



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: 2004109986/14, 04.10.2002

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
04.10.2002

(30) Конвенционный приоритет:
05.10.2001 US 60/327502

(43) Дата публикации заявки: 20.02.2005

(45) Опубликовано: 10.06.2007 Бюл. № 16

(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: US 5494903 A, 27.02.1996. RU 2125985
C1, 10.02.1999. US 5834450, 10.11.1998. US
6277061 B1, 21.08.2001. US 5837696,
17.11.1998. Беликов В.Г. Фармацевтическая
химия, М., Высшая школа, 1993, т.1, с.43-47.

(85) Дата перевода заявки РСТ на национальную фазу:
05.05.2004

(86) Заявка РСТ:
US 02/31730 (04.10.2002)

(87) Публикация РСТ:
WO 03/030819 (17.04.2003)

Адрес для переписки:
191186, Санкт-Петербург, а/я 230, "АПС-
ПАТЕНТ", пат.пов. В.М.Рыбакову, рег. № 90

(72) Автор(ы):

ХЛАВКА Джозеф (US),
АБЛИН Ричард Дж. (US)

(73) Патентообладатель(и):

ТЕТРАДЖЕНЕКС ФАРМАСЬЮТИКАЛС, ИНК.
(US)

(54) ПРОИЗВОДНЫЕ ТЕТРАЦИКЛИНА И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(57) Реферат:

Изобретение относится к медицине, в частности к онкологии, и касается вариантов способа лечения рака, включающего введение субъекту, нуждающемуся в таком лечении, эффективного количества 9-амино-6-дезоксид-5-гидрокситетрациклина или его соли, либо 9-нитро-6-дезоксид-5-гидрокситетрациклина или его соли. При этом рак выбран из группы, включающей рак

молочной железы, меланому, миелому и рак простаты. Изобретение обеспечивает противоопухолевый, антимагистатический эффект и увеличение коэффициента выживаемости за счет установленного ингибирования указанными производными тетрациклина матриксразрушающих металлопротеиназ, причем без значительной потери веса тела. 2 н. и 2 з.п. ф-лы, 5 табл.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(51) Int. Cl.

A61K 31/65 (2006.01)**A61P 31/04** (2006.01)**A61P 35/00** (2006.01)(12) **ABSTRACT OF INVENTION**(21), (22) Application: **2004109986/14, 04.10.2002**(24) Effective date for property rights: **04.10.2002**(30) Priority:
05.10.2001 US 60/327502(43) Application published: **20.02.2005**(45) Date of publication: **10.06.2007 Bull. 16**(85) Commencement of national phase: **05.05.2004**(86) PCT application:
US 02/31730 (04.10.2002)(87) PCT publication:
WO 03/030819 (17.04.2003)Mail address:
**191186, Sankt-Peterburg, a/ja 230, "ARS-
PATENT", pat.pov. V.M.Rybakovu, reg. № 90**(72) Inventor(s):
**KhLAVKA Dzhozef (US),
ABLIN Richard Dzh. (US)**(73) Proprietor(s):
TETRADZhENEKS FARMAS'JuTIKALS, INK. (US)(54) **TETRACYCLINE DERIVATIVES AND METHODS FOR THEIR USING**

(57) Abstract:

FIELD: medicine, oncology, biochemistry, antibiotics.

SUBSTANCE: invention relates to variants used in treatment of cancer. Method involves administration in a patient needing with such treatment of the effective dose of 9-amino-6-deoxy-5-hydroxytetracycline or its salt, or 9-nitro-6-deoxy-5-hydroxytetracycline or its salt for aims in treatment of breast cancer, melanoma,

myeloma and prostate gland cancer. Invention provides anti-tumor, anti-metastatic effect and the elevating viability index based on inhibition of matrix-destructing metalloproteinase by indicated derivatives of tetracycline and without significant body weight loss.

EFFECT: valuable medicinal properties of derivatives, enhanced effectiveness of treatment.

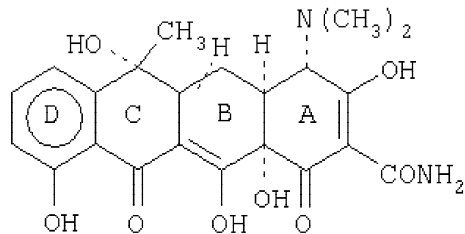
4 cl, 5 tbl

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

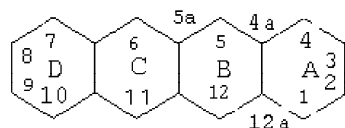
Настоящее изобретение касается новых производных тетрациклина, способов получения новых производных и способов применения этих производных.

ПРЕДШЕСТВУЮЩИЙ УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Соединение тетрациклин имеет следующую общую структуру:



Система нумерации циклических ядер представляет собой следующее:



Тетрациклин, а также его производные 5-ОН (террамицин) и 7-Cl (ауреомицин) существуют в природе и являются хорошо известными антибиотиками. Природный тетрациклин может быть модифицирован без потери его антибиотических свойств, хотя определенные элементы структуры должны сохраняться. Модификации, которые могут и не могут быть сделаны в основной тетрациклиновой структуре, были представлены в обзоре Mitscher в The Chemistry of Tetracyclines, Chapter 6, Marcel Dekker, Publishers, New York (1978). Согласно Mitscher, заместители в положениях 5-9 тетрациклиновой кольцевой системы могут быть модифицированы без полной потери антибиотических свойств. Однако изменения в основной кольцевой системе или замена заместителей в положениях 1-4 и 10-12 обычно приводят к образованию синтетических тетрациклинов со значительно меньшей антимикробной активностью или фактически неактивных. Некоторые примеры химически модифицированных неантимикробных тетрациклинов (в дальнейшем ХМТ) представляют собой 4-дедиметиламино-тетрациклин, 4-дедиметиламиносанциклин(6-деметил-6-дезоксид-4-дедиметиламинотетрациклин), 4-дедиметиламиноиноциклин(7-диметиламино-4-дедиметиламинотетрациклин) и 4-дедиметиламинодоксициклин(5-гидрокси-6-дезоксид-4-дедиметиламинотетрациклин).

Некоторые производные 4-дедиметиламинотетрациклина раскрыты в Патентах US 3029284 и US 5122519. Они включают 6-деметил-6-дезоксид-4-дедиметиламинотетрациклин и 5-гидрокси-6-дезоксид-4-дедиметиламинотетрациклин с водородом и другими заместителями в C7- и C9-положениях в D-кольце. Эти заместители включают амина, нитро, ди-(низший алкил)амино и моно-(низший алкил)амино или галоген. Авторы упоминают, что производные 6-деметил-6-дезоксид-4-дедиметиламинотетрациклина и производные 5-гидрокси-6-дезоксид-4-дедиметиламинотетрациклина полезны в качестве антимикробных агентов.

Другие производные 4-дедиметиламинотетрациклина с оксим-группой в C4-положении в A-кольце раскрыты в Патентах US 3622627 и US 3824285. Эти оксим-производные имеют водород и галоген в качестве заместителей в C7-положении и включают 7-галоген-6-деметил-6-дезоксид-4-дедиметиламино-4-оксиминотетрациклин и 7-галоген-5-гидрокси-6-дезоксид-4-дедиметиламино-4-оксиминотетрациклин.

