA/MHB
Staphylococcus aureus (Tetracycline-Resistant)	27660	20 Hours	35° ± 2°C	TSB/TSA/MHB
Staphylococcus aureus	29213	20 Hours	35° ± 2°C	TSB/TSA/MHB

\* = Initial Population plates were inadvertently incubated at room temperature (20° - 27°C) for approximately 48 hours prior to being incubated at 35° ± 2°C for approximately 72 hours.

- 5 [00091] Table II presents the Minimum Inhibitory Concentrations, expressed as product dilution, for each test product versus each of the 10 microorganisms tested. Table III presents the Minimum Inhibitory Concentrations, expressed as product concentration ( $\mu$ g/mL), for each test product versus each of the 10 microorganisms tested. The initial solution prepared for each product had a concentration, based on a potency of 1000  $\mu$ g/mg, of 160  $\mu$ g/mL.
- 10

TABLE II

Microorganism Species	ATCC #	Minimum Inhibitory Concentrations (Expressed as Product Dilution)				
		Product #1	Product #2	Product #3	Product #4	Product #5
Enterococcus faecalis	29212	<1:2	1:16	1:16	1:2	1:8
Escherichia coli	25922	1:2	<1:2	<1:2	<1:2	1:2
Escherichia coli (Tetracycline-Resistant)	51657	<1:2	<1:2	<1:2	<1:2	<1:2
Escherichia coli (Tetracycline-Resistant)	51658	<1:2	<1:2	<1:2	<1:2	<1:2
Escherichia coli (Tetracycline-Resistant)	51659	<1:2	<1:2	<1:2	<1:2	<1:2
Pseudomonas aeruginosa	27853	<1:2	<1:2	<1:2	<1:2	<1:2
Staphylococcus aureus (Tetracycline-Resistant)	27217	<1:2	1:32	1:32	1:8	1:16
Staphylococcus aureus (Tetracycline-Resistant)	27659	<1:2	1:32	1:24	1:8	1:16
Staphylococcus aureus (Tetracycline-Resistant)	27660	<1:2	1:32	1:16	1:8	1:32
Staphylococcus aureus	29213	1:8	1:32	1:32	1:8	1:32

TABLE III

Microorganism Species	ATCC #	Minimum Inhibitory Concentrations (Expressed as Product Dilution)				
		Product #1	Product #2	Product #3	Product #4	Product #5
Enterococcus faecalis	29212	>80	10	10	80	20

WO 03/030819

PCT/US02/31730

Escherichia coli	25922	80	> 80	> 80	> 80	80
Escherichia coli (Tetracycline-Resistant)	51657	> 80	> 80	> 80	> 80	> 80
Escherichia coli (Tetracycline-Resistant)	51658	> 80	> 80	> 80	> 80	> 80
Escherichia coli (Tetracycline-Resistant)	51659	> 80	> 80	> 80	> 80	> 80
Pseudomonas aeruginosa	27853	> 80	> 80	> 80	> 80	> 80
Staphylococcus aureus (Tetracycline-Resistant)	27217	> 80	5	5	20	10
Staphylococcus aureus (Tetracycline-Resistant)	27659	> 80	5	6.67	20	10
Staphylococcus aureus (Tetracycline-Resistant)	27660	> 80	5	10	20	5
Staphylococcus aureus	29213	20	5	5	20	5

[00092] In additional studies, the activity of the tetracycline derivatives of the present invention as inhibitors of matrix degrading metalloproteinases (MMPs) that are involved in malignant tumor growth and metastasis were investigated. The 5 studies used the Dunning MAT LyLu tumor model which was developed in Copenhagen rats from a transplantable tumor, transferred from an original prostate tumor from the dorsal prostate of an aged Copenhagen male rat. The MAT LyLu tumor is spontaneously metastatic to lymph nodes and lungs when injected, and produces bone metastases in approximately 80-100% of the recipient animals. Fresh 10 dosing solutions containing 10 mg/ml of each test article in 2% carboxymethylcellulose were prepared daily and used in the testing.

[00093] The studies initially evaluated toxicity in two groups of five non-tumor bearing animals, each receiving the two tetracycline analogs (9-amino-doxycycline and 9-nitro-doxycycline) at a dose of 40 mg/kg daily for seven days.

15

[00094] Three groups of animals (10/group) were dosed by gavage with either vehicle, or one of the two analogs daily for three weeks, and then three times per week until death or sacrifice. Dosing was begun seven days prior to implantation of the MAT LyLu tumor cells by tail vein injection. Approximately 0.1 ml of tumor cell 20 suspension was injected into one of the lateral tail veins. The dose to be chosen was based on two factors: (1) efficacy and (2) morbidity associated with the analog, if any. The following table (Table IV below), demonstrates survival time and weekly body weight of animals in control and treated groups. As shown in the table, 9-amino-doxycycline and 9-nitro-doxycycline demonstrated a marked increase in 25 surviving number after tumor implantation, while also resulting in indistinguishable

WO 03/030819

PCT/US02/31730

body weight changes as compared to the control group. This latter finding is particularly significant, in that conventional anti-cancer treatments often result in significant weight loss.

TABLE IV

Number of Days Post Tumor Implantation	Surviving Number		
	9-amino-doxycycline	9-nitro-doxycycline	Control
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

5

[00095] In further studies, the inhibitory activity of MMPs, as well as percent inhibition of various cancers by various tetracycline derivative were evaluated. Results appear in Table V, below, and demonstrate the efficacy of the treatments of the present invention. One objective of the studies was to assess a series of 10 tetracycline derivatives as inhibitors of purified human matrix metalloproteinases including MMP1, 2, 3, 7, 9 and 14. The tetracycline derivatives were effective inhibitors in the mM- $\mu$ M range.

## EXPERIMENTAL PROTOCOLS

- 15 1. Protocol for measuring MMP1 (Collagenase-1) inhibition by tetracycline derivatives

MMP1 activity was determined by the release of soluble  $^{14}\text{C}$  labelled collagen fragments from  $^{14}\text{C}$  acetylated rat skin type I collagen (Methods in Enzymology 80 20 711, 1981).

30

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 03/030819

PCT/US02/31730

## Assay constituents:

- 100 µg <sup>14</sup>C labelled rat skin type I collagen (5-6000 dpm)  
50 mM Tris HCl pH 7.9  
5 15 mM CaCl<sub>2</sub> 0.02% azide  
Human recombinant MMP1 3-4nM  
± Tetracycline (up to 1 mM) in a total volume of 300 µl.

[00096] Incubations were at 35°C for 5 hours. Uncleaved collagen fibrils (which form within the first 10 minutes) were removed by centrifugation at 10,000 g, 4°C, 10 minutes. 200 µl supernatant were counted in Packard Opti Phase Supermix scintillation fluid using a scintillation counter. Only data derived from within the linear part of the assay (10 - 70% lysis of the collagen) were utilized. Based on percentage inhibition of the activity of MMP1 alone by a range of concentrations of each sample, the IC50 value for each tetracycline was calculated by linear regression analysis.