Группы алкиламино (МН-алкил) и алкилгидразон (N-NH-алкил) были замещены в A-кольце в C4-положении 4-дедиметиламинотетрациклина. Эти соединения известны своими антимикробными свойствами. См. Патенты US 3345370, US 3609188, US 3622627, US 3502660, US 3509184, US 3502696, US 3515731, US 3265732, US 5122519, US 3849493, US 3772363 и US 3829453.

Было описано, что кроме антимикробных свойств тетрациклины имеют и некоторые другие применения. Например, известно также, что тетрациклины ингибируют активность ферментов, разрушающих коллаген, таких как матриксные металлопротеиназы (MMP),

включая коллагеназы (MMP-1), желатиназу (MMP-2) и стромелизин (MMP-3) (Golub et al., J. Periodont. Res. 20:12-23 (1985); Golub et al. Crit. Revs. Oral Biol. Med. 2:297-322 (1991); Патенты US 4666897, US 4704383, US 4935411, US 4935412). Известно также, что тетрациклины ингибируют атрофию и деградацию белков в скелетных мышцах

5 млекопитающих (Патент US 5045538) и увеличивают продукцию IL-10 в клетках млекопитающих.

Кроме того, сообщалось, что тетрациклины увеличивают белковый синтез в костях (Патент US Re. 34656) и уменьшают резорбцию кости в органной культуре (Патент US 4704383).

10 Аналогично, Golub с соавт. в Патенте US 5532227 раскрывают, что тетрациклины могут воздействовать на избыточное гликозилирование белков. В частности, тетрациклины ингибируют избыточное перекрестное связывание коллагена, которое является результатом избыточного гликозилирования коллагена при диабете.

Известно, что тетрациклины ингибируют избыточную активность фосфолипазы A₂,

15 вовлеченной в воспалительные состояния, такие как псориаз, как раскрыто в Патенте US 5532227. Кроме того, также известно, что тетрациклины ингибируют циклооксигеназу-2 (COX-2), фактор некроза опухоли (TNF), окись азота и IL-1 (интерлейкин-1).

Эти свойства делают тетрациклины полезными в лечении множества заболеваний.

Например, существует множество предположений, что тетрациклины, включая

20 неантимикробные тетрациклины, эффективны в лечении артрита. См., например, 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

25 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

30 Minocycline or Placebo," Arthritis Rheum 40:842-848 (1997).

Предположили, что тетрациклины могут быть использованы для лечения кожных заболеваний. Например, White с соавт. (Lancet, Apr. 29, p.966 (1989)) сообщают, что тетрациклин миноциклин эффективен в лечении дистрофического врожденного буллезного

35 эпидермолиза, который является жизнеопасным кожным заболеванием, связанным, как полагают, с избытком коллагеназы.

Кроме того, исследования также позволили предположить, что тетрациклины и ингибиторы металлопротеиназ ингибируют развитие опухоли (DeClerck et al., Annals N.Y. Acad. Sci., 732:222-232, 1994), резорбцию кости (Rifkin et al., Annals N.Y. Acad. Sci., 732:165-180, 1994), ангиогенез (Maragoudakis et al., Br. J. Pharmacol., 111:894-

40 902, (1994) и могут обладать противовоспалительными свойствами (Ramamurthy et al., Annals N.Y. Acad. Sci., 732, 427-430, 1994).

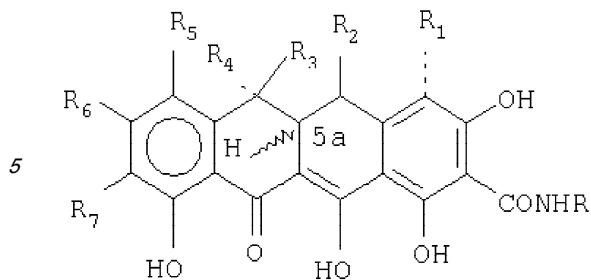
На основе вышесказанного можно сделать вывод, что тетрациклины эффективны в лечении многочисленных заболеваний и состояний. Поэтому существует потребность в новых и еще более полезных производных тетрациклина.

45 СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

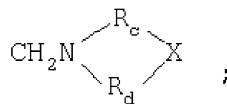
Соединения, раскрытые здесь, являются производными тетрациклина, которые проявляют антимикробную и/или противораковую активность.

В предпочтительной форме осуществления настоящее изобретение относится к способу

50 лечения, направленного на ингибирование микробного или опухолевого роста, включающему введение субъекту, нуждающемуся в таком лечении, эффективного количества тетрациклинового соединения или его соли общей формулы:



10 в которой R выбран из $\text{CH}_2\text{N}(\text{R}_a\text{R}_b)$ или



R_aR_b представляют собой $\text{C}_1\text{-C}_6$ -алкил;

R_c и R_d представляют собой $(\text{CH}_2)_n\text{CHR}_e$, n означает 0 или 1, и R_e представляет собой

15 H, $\text{C}_1\text{-C}_6$ -алкил или NH_2 , и X представляет собой NH, S или CH_2 ;

R_1 представляет собой H или OH;

R_2 представляет собой H, OH, =O или OCOR_8 , где R_8 представляет собой $\text{C}_1\text{-C}_6$ -алкил, или альтернативно, R_2 представляет собой $\text{N}(\text{R}_9)_2$, где R_9 представляет собой водород или $\text{C}_1\text{-C}_6$ -низший алкил, или R_9CO , при условии, что если R_2 представляет собой кетогруппу или $\text{N}(\text{R}_9)_2$, то R_2 и R_4 представляют собой H или CH_3 , и R_3 и R_4 не являются одновременно CH_3 или H;

5a водород является α - или β -;

R_3 и R_4 представляют собой H, CH_3 или F, при условии, что если R_3 представляет собой CH_3 , то R_4 представляет собой H или F, и если R_4 представляет собой CH_3 , то R_3

25 представляет собой H или F, и R_4 и R_5 не являются одновременно F;

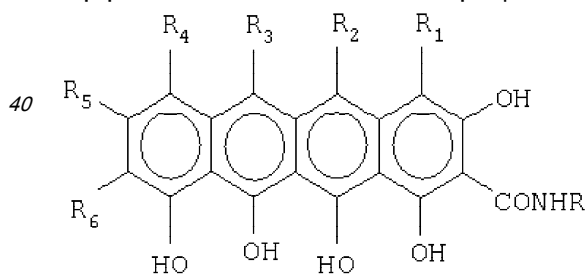
R_5 и R_7 представляют собой галоген, H, NO_2 , N_3 , N_2^+ , $\text{C}_2\text{H}_5\text{OC}(\text{S})\text{S}-$, CN, $\text{NR}_{10}\text{R}_{11}$, где R_{10} и R_{11} представляют собой H, $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ -алкил и $\text{R}_{12}(\text{CH}_2)_n\text{CO}-$, где n означает от 0 до 5, и R_9 представляет собой H, NH_2 , моно- или ди-замещенный амин, выбранный из прямой, разветвленной или циклической $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ -алкильной группы, при условии, что R_{10} и R_{11} не являются одновременно $\text{R}_{12}(\text{CH}_2)_n\text{CO}-$;

30 R_7 , альтернативно, представляет собой четвертичный бутил; и

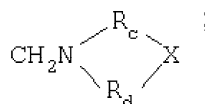
R_6 представляет собой галоген, ацетилен, $\text{R}_{13}\text{-C}_6\text{H}_5$, где R_{13} представляет собой NO_2 , галоген, ацетиламино, амина, фенил, алкил или алкокси.