2. Protocol for measuring MMP2 (Gelatinase A) inhibition

MMP2 activity was determined by the release of trichloroacetic acid, TCA, soluble fragments from <sup>14</sup>C acetylated rat skin type I gelatin (Methods in Enzymology 248, 470, 1995. Biochem. J. 195, 1981)

## Assay constituents:

- 100 µg <sup>14</sup>C labelled gelatin (type I collagen denatured 60°C 20 min)  
25 50 mM Tris HCl pH 7.9  
15 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.02% azide  
Human recombinant MMP1, 0.1-0.5 nM  
± Tetracycline (up to 1 MM) in a total volume of 250 µl.

30 [00097] Incubations were set at 37°C for 16 hours. The reaction was stopped by cooling the incubations and addition of 50 µl cold 90% (w/v) trichloroacetic acid with careful mixing. TCA precipitation was allowed to proceed for 15 minutes at 4°C prior to centrifugation at 10,000 g for 10 minutes at 4°C. 200 µl of the TCA supernatant was taken for the determination of radioactive content by scintillation

WO 03/030819

PCT/US02/31730

counting (Packard Opti Phase Supermix scintillation fluid). Only data derived from within the linear part of the assay (10 - 70% lysis) were utilized. The percentage inhibition of MMP2 by each tetracycline concentration was plotted to derive the IC50 value, using linear regression analysis.

5

3. Protocol for measuring MMP3 (Stromelysin 1) inhibition

MMP3 activity was determined by the release of trichloroacetic acid, TCA, soluble fragments from <sup>14</sup>C acetylated  $\beta$  casein (Sigma) as described in Methods in Enzymology 248, 451 (1995).

10

Assay constituents:

100  $\mu$ g <sup>14</sup>C casein (7000 dpm)

50 mM Tris HCl, pH 7.9

15 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.02% azide

15 Human recombinant MMP3, 0.25-1.0 nM

$\pm$  tetracycline (up to 1 mM) in a total volume of 250  $\mu$ l.

[00098] Incubations were at 37°C for 16 hours. The reaction was stopped by the addition of 500  $\mu$ l cold 18% TCA and standing on ice for 15 minutes. TCA precipitates were removed by centrifugation at 10,000 g for 10 minutes at 4°C and 200  $\mu$ l supernatant was taken for scintillation counting. Only data derived from within the linear part of the assay (10 - 60% lysis) were utilized. The percentage inhibition of MMP3 by each concentration of the candidate tetracycline was plotted to derive the IC50 value, using linear regression analysis.

25

4. Protocol for measuring MMP7 (Matrilysin) inhibition

MMP7 activity was determined by the release of trichloroacetic acid, TCA, soluble fragments from <sup>14</sup>C acetylated  $\beta$  casein (Sigma) as described in Methods in Enzymology 248, 451 (1995).

Assay constituents:

100  $\mu$ g <sup>14</sup>C casein (7000 dpm)

50 mM Tris HCl, pH 7.9

32

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 03/030819

PCT/US02/31730

15 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.02% azide  
Human recombinant MMP7, 1.5nM  
± tetracycline (up to 1 mM) in a total volume of 250 µl.

5 [00099] Incubations were at 37°C for 16 hours. The incubation was stopped by the addition of 500 µl cold 18% TCA and standing on ice for 15 minutes. TCA precipitates were removed by centrifugation at 10,000 g for 10 minutes at 4°C, and 200 µl supernatant was taken for scintillation counting. Only data derived from within the linear part of the assay (10 - 60% lysis) were utilized. The percentage 10 inhibition of MMP7 by each concentration of the candidate tetracycline were plotted to derive the IC50 value.

5. Protocol for measuring MMP9 (Gelatinase B) inhibition

15 MMP9 activity was determined by the release of trichloroacetic acid, TCA soluble fragments from <sup>14</sup>C acetylated rat skin type I (Methods in Enzymology 248, 470, 1995. Biochem. J. 195, 1981)

Assay constituents:

20 100 µg <sup>14</sup>C labelled gelatin (collagen denatured 60°C 20 min)  
50 mM Tris HCl pH 7.9  
15 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.02% azide  
Human recombinant MMP9, 1.2 - 2 nM  
± Tetracycline (up to 1 mM) in a total volume of 250 µl.

25 [000100] Incubations were at 37°C for 16 hours. The incubations were stopped by cooling the incubations and addition of 50 µl cold 90% (w/v) trichloroacetic acid with careful mixing. TCA precipitation was allowed to proceed for 15 minutes at 4°C prior to centrifugation at 10,000 g for 10 minutes at 4°C. 200 µl of the TCA 30 supernatant was taken for the determination of radioactive content by scintillation counting (Packard Opti Phase Supermix scintillation fluid). Only data derived from within the linear part of the assay (10 - 70% lysis) were utilized. The percentage inhibition of MMP9 by each tetracycline concentration were plotted to derive the IC50 value.

WO 03/030819

PCT/US02/31730

**6. Protocol for measuring MMP14 (MT1-MMP) inhibition by tetracycline derivatives**

MMP14 activity was determined by the release of soluble <sup>14</sup>C labelled collagen  
5 fragments from <sup>14</sup>C acetylated rat skin type I collagen (Methods in Enzymology 80  
711, 1981).

Assay constituents:

100 µg <sup>14</sup>C labelled collagen (5-6000 dpm)  
10 50 mM Tris HCl pH 7.9  
15 mM CaCl<sub>2</sub> 0.02% azide  
Human recombinant MMP14 50-100nM  
± Tetracycline (up to 1 mM) in a total volume of 300 µl.  
15 [000101] Incubations were at 35°C for 15 hours. Uncleaved collagen fibrils (which  
form within the first 10 minutes) were removed by centrifugation at 10,000 g 4°C 10  
minutes 200 µl supernatant were counted in Packard Opti Phase Supermix  
20 scintillation fluid using a scintillation counter. Only data derived from within the  
linear part of the assay (10 - 70% lysis of the collagen) were utilized. Based on  
percentage inhibition of the activity of MMP1 alone by a range of concentrations of  
each sample, the IC50 value for each tetracycline was calculated.

[000102] Another objective was to analyze the effects of specific, tetracycline  
derived compounds on the *in-vitro* chemo-invasive potential of:

25 C8161 human melanoma cells  
MDA-MB-231 human breast cancer cells  
PC3 human prostate cancer cells  
RPM18226 human myeloma cancer cells  
30 Ark human myeloma cancer cells  
Arp-1 human myeloma cancer cells

[000103] The Membrane Invasion Culture System (MICS) *in vitro* chemo-invasion  
assay was chosen to measure changes in the invasive potential of specific human  
cancer cells in response to tetracycline derived compounds. Stock solutions of each  
35 compound were hydrated in water containing 2% DMSO and pH 10.0. Upon

WO 03/030819

PCT/US02/31730

solubilization, HCl was added to the solution to establish a pH of 7.5-8.0. This solution was then wrapped in foil and kept at 4°C during the 24 hours of assay. Fresh compound was prepared for each assay. The *in vitro* chemoinvasion analyses for tumor cell invasiveness are performed using the Membrane Invasion Culture System 5 (MICS) as previously described.

The MICS system is a thermally treated plastic manifold system consisting of two matched sets of plates containing fourteen wells, 13 mm in diameter. Interposed between these plates was a polycarbonate filter containing 10  $\mu$ m pores and coated 10 with a defined matrix composed of human laminin/collagen IV/gelatin that formed a 35  $\mu$ m thick barrier between the top and bottom sections of the wells in MICS. Prior to placing this barrier in place, the lower wells were filled with serum-free RPMI culture medium made 50% in conditioned medium obtained from 2-day-old cultures of human fibroblasts which had been cleared of cells and cellular debris by either 15 centrifugation, or filtering through a 0.45  $\mu$ m sterile filter. The barrier was then placed on the lower wells and fresh serum-free medium added to the upper wells after assembly of the system. Fifty thousand tumor cells were then added to the wells either in the presence of the compound, or the DMSO vehicle (the controls). Of the 12 assay wells on each manifold, 3 randomized wells acted as controls, 3 wells 20 received 1  $\mu$ g/ml of compound, 3 received 10  $\mu$ g/ml and 3 received 25  $\mu$ g/ml. After 24 hours, cells and media were removed from the lower wells and replaced by phosphate buffered saline plus 2 mM EDTA. This solution was used to remove all cells from the lower well, and this wash was added to the recovered cells plus medium from the same well. These samples were then collected onto a polylysine containing 25 polycarbonate membrane containing 3  $\mu$ m pores using a Dot-Blot manifold system. These collection filters were then fixed in methanol, and stained using Wright's stain (Leukostat staining kit) *in situ*. The filters were then mounted on microscope slides with microscope immersion oil (which reduced the light refraction from the pores) and 5 microscopic fields were counted to calculate the number of cells which invaded 30 through the membrane over the 24 hour period. These numbers were then statistically analyzed as discussed below.

TABLE V

COMPOUND NO	INHIBITORY ACTIVITY OF MATRIX METALLOPROTEINASES (NMPS)					HUMAN CELL LINE EVALUATED AND PERCENT INHIBITION						
	MMP-1	MMP-2	MMP-3	MMP-7	MMP-9	MMP-14	Breast MDA-MB-231	Colon Caco-2	Colon HCT116	Breast MCF-7	Colon RKO	Prostate PC-3
1	267	>100	258	815	43	86	7 <sup>b</sup>	70 <sup>b</sup>	5 <sup>b</sup>	20 <sup>b</sup>	38 <sup>b</sup>	20 <sup>b</sup>
2	479	80	148	>1000	117	119	20	15	20 <sup>b</sup>	25 <sup>b</sup>	27 <sup>b</sup>	15 <sup>b</sup>
3	>1000	>1000	304	>1000	136	216	48	+2	12	30 <sup>b</sup>	22 <sup>b</sup>	56 <sup>b</sup>
4	409	421	219	278	36	61	5	6	2	27 <sup>b</sup>	24 <sup>b</sup>	19 <sup>b</sup>
5	647	86	237	441	194	447	6	+4	46 <sup>b</sup>	15	27 <sup>b</sup>	37 <sup>b</sup>
6	394	135	241	>1000	83	56	+5	+17 <sup>b</sup>	27 <sup>b</sup>	18 <sup>b</sup>	33 <sup>b</sup>	12 <sup>b</sup>
7	R(5)	>1000	300	335	64	>1000	+18	+41 <sup>b</sup>	+27	7	14	+6 <sup>b</sup>
8	>1000	599	252	388	>1000	>1000	+10	+5	+13	13 <sup>b</sup>	41 <sup>b</sup>	40 <sup>b</sup>
9	372	337	154	507	28	29						

COMPOUND NO	INHIBITORY ACTIVITY OF MATRIX METALLOPROTEINASES (NMICs)					HUMAN CELL LINE EVALUATED AND PERCENT INHIBITION						
	MMP-1	MMP-2	MMP-3	MMP-7	MMP-9	MMP-14	MMP-21	Breast MDA-MB-231	Ovarian OVCAR-3	Prostate PC-3	Multiple Myeloma RPMI-8226	Prostate PC-3
10	499	484	96	>1000	41	53	+5	0	8	7	28 <sup>a</sup>	10 <sup>b</sup>
								9	27 <sup>a</sup>	21	22	11
									3	5	29 <sup>b</sup>	9
11	427	>1000	270	>1000	96	46	6	15	36 <sup>b</sup>	16	46 <sup>b</sup>	+3
									41 <sup>b</sup>			0 36 <sup>b</sup>
12	>1000	>1000	390 <sup>b</sup>	503	270	>1000			+11	+13	+12	
13	126	48	206	>1000	64	14	4	0	-9	6	12	+11 +13 +12
												8 23 <sup>b</sup> 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						

COMPOUND NO	INHIBITORY ACTIVITY OF MATRIX METALLOPROTEINASES (nM/RS)				HUMAN CELL LINE EVALUATED AND PERCENT INHIBITION					
	MMP-1	MMP-2	MMP-3	MMP-7	MMP-9	MMP-14	Breast MDA-MB-231	Melanoma TCR161	Multiplet MCF-7 RP-MCF-26	Prostate PC-3 ML
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 <sup>a</sup> 0 +1 73	24 <sup>a</sup> 6 42 <sup>a</sup> 17 <sup>a</sup> 25 <sup>a</sup> 70		
28	>1000	>1000	231		125	49	+24 +36 54 <sup>a</sup> +20 34 <sup>a</sup> 40 <sup>a</sup>	20 9 11 9 55 <sup>a</sup> 7 +10 34 <sup>a</sup> 7 +11 <sup>a</sup> 80		

COMPOUND NO. <sup>1</sup>	INHIBITORY ACTIVITY OF MATRIX METALLOPROTEINASES (nM <sub>50</sub> ) <sup>2</sup>									
	MMP-1	MMP-2	MMP-3	MMP-7	MMP-9	MMP-14	Human Cell Line Evaluated and Percent Inhibition	Multiple	Melanoma	Prostate
							Breast	MDA-MB-21	CR161	PC-3 ML
29	895	983	213		172	98	+7 41 <sup>b</sup> 45 <sup>b</sup> +25 <sup>b</sup> +53 <sup>b</sup> 19 <sup>b</sup>	5 +3 <sup>b</sup> 62 <sup>b</sup>	35 <sup>b</sup> 28 <sup>b</sup> 61 <sup>b</sup>	
30	576	>1000	938		>1000	>1000	+41 <sup>b</sup> 7 59 <sup>b</sup> +13 +25 <sup>b</sup> 17 <sup>b</sup> +10 +14 <sup>b</sup>	12 13 29 <sup>b</sup> 13 35 <sup>b</sup>	8 28 <sup>b</sup> 50 <sup>b</sup> 36 <sup>b</sup>	
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 <sup>b</sup> +1	20 69 <sup>b</sup>	10 546 <sup>b</sup>	11 26 36