В еще одной предпочтительной форме осуществления, настоящее изобретение

35 относится к способу лечения, направленного на ингибирование микробного или опухолевого роста, включающему введение субъекту, нуждающемуся в таком лечении, эффективного количества тетрациклинового соединения или его соли общей формулы:



45 в которой R выбран из $\text{CH}_2\text{N}(\text{R}_a\text{R}_b)$ или



где R_aR_b представляют собой $\text{C}_1\text{-C}_6$ -алкил;

R_c и R_d представляют собой $(\text{CH}_2)_n\text{CHR}_e$, n означает 0 или 1, и R_e представляет собой

50 H, $\text{C}_1\text{-C}_6$ -алкил или NH_2 , и X представляет собой NH, S или CH_2 ;

R_1 представляет собой H или OH;

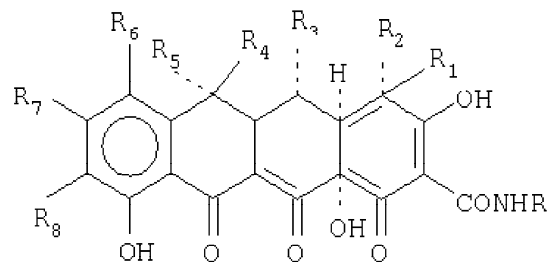
R_2 представляет собой H или OH;

R_3 представляет собой H или CH_3 ;

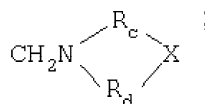
R_4 и R_6 представляют собой галоген, H, NO_2 , N_3 , N_2^+ , $\text{C}_2\text{H}_5\text{OC}(\text{S})\text{S}-$, CN, NR_7R_8 , где R_7 и R_8 представляют собой H, $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ -алкил и $\text{R}_9(\text{CH}_2)_n\text{CO}-$, где n означает от 0 до 5, и R_9 представляет собой H, NH_2 , моно- или дизамещенный амин, выбранный из прямого, разветвленного или циклического $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ -алкила, при условии, что R_7 и R_8 не являются одновременно $\text{R}_9(\text{CH}_2)_n\text{CO}-$; и

R_6 представляет собой H или галоген, ацетилен, $\text{R}_{10}\text{-C}_6\text{H}_5$, где R_{10} представляет собой NO_2 , галоген, ацетиламино, амина, фенил, алкил или алкокси.

В еще одной предпочтительной форме осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения, направленного на ингибирование микробного или опухолевого роста, включающему введение субъекту, нуждающемуся в таком лечении, эффективного количества тетрациклинового соединения или его соли общей формулы:



в которой R выбран из $\text{CH}_2\text{N}(\text{R}_a\text{R}_b)$ или



где R_aR_b представляют собой $\text{C}_1\text{-C}_6$ -алкил;

R_c и R_d представляют собой $(\text{CH}_2)_n\text{CHR}_e$, n означает 0 или 1, и R_e представляет собой H, $\text{C}_1\text{-C}_6$ -алкил или NH_2 , и X представляет собой NH, S или CH_2 ;

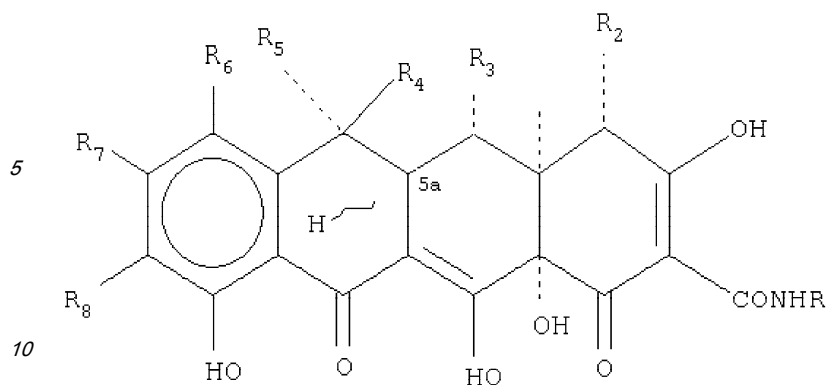
R_1 и R_2 представляют собой H или $\text{N}(\text{R}_9)_2$, где R_9 представляет собой H или $\text{C}_1\text{-C}_6$ -алкил при условии, что R_1 и R_2 не являются одновременно $\text{N}(\text{R}_9)_2$, R_1 и R_2 представляют собой также $\text{N}(\text{R}_{10})_3$, где R_{10} представляет собой $\text{C}_1\text{-C}_6$ -алкил, при условии, что R_1 и R_2 не являются одновременно $\text{N}(\text{R}_{10})_3$;

R_3 представляет собой H;

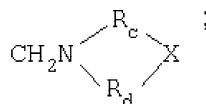
R_4 и R_5 представляют собой H, CH_3 или F, при условии, что если R_4 представляет собой CH_3 , то R_5 представляет собой H или F, и если R_5 представляет собой CH_3 , то R_4 представляет собой H или F, и R_4 и R_5 не являются одновременно F;

R_6 и R_8 представляют собой галоген, H, NO_2 , N_3 , N_2^+ , $\text{C}_2\text{H}_5\text{OC}(\text{S})\text{S}-$, CN, $\text{NR}_{11}\text{R}_{12}$, где R_{11} и R_{12} представляют собой H, $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ -алкил и $\text{R}_{13}(\text{CH}_2)_n\text{CO}-$, где n означает от 0 до 5, и R_{13} представляет собой H, NH_2 , моно- или дизамещенный амин, выбранный из прямых, разветвленных или циклических $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ -алкильных групп, при условии, что R_{10} и R_{11} не являются одновременно $\text{R}_{12}(\text{CH}_2)_n\text{CO}-$; и R_8 может быть также четвертичным бутилом, и R_7 представляет собой H или галоген.

В дополнительной предпочтительной форме осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения, направленного на ингибирование микробного или опухолевого роста, включающему введение субъекту, нуждающемуся в таком лечении, эффективного количества тетрациклинового соединения или его соли общей формулы:



в которой R выбран из $\text{CH}_2\text{N}(\text{R}_a\text{R}_b)$ или



R_aR_b представляют собой $\text{C}_1\text{-C}_6$;

R_c и R_d представляют собой $(\text{CH}_2)_n\text{CHR}_e$, n означает 0 или 1, R_e представляет собой H, алкил($\text{C}_1\text{-C}_6$), NH_2 , и X представляет собой NH, S или CH_2 ;

R_1 и R_2 представляют собой H или $\text{N}(\text{R}_9)_2$, где R_9 представляет собой водород или низший алкил ($\text{C}_1\text{-C}_6$), при условии, что R_1 и R_2 не могут одновременно представлять собой $\text{N}(\text{R}_9)_2$.