COMPOUND NO	INHIBITORY ACTIVITY OF MATRIX METALLOPROTEINASES (nM <sub>50</sub> )						HUMAN CELL LINE EVALUATED AND PERCENT INHIBITION					
	MMP-1	MMP-2	MMP-3	MMP-7	MMP-9	MMP-14	Breast MDA-MB-21	Melanoma C8161	Melanoma RPMI-8226	Prostate PC-3 ML	Mycorna 33 <sup>a</sup>	33 <sup>a</sup> 13 <sup>b</sup> 11 <sup>b</sup>
38	230	175	95		215	69	+14 +12	37 <sup>a</sup> 70 <sup>a</sup>	3 1 66 <sup>a</sup>	+11 37 <sup>a</sup> 41 <sup>a</sup> 41		
39	860	185	682		114	83	18 <sup>a</sup> 29 <sup>a</sup> 76 <sup>a</sup>	10 11 +28 +26	39 4 +49 <sup>a</sup>	+8 38 <sup>a</sup> 27 <sup>b</sup> 52		
40	560	162	91		R	29	9 15 20 <sup>a</sup>	+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			
42	R	606	1357		405	428						
43	600	2482	174		319							
44	1438	1468	224		591							
45	384	2446	194		6626							
46	194	3803	42		59	90	20 <sup>a</sup> +5 +1	21 7 10 7 +11	12 20 16 27 <sup>a</sup>			

COMPOUND NO.	INHIBITORY ACTIVITY OF MATRIX METALLOPROTEINASES (nM) <sup>a</sup>						HUMAN CELL LINE EVALUATED AND PERCENT INHIBITION					
	MMP-1	MMP-2	MMP-3	MMP-7	MMP-9	MMP-14	Breast MDA-MB-231	MDA-MB-231	Prostate PC-3 ML	Multiple Myeloma U266	Prostate RP-MEL226	
47	318	117	68		88	60	+17 +16 <sup>b</sup>	0 +30 +4	+2	28	18	60 <sup>c</sup>
48	12831	1929	506		424	354				3	3	5
49	372	1572	141		489	87	6 +5 +1	27 <sup>b</sup> 7	30 <sup>c</sup>	11 +2	15	4 +5 6
50	211	2533	48		34	40	7 0 2	5 +2	1 +14 +8	+3 +14 +17 +10		
51							+15 <sup>b</sup> +18 +25 <sup>c</sup>	+9 +31 <sup>b</sup> +122 <sup>c</sup>	14 +26 <sup>b</sup>	+2	+4 +13	4
52	>1000	239	>1000	>1000	32	68	5 12 +2 <sup>b</sup>	5 15	30	2 26 <sup>b</sup>	52 <sup>b</sup> 68 <sup>b</sup> 70 <sup>c</sup>	
53							9 49 <sup>b</sup> 83 <sup>b</sup> +40 +158 <sup>b</sup>	83 <sup>b</sup> +95 <sup>b</sup>	19 <sup>c</sup> 33 <sup>b</sup> 46 <sup>b</sup> 31 <sup>b</sup> 48 <sup>b</sup> 63 <sup>c</sup>	84 29 <sup>b</sup> 21 45 <sup>b</sup>		

COMPOUND NO.	INHIBITORY ACTIVITY OF MATRIX METALLOPROTEINASES (nmIC <sub>50</sub> )					CELL LINE EVALUATED AND PERCENT INHIBITION <sup>a</sup>				
	MMP-1	MMP-2	MMP-3	MMP-7	MMP-9	MMP-14	RPMI-8226	ARPK1	ARK	
1	267	>700	258	815	43	86	20 <sup>b</sup>	10 <sup>b</sup>	+9	+8
							21 <sup>b</sup>	29 <sup>b</sup>	+13	1
2	479	80	348	>1000	117	119	+8	+10 <sup>b</sup>	+11	13
							1 <sup>b</sup>	+4 <sup>b</sup>	7 <sup>b</sup>	8
3	>1000	>1000	304	>1000	136	216	+7	+23 <sup>b</sup>	+27 <sup>b</sup>	10
							+22	+3	+24 <sup>b</sup>	
5	647	86	237	441	194	447	6	4	36 <sup>b</sup>	+16
							17	42 <sup>b</sup>	+25 <sup>b</sup>	+11
6	394	135	241	<1000	83	56	+6	+23 <sup>b</sup>	+5	+6
							12 <sup>b</sup>	10	5	11
9	372	337	134	507	28	98	21 <sup>b</sup>	24 <sup>b</sup>	28 <sup>b</sup>	+11
							+14	+21 <sup>b</sup>	7	+15
10	499	484	96	>1000	41	53	3	5	29 <sup>b</sup>	+20 <sup>b</sup>
							NE	NE	NE	20 <sup>b</sup>
13	126	48	206	>1000	64	14	+11	+13	+12	1
							NE	NE	NE	1
							2	+7	+7	

For Table V.

<sup>a</sup>Concentrations of 1, 10 and 25  $\mu$ g/mL were used.<sup>b</sup>Significant, i.e., P<0.05<sup>c</sup>+ = increased invasiveness

NE = not evaluated

R = to be repeated (number times repeated)

<sup>1</sup>IC<sub>50</sub> in  $\mu$ M, unless specified otherwise  
2 Predicted

WO 03/030819

PCT/US02/31730

Key to Table V:

## Compound Substance

- 1: 9-nitro-6-deoxy-5-hydroxytetracycline H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
 2: 9-amino-6-deoxy-5-hydroxytetracycline H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
 3: 9-Isopropylamino-6-deoxy-5-hydroxytetracycline H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
 4: 7-Dimethylamino-6-demethyl-6-deoxy-9-nitrotetracycline H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
 5: Same as 2  
 6: 9-Azido-6-deoxy-5-hydroxytetracycline H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
 7: 9-Amino-7-dimethylamino-6-demethyl-6-deoxytetracycline H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
 8: 9-Acetamido-7-dimethylamino-6-demethyl-6-deoxytetracycline H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
 9: 7-dimethylamino-6-demethyl-6-deoxytetracycline-9-diazonium H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> HCl  
 10: 9-Azido-7-demethylamino-6-demethyl-6-deoxytetracycline H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
 11: 6-Deoxy-5-hydroxytetracycline-9-diazonium H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
 12: 7-Amino-6-deoxy-5-hydroxytetracycline H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
 13: 7,9-Dibromo-6-demethyl-6-deoxytetracycline H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
 14: 7-Amino-6-deoxy-5-hydroxy-9-nitrotetracycline H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
 15: 7-Dimethylamino-6-deoxy-5-hydroxy-tetracycline H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
 16: 9-Acetamido-6-deoxy-5-hydroxytetracycline H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
 17: 7-Di-n-Butylamino-6-deoxy-5-hydroxytetracycline H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
 18: 7-Di-n-Hexylamino-6-deoxy-5-hydroxytetracycline H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
 19: 7-Di-(3,3-dimethylbutyl)amino-6-deoxy-5-hydroxytetracycline H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
 20: 7-Azido-6-deoxy-5-hydroxy-tetracycline H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
 21: 6-Deoxy-5-hydroxytetracycline-7-diazonium H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
 22: 7-Acetamido-9-nitro-6-deoxy-5-hydroxytetracycline H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
 23: 7-Acetamido-6-deoxy-5-hydroxytetracycline H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
 24: 7-Di-n-propylamino-6-deoxy-5-hydroxytetracycline H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
 25: 7-Isobutylamino-6-deoxy-5-hydroxytetracycline H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
 26: 7-Acetamido-9-amino-6-deoxy-5-hydroxytetracycline H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
 27: 7-Isobutylmethylamino-6-deoxy-5-hydroxytetracycline H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

WO 03/030819

PCT/US02/31730

- 28: 6-Deoxy-5-acetoxy-tetracycline H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
29: 7-Acetylisobutylamino-6-deoxy-5-hydroxytetracycline H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
30: 7-Acetamido-6-deoxy-5-hydroxytetracycline-9-diazonium H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
31: 7-Dimethylamino-6-deoxy-5-hydroxytetracycline-9-diazonium H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
32: 7-Cyclobutylamino-6-deoxy-5-hydroxytetracycline H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
33: 7-Cyclobutylmethylamino-6-deoxy-5-hydroxytetracycline H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
34: 4-Dedimethylamino-6-deoxy-5-hydroxytetracycline  
35: 4-Dedimethylamino-6-deoxy-5-hydroxy-9-nitrotetracycline  
36: 9-animo-4-dedimethylamino-6-deoxy-5-hydroxytetracycline sulfate  
37: 4-Dedimethylamino-6-deoxy-5-hydroxytetracycline-9-diazonium sulfate  
38: 7-nitro-9-tertbutyl-6-deoxy-5-hydroxytetracycline H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
39: 9-tertbutyl-6-deoxy-5-hydroxytetracycline H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
40: 7-Nitro-9-tertbutyl-4-dedimethylamino-6-deoxy-5-hydroxytetracycline H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
41: 4-Dedimethylamino-7-dimethylamino-6-demethyl-6-deoxytetracycline H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
42: 7-Acetylamino-9-azido-6-deoxy-5-hydroxy-tetracycline  
43: 9-tertbutyl-6-deoxy-5-hydroxytetracycline-7-diazonium H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
44: 7-Amino-9-tertbutyl-6-deoxy-5-hydroxytetracycline H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
45: 7-Azido-9-tertbutyl-6-deoxy-5-hydroxytetracycline H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
46: 6-deoxy-5-hydroxytetracycline-4-Methiodide  
47: 7-(1,2-benzylcarboxyhydrazine)-6-deoxy-5-hydroxy-tetracycline HCl  
48: 4-Dedimethylamino-7-amino-6-deoxy-5-hydroxyltetracycline H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
49: 7-Amino-9-tertbutyl-4-dedimethyl-6-deoxy-5-hydroxytetracycline- H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
50: 4-Dedimethylamino-9-tertbutyl-6-deoxy-5-hydroxytetracycline-7-diazonium H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
51: 9-(4-fluorophenyl)-6-deoxy-5-hydroxytetracycline  
52: 4-Epi-7-Chlorotetracycline hydrochloride  
53: 6-Demethyl-6-deoxytetracycline HCl

WO 03/030819

PCT/US02/31730

[000104] While the present invention has been described with respect to particular embodiment thereof, it is apparent that numerous other forms and modifications of the invention will be obvious to those skilled in the art. The appended claims and this invention generally should be construed to cover all such obvious forms and 5 modifications, which are within the true spirit and scope of the present invention.

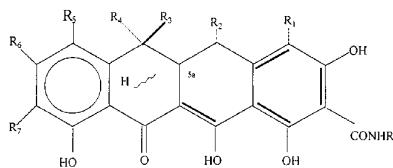
WO 03/030819

PCT/US02/31730

What is claimed is:

1. A treatment for inhibiting microbial or tumor growth which comprises adding to a subject in need of said treatment an effective amount of a tetracycline composition or salt thereof, comprising a general formula:

5



wherein R is selected from  $\text{CH}_2\text{N}(\text{R}_8\text{R}_9)$  or  $\text{CH}_2\text{N}$  X;

10

$\text{R}_8\text{R}_9$  are  $\text{C}_1$  to  $\text{C}_6$  alkyl;

$\text{R}_c$  and  $\text{R}_d$  are  $(\text{CH}_2)_n\text{CHR}_e$ , n is 0 or 1 and  $\text{R}_e$  is H,  $\text{C}_1$  to  $\text{C}_6$  alkyl, or  $\text{NH}_2$ , and X is  $\text{NH}$ , S, or  $\text{CH}_2$ ;

$\text{R}_1$  is H or OH;

15  $\text{R}_2$  is H, OH, =O, or  $\text{OCOR}_8$ , where  $\text{R}_8$  is  $\text{C}_1$  to  $\text{C}_6$  alkyl, or alternatively,  $\text{R}_2$  is  $\text{N}(\text{R}_9)_2$ , where  $\text{R}_9$  is hydrogen or  $\text{C}_1$  to  $\text{C}_6$  lower alkyl, or  $\text{R}_9$  CO, with the proviso that when  $\text{R}_2$  is keto or  $\text{N}(\text{R}_9)_2$ , then  $\text{R}_3$  and  $\text{R}_4$  are H or  $\text{CH}_3$ , and  $\text{R}_3$  and  $\text{R}_4$  are not both  $\text{CH}_3$  or H;

$\text{S}_a$  hydrogen is  $\alpha$  or  $\beta$ ;

20  $\text{R}_3$  and  $\text{R}_4$  are H,  $\text{CH}_3$  or F, with the proviso that when  $\text{R}_3$  is  $\text{CH}_3$ , then  $\text{R}_4$  is H or F, and when  $\text{R}_4$  is  $\text{CH}_3$ , then  $\text{R}_3$  is H or F and  $\text{R}_4$  and  $\text{R}_5$  are not both F;

$\text{R}_5$  and  $\text{R}_7$  are halogen, H,  $\text{NO}_2$ ,  $\text{N}_3$ ,  $\text{N}_2^+$ ,  $\text{C}_2\text{H}_5\text{OC}(\text{S})\text{S}^-$ ,  $\text{CN}$ ,  $\text{NR}_{10}\text{R}_{11}$ , where  $\text{R}_{10}$  and  $\text{R}_{11}$  are H,  $\text{C}_1$  to  $\text{C}_{10}$  alkyl, and  $\text{R}_{12}(\text{CH}_2)_n\text{CO}^-$ , where n is 0 to 5 and  $\text{R}_9$  is H,  $\text{NH}_2$ , mono or disubstituted amino selected from straight, branched or cyclized  $\text{C}_1$  to  $\text{C}_{10}$

25 alkyl groups, with the proviso that  $\text{R}_{10}$  and  $\text{R}_{11}$  are not both  $\text{R}_{12}(\text{CH}_2)_n\text{CO}^-$ ;

$\text{R}_7$ , alternatively, is tertiary butyl; and

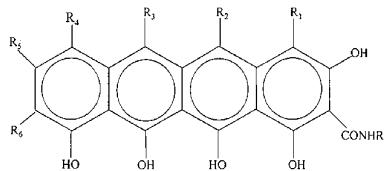
$\text{R}_6$  is halogen, acetylene,  $\text{R}_{13}\text{-C}_6\text{H}_5$ , where  $\text{R}_{13}$  is  $\text{NO}_2$ , halogen, acetyl amino, amino, phenyl, alkyl, or alkoxy.

WO 03/030819

PCT/US02/31730

2. A treatment for inhibiting microbial or tumor growth which comprises adding to a subject in need of said treatment an effective amount of a tetracycline composition or salt thereof, comprising a general formula:

5



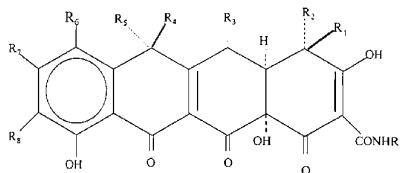
wherein R is selected from  $\text{CH}_2\text{N}(\text{R}_3\text{R}_6)$  or  $\text{CH}_2\text{N}$   $\text{X}$ ;

- 10 where  $\text{R}_3\text{R}_6$  are  $\text{C}_1$  to  $\text{C}_6$  alkyl;  
 $\text{R}_c$  and  $\text{R}_d$  are  $(\text{CH}_2)_n\text{CHR}_e$ , n is 0 or 1 and  $\text{R}_e$  is H,  $\text{C}_1$  to  $\text{C}_6$  alkyl, or  $\text{NH}_2$ , and  $\text{X}$  is  $\text{NH}$ ,  $\text{S}$ , or  $\text{CH}_2$ ;  
 $\text{R}_1$  is H or OH;  
 $\text{R}_2$  is H or OH;  
15  $\text{R}_3$  is H or  $\text{CH}_3$ ;  
 $\text{R}_4$  and  $\text{R}_6$  are halogen, H,  $\text{NO}_2$ ,  $\text{N}_3$ ,  $\text{N}_2^+$ ,  $\text{C}_2\text{H}_5\text{OC}(\text{S})\text{S}^-$ ,  $\text{CN}$ ,  $\text{NR}_7\text{R}_8$ , where  $\text{R}_7$  and  $\text{R}_8$  are H,  $\text{C}_1$  to  $\text{C}_{10}$  alkyl, and  $\text{R}_9(\text{CH}_2)_n\text{CO}^-$ , where n is 0 to 5 and  $\text{R}_9$  is H,  $\text{NH}_2$ , mono or disubstituted amino selected from straight, branched or cyclic  $\text{C}_1$ - $\text{C}_{10}$  alkyl, with the proviso that  $\text{R}_7$  and  $\text{R}_8$  are not both  $\text{R}_9(\text{CH}_2)_n\text{CO}^-$ ;  
20  $\text{R}_6$  is H or halogen, acetylene,  $\text{R}_{10}\text{-C}_6\text{H}_5$ , where  $\text{R}_{10}$  is  $\text{NO}_2$ , halogen, acetylarnino, amino, phenyl, alkyl, or alkoxy.

3. A treatment for inhibiting microbial or tumor growth which comprises adding to a subject in need of said treatment an effective amount of a tetracycline composition or salt thereof, comprising a general formula:

WO 03/030819

PCT/US02/31730

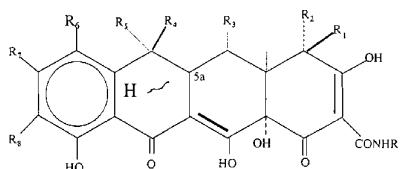


- wherein R is selected from  $\text{CH}_2\text{N}(\text{R}_9\text{R}_{10})$  or  $\text{CH}_2\text{N} \begin{array}{c} \text{R}_c \\ \diagup \\ \diagdown \\ \text{R}_d \end{array} \text{X}$ ;
- 5 where  $\text{R}_9\text{R}_{10}$  are  $\text{C}_1\text{-C}_6$  alkyl;
- $\text{R}_c$  and  $\text{R}_d$  are  $(\text{CH}_2)_n\text{CHR}_e$ , n is 0 or 1 and  $\text{R}_e$  is H,  $\text{C}_1$  to  $\text{C}_6$  alkyl, or  $\text{NH}_2$ , and X is  $\text{NH}$ , S, or  $\text{CH}_2$ ;
- $\text{R}_1$  and  $\text{R}_2$  are H or  $\text{N}(\text{R}_9)_2$ , where  $\text{R}_9$  is H or  $\text{C}_1$  to  $\text{C}_6$  alkyl with the proviso that  $\text{R}_1$  and  $\text{R}_2$  are not both  $\text{N}(\text{R}_9)_2$ ,  $\text{R}_1$  and  $\text{R}_2$  are also  $\text{N}(\text{R}_{10})_3$  I, where  $\text{R}_{10}$  is  $\text{C}_1$  to  $\text{C}_6$  alkyl,
- 10 with the proviso that  $\text{R}_1$  and  $\text{R}_1$  are not both  $\text{N}(\text{R}_{10})_3$  I;
- $\text{R}_3$  is H;
- $\text{R}_4$  and  $\text{R}_5$  are H,  $\text{CH}_3$  or F, with the proviso that when  $\text{R}_4$  is  $\text{CH}_3$ , then  $\text{R}_5$  is H or F, and when  $\text{R}_5$  is  $\text{CH}_3$ , then  $\text{R}_4$  is H or F, and  $\text{R}_4$  and  $\text{R}_5$  are not both F;
- $\text{R}_6$  and  $\text{R}_8$  are halogen, H,  $\text{NO}_2$ ,  $\text{N}_3$ ,  $\text{N}_2^+$ ,  $\text{C}_2\text{H}_5\text{OC}(\text{S})\text{S}^-$ ,  $\text{CN}$ ,  $\text{NR}_{11}\text{R}_{12}$ , where  $\text{R}_{11}$  and  $15 \text{R}_{12}$  are H,  $\text{C}_1$  to  $\text{C}_{10}$  alkyl, and  $\text{R}_{13}(\text{CH}_2)_n\text{CO}^-$ , where n is 0 to 5 and  $\text{R}_{13}$  is H,  $\text{NH}_2$ , mono or disubstituted amino selected from straight, branched or cyclized  $\text{C}_1\text{-C}_{10}$  alkyl groups, with the proviso that  $\text{R}_{10}$  and  $\text{R}_{11}$  are not both  $\text{R}_{12}(\text{CH}_2)_n\text{CO}^-$ ; and
- $\text{R}_8$  can also be tertiary butyl and  $\text{R}_7$  is H or halogen.