R_3 представляет собой H, OH, $=\text{O}$, OCOR_{10} , где R_{10} представляет собой $\text{C}_1\text{-C}_6$, или альтернативно, R_3 представляет собой $\text{N}(\text{R}_9)_2$, где R_9 представляет собой водород или $\text{C}_1\text{-C}_6$, при условии, что если R_3 представляет собой $=\text{O}$ или $\text{N}(\text{R}_9)_2$, то R_4 и R_5 представляют собой H или CH_3 , и R_4 и R_5 не являются одновременно CH_3 или H;

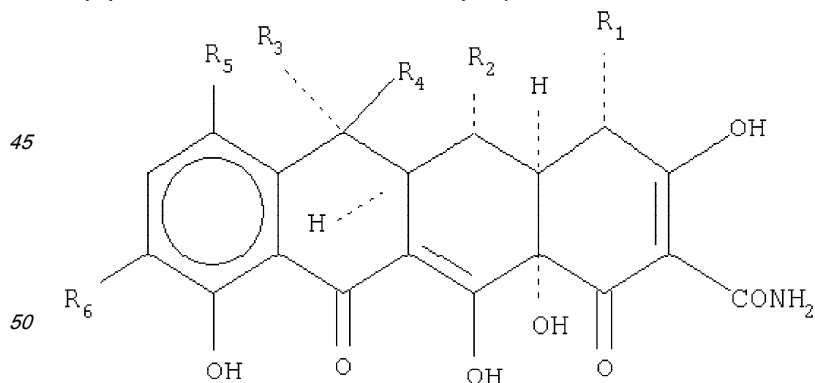
5a водород является α - или β -;

R_4 и R_5 представляют собой H, CH_3 или F, при условии, что если R_4 представляет собой CH_3 , то R_5 представляет собой H или F, и если R_5 представляет собой CH_3 , то R_4 представляет собой H или F, и R_4 и R_5 не являются одновременно F;

R_6 и R_8 представляют собой галоген, H, NO_2 , N_3 , N_2^+ , $\text{C}_2\text{H}_5\text{OC}(\text{S})\text{S-}$, CN, $\text{NR}_{10}\text{R}_{11}$, где R_{10} и R_{11} представляют собой H, алкил($\text{C}_1\text{-C}_{10}$) и $\text{R}_{12}(\text{CH}_2)_n\text{CO-}$, где n означает от 0 до 5, и R_{12} представляет собой H, NH_2 , моно- или дизамещенный амин, выбранный из прямых, разветвленных или циклических $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ -групп, при условии, что R_{10} и R_{11} одновременно представляют собой $\text{R}_{12}(\text{CH}_2)_n\text{CO-}$, или, альтернативно, R_8 представляет собой четвертичный бутил;

R_7 представляет собой H или галоген, ацетилен, $\text{R}_{12}\text{-C}_6\text{H}_5$, где R_{12} представляет собой NO_2 , галоген, ацетиламино, амина, фенил, алкил или алкокси.

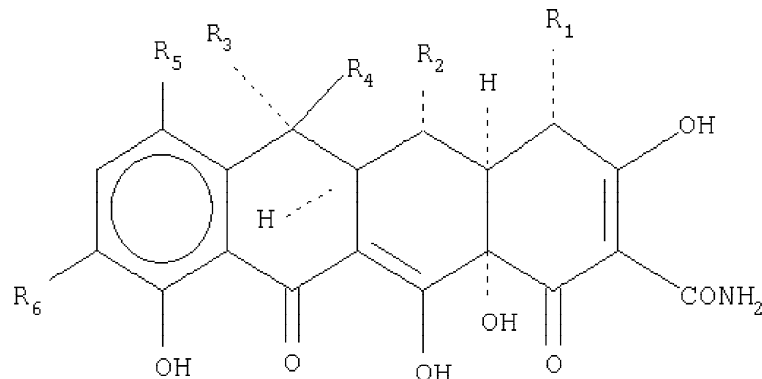
В еще одной предпочтительной форме осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения, направленного на ингибирование микробного или опухолевого роста, который включает введение субъекту, нуждающемуся в таком лечении, эффективного количества тетрациклинового соединения или его соли общей формулы:



в которой R_1 представляет собой H или $\text{N}(\text{CH}_3)_2$; R_2 представляет собой H, CH_3 или

ОСОСН₃; R₃ представляет собой Н или СН₃; R₄ представляет собой Н; R₅ представляет собой Н, N(CH₃)₂, NH₂, N(C₄H₉)₂, N(C₆H₁₃)₂, N(3,3-диметилбутил)₂, N₃, N₂⁺, NO₂, NHCOCH₃, NH(н-пропил)₂, NH-изобутил, NH-изобутилметил, NH(циклобутил), NH(циклобутилметил); и R₆ представляет собой Н, NO₂, NH₂, (CH₃)₂CHNH, N₃, NHCOCH₃, N₂⁺, N₃ или (CH₃)₃C.

В еще одной предпочтительной форме осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения, направленного на ингибирование микробного или опухолевого роста, который включает введение субъекту, нуждающемуся в таком лечении, эффективного количества тетрациклинового соединения или его соли общей формулы:



в которой R₁ представляет собой Н или N(CH₃)₂; R₂ представляет собой Н, OH или ОСОСН₃; R₃ представляет собой Н или СН₃; R₄ представляет собой Н; R₅ представляет собой Н, N(CH₃)₂, N(C₄H₉)₂, N(C₆H₁₃)₂, N(3,3-диметилбутил)₂, N₃, N₂⁺, NO₂, NHCOCH₃, NH(н-пропил)₂, NH-изобутил, NH-изобутилметил, N(CH₃CO)(изобутил), NH(циклобутил), NH(циклобутилметил) или NH₂; и R₆ представляет собой Н, NO₃, NH₂, (CH₃)₂CHNH, N₃, NHCOCH₃, N₂⁺ или (CH₃)₃C.

СВЕДЕНИЯ, ПОДТВЕРЖДАЮЩИЕ ВОЗМОЖНОСТЬ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Следующие примеры описывают получение различных веществ согласно настоящему изобретению.

ВЭЖХ-анализы выполняли на колонках C18-symmetry фирмы Waters с обращенными фазами, используя воду, содержащую 0,1% ТФУ, и ацетонитрил в качестве элюентов.

Аналитические ЖХ/МС-измерения выполняли на жидкостном хроматографе Hewlett Packard Series 1100, снабженном детектором Series 1100 MSD, с ионизацией электрораспылением (ЭР) и УФ-детекцией при 270 нм, с использованием колонки размером 4,6×100 мм со скоростью потока 0,4 мл/мин. Препаративную ВЭЖХ выполняли на Gilson serial HPLC с УФ-детекцией при 270 нм, с использованием колонки размером 19×150 мм и скоростью потока 15 мл/мин. ¹H-ЯМР регистрировали на спектрометре Bruker 300 МГц в дейтерированном метаноле.