- 20 4. A treatment for inhibiting microbial or tumor growth which comprises adding to a subject in need of said treatment an effective amount of a tetracycline composition or salt thereof, comprising a general formula:

WO 03/030819

PCT/US02/31730



wherein R is selected from  $\text{CH}_2\text{N}(\text{R}_5\text{R}_6)$  or  $\text{CH}_2\text{N} \begin{array}{c} \text{R}_c \\ \diagup \\ \diagdown \\ \text{R}_d \end{array} \text{X}$ ;

5     $\text{R}_5$   $\text{R}_6$  are  $\text{C}_1\text{-C}_6$ ;

$\text{R}_c$  and  $\text{R}_d$  are  $(\text{CH}_2)_n\text{CHR}_e$ , n is 0 or 1,  $\text{R}_e$  is H, alkyl ( $\text{C}_1$  to  $\text{C}_6$ ),  $\text{NH}_2$ , and X is NH, S, or  $\text{CH}_2$ ;

10    $\text{R}_1$  and  $\text{R}_2$  are H or  $\text{N}(\text{R}_9)_2$  where  $\text{R}_9$  is hydrogen or lower alkyl ( $\text{C}_1$  to  $\text{C}_6$ ), with the proviso that  $\text{R}_1$  and  $\text{R}_2$  can not both be  $\text{N}(\text{R}_9)_2$ .

$\text{R}_3$  is H, OH, =O,  $\text{OCOR}_{10}$ , where  $\text{R}_{10}$  is  $\text{C}_1$  to  $\text{C}_6$ , or alternatively,  $\text{R}_3$  is  $\text{N}(\text{R}_9)_2$  where  $\text{R}_9$  is hydrogen or  $\text{C}_1$  to  $\text{C}_6$ , with the proviso that when  $\text{R}_{23}$  is =O or  $\text{N}(\text{R}_9)_2$ ,

15   then  $\text{R}_4$  and  $\text{R}_5$  are H or  $\text{CH}_3$  and  $\text{R}_4$  and  $\text{R}_5$  are not both  $\text{CH}_3$  or H;

5a hydrogen is  $\alpha$  or  $\beta$ ;

$\text{R}_4$  and  $\text{R}_5$  are H,  $\text{CH}_3$  or F, with the proviso that when  $\text{R}_4$  is  $\text{CH}_3$ , then  $\text{R}_5$  is H or F, and when  $\text{R}_5$  is  $\text{CH}_3$  then  $\text{R}_4$  is H or F and  $\text{R}_4$  and  $\text{R}_5$  are not both F;

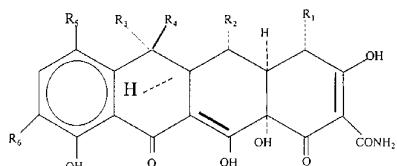
20    $\text{R}_6$  and  $\text{R}_8$  are halogen, H,  $\text{NO}_2$ ,  $\text{N}_3$ ,  $\text{N}_2^+$ ,  $\text{C}_2\text{H}_5\text{OC}(\text{S})\text{S}^-$ , CN,  $\text{NR}_{10}\text{R}_{11}$ , where  $\text{R}_{10}$  and  $\text{R}_{11}$  are H, alkyl ( $\text{C}_1$  to  $\text{C}_{10}$ ), and  $\text{R}_{12}(\text{CH}_2)_n\text{CO}^-$ , where n is 0 to 5 and  $\text{R}_{12}$  is H,  $\text{NH}_2$ , mono or disubstituted amino selected from straight, branched or cyclized  $\text{C}_1$  to  $\text{C}_{10}$  groups, with the proviso that  $\text{R}_{10}$  and  $\text{R}_{11}$  are both  $\text{R}_{12}(\text{CH}_2)_n\text{CO}^-$ , or, alternatively,  $\text{R}_3$  is tertiary butyl;

25    $\text{R}_7$  is H or halogen, acetylene,  $\text{R}_{12}\text{-C}_6\text{H}_5$ , where  $\text{R}_{12}$  is  $\text{NO}_2$ , halogen, acetyl amino, amino, phenyl, alkyl, or alkoxy.

WO 03/030819

PCT/US02/31730

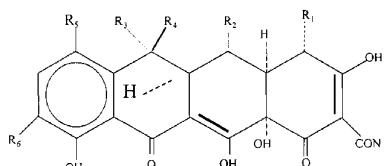
5. A treatment for inhibiting microbial or tumor growth which comprises adding to a subject in need of said treatment an effective amount of a tetracycline composition or salt thereof, comprising a general formula:



5

wherein  $R_1$  is H or  $N(CH_3)_2$ ;  $R_2$  is H,  $CH_3$  or  $OCOCH_3$ ;  $R_3$  is H or  $CH_3$ ;  $R_4$  is H;  $R_5$  is H,  $N(CH_3)_2$ ,  $NH_2$ ,  $N(C_4H_9)_2$ ,  $N(C_6H_{13})_2$ ,  $N(3,3 - \text{dimethylbutyl})_2$ ,  $N_3$ ,  $N_2^+$ ,  $NO_2$ ,  $NHCOCH_3$ ,  $NH(n\text{-propyl})_2$ ,  $NH\text{-isobutyl}$ ,  $NH\text{-isobutylmethyl}$ ,  $NH\text{(cyclobutyl)}$ ,  $NH\text{(cyclobutyl methyl)}$ ; and  $R_6$  is H,  $NO_2$ ,  $NH_2$ ,  $(CH_3)_2CHNH$ ,  $N_3$ ,  $NHCOCH_3$ ,  $N_2^+$ ,  $N_3$  or  $(CH_3)_2C$ .