9-Нитро-доксациклина сульфат

К перемешиваемому раствору доксицилина гидрохлорида (1 г, 2,08 ммоль) в 30 мл концентрированной серной кислоты при 0°C добавляли нитрат калия (252 мг, 2,49 ммоль). Полученную смесь перемешивали в течение 20 мин при 0°C, затем вливали в 1,2 л холодного эфира при перемешивании. Твердое вещество, которое осаждалось, отфильтровывали, промывали холодным эфиром и высушивали под вакуумом, и получали 1,22 г продукта кремового цвета. При необходимости продукт очищали, растворяя в метаноле, фильтруя и вливая фильтрат в эфир. Выделившееся твердое вещество отфильтровывали и высушивали.

9-Амино-доксациклина сульфат

К перемешиваемому раствору 9-нитро-доксациклина сульфата (1 г, 1,7 ммоль) в 35 мл монометилового эфира этиленгликоля и 5 мл метанола добавляли 700 мг 10%-ного Pd/C. Реакционную смесь гидрировали при атмосферном давлении в течение 6 ч. Катализатор фильтровали через целит, промывая метанолом. Фильтрат концентрировали, затем

добавляли по каплям к 800 мл холодного эфира при перемешивании. Выделившееся твердое вещество отфильтровывали, промывали холодным эфиром и высушивали под вакуумом, и получали 843 мг продукта кремового цвета.

9-Изопропиламино-доксциклина сульфат

- 5 К перемешиваемому раствору 9-амино-доксциклина сульфата (100 мг, 0,18 ммоль) в 10 мл монометилового эфира этиленгликоля добавляли 0,05 мл концентрированной серной кислоты, 0,5 мл ацетона и 100 мг 10%-ного Pd/C. Полученную смесь гидрировали при атмосферном давлении в течение 1 ч 15 мин, затем катализатор фильтровали через целит, промывая метанолом. Фильтрат концентрировали, затем вливали в 150 мл холодного
- 10 эфира при перемешивании. Выделившееся твердое вещество отфильтровывали, промывали холодным эфиром и высушивали под вакуумом, и получали 109 мг продукта кремового цвета. Этот продукт очищали, растворяя в метаноле, фильтруя и вливая фильтрат в эфир. Образовавшееся твердое вещество отфильтровывали и высушивали.

9-Ацетамидо-доксциклина сульфат

- 15 К перемешиваемому раствору 9-амино-доксциклина сульфата (72 мг, 0,13 ммоль) в 1,5 мл 1,3-диметил-2-имидазолидинона добавляли 70 мг бикарбоната натрия, затем 0,05 мл ацетилхлорида. Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 часа и затем фильтровали. Фильтрат концентрировали и вливали в 100 мл холодного эфира при перемешивании. Выделившееся твердое вещество отфильтровывали и высушивали под
- 20 вакуумом, и получали 92 мг продукта.

9-Диазоний-доксциклина сульфата гидрохлорид

- К перемешиваемому раствору 9-амино-доксциклина сульфата (300 мг, 0,54 ммоль) в 9 мл 0,1 н. соляной кислоты в метаноле, охлажденной на ледяной бане, добавляли 0,3 мл н-бутилнитрита. Раствор перемешивали при 0°C в течение 30 минут, затем вливали в 300
- 25 мл холодного эфира при перемешивании. Выделившееся твердое вещество отфильтровывали и высушивали под вакуумом, и получали 256 мг оранжево-коричневого продукта.

9-Азидо-доксциклина сульфат

- К перемешиваемому раствору 9-дiazоний-доксциклина сульфата гидрохлорида (80 мг, 0,14 ммоль) в 4,5 мл 0,1 н. соляной кислоты в метаноле добавляли 10 мг азидата натрия. Раствор перемешивали при комнатной температуре в течение 2 часов, затем вливали в 100 мл холодного эфира при перемешивании. Выделившееся твердое вещество
- 30 отфильтровывали и высушивали под вакуумом, и получали 43 мг продукта.

9-(4-фторфенил)доксциклин

- 35 К раствору 9-дiazоний-доксциклина сульфата гидрохлорида (358 мг, 0,59 ммоль) и 4-фторфенилбороновой кислоты (107 мг, 0,76 ммоль) в 4 мл метанола добавляли 18 мг ацетата палладия(II) и полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 16 часов. Катализатор отфильтровывали и остаток концентрировали и очищали с помощью препаративной ВЭЖХ. Собранные после ВЭЖХ фракции концентрировали и
- 40 вливали в 20 мл холодного эфира. Выделившееся твердое вещество отфильтровывали и высушивали под вакуумом и получали 32 мг продукта.

7-[1,2-бис(карбобензилокси)гидразино]доксциклин

- К перемешиваемому раствору доксциклина гидрохлорида (300 мг, 0,62 ммоль) в 2,5 мл ТГФ и 3,2 мл метансульфонокислоты при 0°C добавляли 230 мг дибензилазодикарбоксилата.
- 45 Полученную смесь перемешивали при 0°C в течение 2 часов, затем вливали в 400 мл холодного эфира. Выделившееся твердое вещество отфильтровывали и высушивали под вакуумом, и получали 479 мг продукта не совсем белого цвета.

7-Амино-доксциклин

- К раствору 7-[1,2-бис(карбобензилокси)гидразино]доксциклина (478 мг) в 30 мл монометилового эфира этиленгликоля добавляли 200 мг 10%-ного Pd/C и полученную смесь гидрировали в течение 3 часов при комнатной температуре. Катализатор
- 50 фильтровали через целит, промывая метанолом, и фильтрат концентрировали и вливали в 500 мл холодного эфира. Выделившееся твердое вещество отфильтровывали и

высушивали под вакуумом, и получали 268 мг продукта.

7-Диметиламино-доксциклина сульфат

К раствору 7-амино-доксциклина (100 мг) в 8 мл монометилового эфира этиленгликоля добавляли 1 мл 37%-ного водного раствора формальдегида, 0,05 мл концентрированной
5 серной кислоты и 100 мг 10%-ного Pd/C. Полученную смесь гидрировали при атмосферном давлении в течение 6 часов, затем катализатор фильтровали через целит, промывая метанолом. Остаток концентрировали и вливали в 100 мл холодного эфира при перемешивании. Выделившееся очень липкое вещество с трудом отфильтровывали. Остаток сразу же снова растворяли в метаноле и вливали в 100 мл холодного эфира при
10 перемешивании. Выделившееся твердое вещество отфильтровывали и высушивали под вакуумом, и получали 89 мг продукта.

7-Дипропил-доксциклина сульфат

К раствору 7-амино-доксциклина (90 мг) в 8 мл монометилового эфира этиленгликоля добавляли 0,5 мл пропионового альдегида, 0,05 мл концентрированной серной кислоты и
15 80 мг 10%-ного Pd/C. Полученную смесь гидрировали при атмосферном давлении в течение 5 часов, затем катализатор фильтровали через целит, промывая метанолом. Остаток концентрировали и вливали в 100 мл холодного эфира при перемешивании. Выделившееся твердое вещество отфильтровывали и высушивали под вакуумом, и получали 415 мг продукта.