6. A treatment for inhibiting microbial or tumor growth which comprises  
adding to a subject in need of said treatment an effective amount of a tetracycline  
15 composition or salt thereof, comprising a general formula:



wherein  $R_1$  is H or  $N(CH_3)_2$ ;  $R_2$  is H, OH or  $OCOCH_3$ ;  $R_3$  is H or  $CH_3$ ;  $R_4$  is H;  $R_5$  is H,  $N(CH_3)_2$ ;  $N(C_2H_5)_2$ ,  $N(C_6H_5)_2$ ,  $N(3,3\text{-dimethylbutyl})_2$ ;  $N_3$ ,  $N_2^+$ ,  $NO_2$ ,  $NHCOCH_3$ ,  
 20  $NH(n\text{-propyl})_2$ ,  $NH\text{-isobutyl}$ ,  $NH\text{-isobutylmethyl}$ ,  $N(CH_3CO)(isobutyl)$ ,  
 $NH(cyclobutyl)$ ,  $NH(cyclobutyl\text{ methyl})$ , or  $NH_2$ ; and  $R_6$  is H,  $NO_2$ ,  $NH_2$ ,  $(CH_3)_2$   
 $CHNH$ ,  $N_3$ ,  $NHCOCH_3$ ,  $N_2^+$ , or  $(CH_3)_3C$ .

## 【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

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

(19) World Intellectual Property Organization International Bureau

(43) International Publication Date  
17 April 2003 (17.04.2003)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 2003/030819 A3

(51) International Patent Classification? A61K 31/65 (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SL, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(21) International Application Number: PCT/US2002/031730

(22) International Filing Date: 4 October 2002 (04.10.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data: 60/327,502 5 October 2001 (05.10.2001) US

(71) Applicant (for all designated States except US): TETRAGENEX PHARMACEUTICALS, INC. [US/US]; 1 Maynard Drive, Park Ridge, NJ 07656 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): HLAVKA, Joseph [US/US]; Tower Hill Road, Tuxedo Park, NY 10987 (US); ABLIN, Richard, J. [US/US]; 69 Buena Vista Drive, Ringwood, NJ 07456 (US).

(74) Agent: PAIKOFF, Richard, A., Duane Morris LLP, One Liberty Place, Philadelphia, PA 19103-7396 (US).

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CE, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:  
— with international search report

(88) Date of publication of the international search report: 8 January 2004

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



WO 2003/030819 A3

(54) Title: TETRACYCLINE DERIVATIVES AND METHODS OF USE THEREOF

(57) Abstract: A treatment for inhibiting microbial or tumor growth is disclosed, which comprises adding to a subject in need of treatment an effective amount of one or more tetracycline derivatives.

## 【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US02/31730												
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(7) : A61K 31/65 US CL : 514/152 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC														
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 514/152														
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched														
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) REGISTRY, CAPLUS, USPATFULL, BEILSTEIN														
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Category *</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center; padding: 2px;">X</td> <td style="padding: 2px;">US 5,494,903 A (HLAVKA et al.) 27 February 1996 (27.02.1996), see the entire article, especially col. 95, compounds J1-PP.</td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">4</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; padding: 2px;">X</td> <td style="padding: 2px;">US 5,495,030 A (SLUM et al.) 27 February 1996 (27.02.1996), see the entire article, especially col. 24, compounds AA-EE.</td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">5 and 6</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; padding: 2px;">X</td> <td style="padding: 2px;">US 5,776,898 A (TEICHER et al.) 07 July 1998 (07.07.1998), see the entire article, especially col. 4, lines 64-67; col. 5, lines 19-31; col. 19, lines 24-40.</td> <td style="text-align: center; padding: 2px;"></td> </tr> </tbody> </table>			Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X	US 5,494,903 A (HLAVKA et al.) 27 February 1996 (27.02.1996), see the entire article, especially col. 95, compounds J1-PP.	4	X	US 5,495,030 A (SLUM et al.) 27 February 1996 (27.02.1996), see the entire article, especially col. 24, compounds AA-EE.	5 and 6	X	US 5,776,898 A (TEICHER et al.) 07 July 1998 (07.07.1998), see the entire article, especially col. 4, lines 64-67; col. 5, lines 19-31; col. 19, lines 24-40.	
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.												
X	US 5,494,903 A (HLAVKA et al.) 27 February 1996 (27.02.1996), see the entire article, especially col. 95, compounds J1-PP.	4												
X	US 5,495,030 A (SLUM et al.) 27 February 1996 (27.02.1996), see the entire article, especially col. 24, compounds AA-EE.	5 and 6												
X	US 5,776,898 A (TEICHER et al.) 07 July 1998 (07.07.1998), see the entire article, especially col. 4, lines 64-67; col. 5, lines 19-31; col. 19, lines 24-40.													
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.														
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "B" earlier application or patent published on or after the international filing date "I" document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "Q" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed														
Date of the actual completion of the international search 24 March 2003 (24.03.2003)		Date of mailing of the international search report 14 July 2003												
Name and mailing address of the ISA/US United States Patent and Trademark Office 1400 L Street, N.W. Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703)305-3230														
Authorized officer Barbara P. Bridger, Ph.D. Telephone No. 703-308-1235														

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

<b>INTERNATIONAL SEARCH REPORT</b>		International application No. PCT/US02/31730
<b>Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)</b>		
<p>This international report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. <input type="checkbox"/> Claim Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:</li> <li>2. <input type="checkbox"/> Claim Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:</li> <li>3. <input type="checkbox"/> Claim Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).</li> </ol>		
<b>Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)</b>		
<p>This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows: Please See Continuation Sheet</p>		
<ol style="list-style-type: none"> <li>1. <input checked="" type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.</li> <li>2. <input type="checkbox"/> As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.</li> <li>3. <input type="checkbox"/> As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:</li> <li>4. <input type="checkbox"/> No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:</li> </ol>		
<p><b>Remark on Protest</b></p> <p><input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.</p>		

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet(1)) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT	PCT/US02/31730
<p><b>BOX II. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING</b></p> <p>Group I, claim(s) 1, drawn to a method of inhibiting microbial or tumor growth utilizing the compounds as defined by claim 1.</p> <p>Group II, claim(s) 2, drawn to a method of inhibiting microbial or tumor growth utilizing the compounds as defined by claim 2.</p> <p>Group III, claim(s) 3, drawn to a method of inhibiting microbial or tumor growth utilizing the compounds as defined by claim 3.</p> <p>Group IV, claim(s) 4, 5 and 6, drawn to a method of inhibiting microbial or tumor growth utilizing the compounds as defined by claims 4, 5 and 6.</p>	

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

---

フロントページの続き

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW, ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES, FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,N O,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 アブリン リチャード ジェイ

アメリカ合衆国 ニュージャージー州 07456 リングウッド ブエナビスタドライブ 69

F ターム(参考) 4C086 AA01 AA02 DA29 MA01 MA04 NA14 ZB26 ZB35

4H006 AA03 AB28 AB29 BJ30 BM30 BM71 BN30 BR70 BU26 BV72