20 7-Дибутиламино-доксциклина сульфат

К раствору 7-амино-доксциклина (100 мг, 0,2 ммоль) в 6 мл монометилового эфира этиленгликоля добавляли 0,6 мл масляного альдегида, 0,05 мл концентрированной серной
кислоты и 100 мг 10%-ного Pd/C. Полученную смесь гидрировали при атмосферном давлении в течение 4 часов, затем катализатор фильтровали через целит, промывая
25 метанолом. Остаток концентрировали и вливали в 100 мл холодного эфира при перемешивании. Выделившееся твердое вещество отфильтровывали и высушивали под вакуумом, и получали 103 мг продукта.

7-Ди-(3,3-диметил)бутиламино-доксциклина сульфат

К раствору 7-амино-доксциклина (100 мг, 0,2 ммоль) в 6 мл монометилового эфира этиленгликоля добавляли 0,5 мл 3,3-диметилмасляного альдегида, 0,05 мл
30 концентрированной серной кислоты и 100 мг 10%-ного Pd/C. Полученную смесь гидрировали при атмосферном давлении в течение 4 ч, затем катализатор фильтровали через целит, промывая метанолом. Остаток концентрировали и вливали в 100 мл холодного эфира при перемешивании. Выделившееся твердое вещество отфильтровывали
35 и высушивали под вакуумом, и получали 122 мг продукта.

7-Дигексиламино-доксциклина сульфат

К раствору 7-амино-доксциклина (100 мг, 0,2 ммоль) в 6 мл монометилового эфира этиленгликоля добавляли 0,6 мл гексаналя, 0,05 мл концентрированной серной кислоты и
40 100 мг 10%-ного Pd/C. Полученную смесь гидрировали при атмосферном давлении в течение 4 часов, затем катализатор фильтровали через целит, промывая метанолом. Остаток концентрировали и вливали в 100 мл холодного эфира при перемешивании. Выделившееся твердое вещество отфильтровывали и высушивали под вакуумом, и получали 129 мг продукта.

7-Изопропиламино-доксциклина сульфат

К раствору 7-амино-доксциклина (90 мг, 0,2 ммоль) в 8 мл монометилового эфира этиленгликоля добавляли 0,5 мл изомасляного альдегида, 0,05 мл концентрированной
45 серной кислоты и 90 мг 10%-ного Pd/C. Полученную смесь гидрировали при атмосферном давлении в течение 6 часов, затем катализатор фильтровали через целит, промывая метанолом. Остаток концентрировали и вливали в 100 мл холодного эфира при перемешивании. Выделившееся твердое вещество отфильтровывали и высушивали под
50 вакуумом, и получали 142 мг продукта.

7-Метил-7-изопропиламино-доксциклина сульфат

К раствору 7-изопропиламино-доксциклина (60 мг) в 4 мл монометилового эфира

этиленгликоля добавляли 0,4 мл 37%-ного водного раствора формальдегида, 0,05 мл концентрированной серной кислоты и 50 мг 10%-ного Pd/C. Полученную смесь гидрировали при атмосферном давлении в течение 2 часов, затем катализатор фильтровали через целит, промывая метанолом. Остаток концентрировали и вливали в 80 мл холодного эфира при перемешивании. Выделившееся твердое вещество отфильтровывали и высушивали под вакуумом, и получали 52 мг продукта.

7-Циклобутиламино-доксциклина сульфат

К раствору 7-амино-доксциклина (80 мг) в 7 мл монометилового эфира этиленгликоля добавляли 0,3 мл циклобутанона, 0,04 мл концентрированной серной кислоты и 60 мг 10%-ного Pd/C. Полученную смесь гидрировали при атмосферном давлении в течение 24 часов, затем катализатор фильтровали через целит, промывая метанолом. Остаток концентрировали и вливали в 100 мл холодного эфира при перемешивании. Выделившееся твердое вещество отфильтровывали и высушивали под вакуумом, и получали 85 мг продукта.

7-Метил-7-циклобутиламино-доксциклина сульфат

К раствору 7-циклобутиламино-доксциклина (40 мг) в 3,5 мл монометилового эфира этиленгликоля добавляли 0,3 мл 37%-ного водного раствора формальдегида, 0,03 мл концентрированной серной кислоты и 40 мг 10%-ного Pd/C. Полученную смесь гидрировали при атмосферном давлении в течение 6 ч, затем катализатор фильтровали через целит, промывая метанолом. Остаток концентрировали и вливали в 80 мл холодного эфира при перемешивании. Выделившееся твердое вещество отфильтровывали и высушивали под вакуумом, и получали 35 мг продукта.

7-Ацетамидо-доксциклина сульфат

К перемешиваемому раствору 7-амино-доксциклина (200 мг) в 3 мл 1,3-диметил-2-имидазолидинона добавляли 200 мг бикарбоната натрия, затем 0,09 мл ацетилхлорида. Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч и затем фильтровали. Фильтрат концентрировали и вливали в 200 мл холодного эфира при перемешивании. Продукт, который осаждался, отфильтровывали и высушивали под вакуумом. Получали 202 мг продукта.

7-Ацетамидо-7-изопропил-доксциклина сульфат

К перемешиваемому раствору 7-изобутиламино-доксциклина (60 мг) в 1,5 мл 1,3-диметил-2-имидазолидинона добавляли 60 мг бикарбоната натрия, затем 0,05 мл ацетилхлорида. Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч 30 мин и затем фильтровали. Фильтрат концентрировали и вливали в 80 мл холодного эфира при перемешивании. Продукт, который осаждался, отфильтровывали и высушивали под вакуумом.

7-Диазоний-доксциклина гидрохлорид или тетрафторборат

К перемешиваемому раствору 7-амино-доксциклина (200 мг, 0,4 ммоль) в 4 мл 0,1 н. соляной кислоты в метаноле, охлажденной на ледяной бане, добавляли 0,2 мл н-бутилнитрита. Раствор перемешивали при 0°C в течение 30 минут, затем вливали в 200 мл холодного эфира при перемешивании. Выделившееся твердое вещество отфильтровывали и высушивали под вакуумом, и получали 173 мг продукта. Диазоний-тетрафторборатную соль приготавливали с помощью тетрафторборной кислоты (54%-ный раствор в эфире) вместо соляной кислоты.

7-Азидо-доксциклин

К перемешиваемому раствору 7-дiazоний-доксциклина гидрохлорида (80 мг, 0,14 ммоль) в 4,5 мл 0,1 н. соляной кислоты в метаноле, охлажденной на ледяной бане, добавляли 12 мг азидата натрия. Раствор перемешивали при 0°C в течение 2 часов, затем вливали в 100 мл холодного эфира при перемешивании. Выделившееся твердое вещество отфильтровывали и высушивали под вакуумом, и получали 43 мг продукта.

7-Амино-9-нитро-доксциклина сульфат

К перемешиваемому раствору 7-амино-доксциклина (220 г, 0,44 ммоль) в 4 мл концентрированной серной кислоты при 0°C добавляли нитрат калия (52 мг, 0,51 ммоль).

Полученную смесь перемешивали в течение 15 минут при 0°C, затем вливали в 300 мл холодного эфира при перемешивании. Выделившееся твердое вещество отфильтровывали, промывали холодным эфиром и высушивали под вакуумом. Продукт снова растворяли в метаноле, фильтровали, и фильтрат вливали в эфир. Выделившееся твердое вещество отфильтровывали и высушивали под вакуумом, и получали 222 г продукта.

7-Диметиламино-9-нитро-доксциклина сульфат

К перемешиваемому раствору 7-диметиламино-доксциклина (40 г, 0,07 ммоль) в 1,5 мл концентрированной серной кислоты при 0°C добавляли нитрат калия (12 мг, 0,12 ммоль).

Полученную смесь перемешивали в течение 30 мин при 0°C, затем вливали в 60 мл холодного эфира при перемешивании. Выделившееся твердое вещество отфильтровывали, промывали холодным эфиром и высушивали под вакуумом. ЖХ/МС демонстрирует, главным образом, один продукт, содержащий две нитрогруппы (возможно, азотный эфир желаемого продукта).

7-Диметиламино-9-дiazоний-доксциклина сульфата гидрохлорид

К перемешиваемому раствору 7-диметиламино-9-амино-доксциклина (50 мг) в 1,5 мл 0,1 н. соляной кислоты в метаноле, охлажденной на ледяной бане, добавляли 0,05 мл н-бутилнитрита. Раствор перемешивали при 0°C в течение 30 минут, затем вливали в 80 мл холодного эфира при перемешивании. Выделившееся твердое вещество отфильтровывали и высушивали под вакуумом, и получали 38 мг продукта.

7-Ацетамидо-9-нитро-доксциклина сульфат

К перемешиваемому раствору 7-ацетамидо-доксциклина (60 г, 0,095 ммоль) в 2 мл концентрированной серной кислоты при 0°C добавляли нитрат калия (11 мг, 0,11 ммоль).

Полученную смесь перемешивали в течение 5 минут при 0°C, затем вливали в 80 мл холодного эфира при перемешивании. Выделившееся твердое вещество отфильтровывали, промывали холодным эфиром и высушивали под вакуумом.

7-Ацетамидо-9-амино-доксциклина сульфат

К перемешиваемому раствору 7-ацетамидо-9-нитро-доксциклина сульфата (77 мг, 0,12 ммоль) в 7 мл монометилового эфира этиленгликоля добавляли 60 мг 10%-ного Pd/C.

Реакционную смесь гидрировали при атмосферном давлении в течение 7 часов. Катализатор фильтровали через целит, промывая метанолом. Фильтрат концентрировали, затем добавляли по каплям к 100 мл холодного эфира при перемешивании. Выделившееся твердое вещество отфильтровывали, промывали холодным эфиром и высушивали под вакуумом, и получали 62 мг продукта.

7-Ацетамидо-9-дiazоний-доксциклина сульфата гидрохлорид

К перемешиваемому раствору 7-ацетамидо-9-амино-доксциклина (100 мг) в 3 мл 0,1 н. соляной кислоты в метаноле, охлажденной на ледяной бане, добавляли 0,1 мл н-бутилнитрита. Раствор перемешивали при 0°C в течение 30 минут, затем вливали в 100 мл холодного эфира при перемешивании. Выделившееся твердое вещество отфильтровывали и высушивали под вакуумом, и получали 92 мг продукта.

7-Ацетамидо-9-азидо-доксциклина сульфат

К перемешиваемому раствору 7-ацетамидо-9-дiazоний-доксциклина (112 мг, 0,19 ммоль) в 6 мл 0,1 н. соляной кислоты в метаноле, охлажденной на ледяной бане, добавляли 14 мг (0,21 ммоль) азидата натрия. Раствор перемешивали при 0°C в течение 35 минут, затем вливали в 150 мл холодного эфира при перемешивании. Выделившееся твердое вещество отфильтровывали и высушивали под вакуумом, и получали 94 мг продукта.

Доксциклина метилиодид

Доксциклина свободное основание (315 мг) растворяли в 2 мл метанола и 10 мл ТГФ, затем добавляли 1 мл метилиодида. Реакционную смесь выдерживали в течение 5 дней; никакой кристаллизации продукта не наблюдалось. Реакционную смесь концентрировали и вливали в 300 мл холодного эфира при перемешивании. Выделившийся продукт отфильтровывали и высушивали под вакуумом, и получали 269 мг; ЖХ/МС демонстрирует

чистый продукт.

5-Ацетокси-доксциклин

Раствор доксциклина (100 мг) в 3 мл 30%-ного раствора HBr в уксусной кислоте перемешивали при комнатной температуре в течение 3,5 дней; реакционную смесь затем
5 вливали в 100 мл холодного эфира при перемешивании, и выделившийся продукт отфильтровывали. ЖХ/МС показала неполное превращение исходного материала, поэтому продукт (86 мг) снова подвергали реакционным условиям в течение 9 ч и затем выделяли тем же способом.

9-трет-бутил-доксциклин

10 Раствор доксциклина (100 мг) в 2 мл трет-бутанола и 3 мл метансульфокислоты перемешивали при комнатной температуре в течение 18 часов, затем вливали в 100 мл холодной воды и экстрагировали н-бутанолом. Органические экстракты подщелачивали 1 н. раствором гидроксида натрия и pH быстро доводили до 6,5-7 концентрированной соляной кислотой. Твердое вещество, осажденное при фильтрации, затем растворяли в метаноле,
15 концентрировали и добавляли по каплям к 30 мл холодного раствора эфир/петролейный эфир при перемешивании. Выделившееся твердое вещество отфильтровывали и высушивали под вакуумом.

9-трет-бутил-7-нитро-доксциклин

20 Раствор доксциклина гидрохлорида (2 г) в 10 мл трет-бутанола и 30 мл метансульфокислоты перемешивали при комнатной температуре в течение 3 часов, затем добавляли 500 мг нитрата калия и полученную смесь перемешивали еще час. Реакционную смесь вливали в 100 мл холодного раствора воды, содержащей 23 г гидроксида натрия; по каплям добавляли более разбавленный раствор NaOH до тех пор, пока реакционная смесь не станет щелочной. pH быстро доводили до 6,5-7 концентрированной соляной кислотой.
25 Выделившееся липкое темное вещество отфильтровывали. Водный фильтрат экстрагировали еще раз н-бутанолом для получения большего количества продукта. Неочищенный продукт растворяли в минимальном количестве метанола и очищали с помощью ВЭЖХ. Объединенные после ВЭЖХ фракции концентрировали досуха, растворяли в метаноле и добавляли по каплям к 50 мл смеси эфир/петролейный эфир (3:
30 1). Выделившееся твердое вещество отфильтровывали и получали 788 мг бледно-желтого продукта.

9-трет-бутил-7-амино-доксциклин

К раствору 9-трет-бутил-7-доксциклина (500 мг) в 25 мл монометилового эфира этиленгликоля добавляли 350 мг 10%-ного Pd/C и полученную смесь гидрировали при
35 атмосферном давлении в течение 17 часов. Катализатор фильтровали через целит, промывая метанолом. Остаток концентрировали, растворяли в ТГФ и добавляли по каплям к холодному раствору эфир/петролейный эфир (1:1) при перемешивании. Выпавший в осадок продукт отфильтровывали и высушивали под вакуумом, и получали 452 мг продукта.

9-трет-бутил-7-дiazоний-доксциклин

40 К перемешиваемому раствору 9-трет-бутил-7-амино-доксциклина (93 мг, 0,18 ммоль) в 2,5 мл 0,1 н. соляной кислоты в метаноле, охлажденной на ледяной бане, добавляли 0,1 мл н-бутилнитрита. Раствор перемешивали при 0°C в течение 30 минут и затем половину раствора вливали в 30 мл холодной смеси эфир/петролейный эфир (3:1) при перемешивании. Продукт приклеивался к дну лабораторного стакана в виде смолы. Его
45 снова растворяли в метаноле и концентрировали, остаток вливали в 20 мл холодного эфира, и выделившееся твердое вещество сразу же отфильтровывали и высушивали под вакуумом; получали 42 мг продукта. Другую половину реакционной смеси использовали непосредственно для получения 9-трет-бутилового соединения, описанного ниже.

9-трет-бутил-7-азидо-доксциклин

50 К перемешиваемому раствору реакционной смеси 9-трет-бутил-7-дiazоний-доксциклина (1,5 мл) при 0°C добавляли 8 мг (0,12 ммоль) азиды натрия. Раствор перемешивали в течение 3 часов, позволяя нагреться до комнатной температуры. После концентрирования реакционной смеси остаток вливали в холодную смесь

эфир/петролейный эфир (3:1) при перемешивании. Твердое вещество не выделялось, поэтому раствор концентрировали досуха с получением 35 мг продукта.

9-трет-бутил-7-диметиламино-доксциклин

- К перемешиваемой реакционной смеси из 9-трет-бутил-7-амино-доксциклина, содержащей 167 мг 9-трет-бутил-7-амино-доксциклина в 10 мл монометилового эфира этиленгликоля и 115 мг 10%-ного Pd/C, добавляли 1,2 мл 37%-ного водного раствора формальдегида. Полученную смесь гидрировали в течение 3,5 часов при атмосферном давлении, затем катализатор фильтровали через целит, промывая метанолом. Фильтрат концентрировали и остаток вливали в 10 мл холодного эфира при перемешивании.
- Выделившееся твердое вещество отфильтровывали и высушивали под вакуумом. ЖХ/МС показала ожидаемый продукт, но он был загрязнен основной примесью.

9-трет-бутил-7-ацетамидо-доксциклин

- К перемешиваемому раствору 9-трет-бутил-7-амино-доксциклина (100 мг) в 2 мл 1,3-диметил-2-имидазолидинона добавляли 100 мг бикарбоната натрия, затем 0,07 мл ацетилхлорида. Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1,5 часов и затем фильтровали. Фильтрат концентрировали и вливали в 100 мл холодного эфира при перемешивании. Выделившийся продукт отфильтровывали. Неочищенный продукт снова растворяли в метаноле, фильтровали и добавляли по каплям в холодную смесь эфир/петролейный эфир (3:1) при перемешивании. Продукт собирали фильтрацией и высушивали под вакуумом и получали 76 мг продукта.

4-Дедиметиламино-доксциклин

- К перемешиваемому раствору тетрациклина метилиодида (860 мг) в 12 мл уксусной кислоты и 12 мл воды добавляли 432 мг цинковой пыли. После перемешивания в течение 15 мин цинковый порошок отфильтровывали. Фильтрат разбавляли 86 мл воды, содержащей 0,86 мл концентрированной соляной кислоты. Выделившийся продукт отфильтровывали и высушивали под вакуумом, и получали 419 мг продукта.

4-Дедиметиламино-9-нитро-доксциклин

- К перемешиваемому раствору 4-дедиметиламино-доксциклина (402 мг, 1 ммоль) в 20 мл концентрированной серной кислоты при 0°C добавляли 111 мг нитрата калия. После перемешивания в течение 20 минут реакционную смесь вливали в 100 мл холодной воды. В воду, содержащую продукт, добавляли н-бутанол и отделяли органический слой. Экстракцию н-бутанолом повторяли дважды. Объединенные органические экстракты концентрировали и добавляли в холодную воду при перемешивании. Выделившийся продукт отфильтровывали; большее количество продукта получали путем повторной экстракции водного фильтрата н-бутанолом, концентрирования, вливания в холодную воду и фильтрации. После высушивания под вакуумом получали 353 мг продукта.

4-Дедиметиламино-9-амино-доксциклин

- К перемешиваемому раствору 4-дедиметиламино-9-нитро-доксциклина (353 мг) в 17 мл монометилового эфира этиленгликоля добавляли 0,1 мл концентрированной серной кислоты и 200 мг 10%-ного Pd/C, и полученную смесь гидрировали при атмосферном давлении в течение 10 часов. Катализатор фильтровали через целит, промывая метанолом. Фильтрат концентрировали и вливали в 100 мл эфира. Выделившееся твердое вещество отфильтровывали и высушивали под вакуумом, и получали 292 мг продукта.

4-Дедиметиламино-9-дiazоний-доксциклингидрохлорид

- К перемешиваемому раствору 4-дедиметиламино-9-амино-доксциклина (220 мг) в 5 мл 0,1 н. соляной кислоты в метаноле, охлажденной на ледяной бане, добавляли 0,2 мл н-бутилнитрита. Раствор перемешивали при 0°C в течение 30 минут, затем вливали в 150 мл холодной смеси эфир/петролейный эфир (2:1) при перемешивании. Выделившееся твердое вещество отфильтровывали и высушивали под вакуумом, и получали 191 мг продукта.

4-Дедиметиламино-9-азидо-доксциклин

К перемешиваемому раствору 4-дедиметиламино-9-дiazоний-доксциклина (150 мг, 0,32 ммоль) в 6,5 мл 0,1 н. соляной кислоты в метаноле, охлажденной на ледяной бане,

добавляли 23 мг азида натрия, и полученную смесь перемешивали в течение 1 часа при 0°C. Затем смесь вливали в 120 мл холодного эфира при перемешивании. Некоторое количество образовавшегося твердого вещества фильтровали и обнаружили, что оно не является ожидаемым продуктом. Фильтрат концентрировали досуха, растворяли в метаноле и вливали в 50 мл холодной воды при перемешивании. Выделившееся твердое вещество отфильтровывали и высушивали под вакуумом; большее количество продукта получали путем экстракции фильтрата н-бутанолом, концентрирования, вливания в воду и фильтрации твердого вещества; получали 84 мг продукта.

4-Дедиметиламино-7-нитро-9-трет-бутил-доксциклин

Раствор 4-дедиметиламино-доксциклина (500 мг 1,25 ммоль) в 3 мл трет-бутанола и 15 мл метансульфокислоты перемешивали при комнатной температуре в течение 15 часов, затем добавляли 140 мг нитрата калия и полученную смесь перемешивали еще час. Реакционную смесь вливали в 200 мл холодной воды при перемешивании. Выделившееся твердое вещество отфильтровывали и высушивали на воздухе. Неочищенный продукт растворяли в минимальном количестве метанола и очищали с помощью ВЭЖХ. Объединенные после ВЭЖХ фракции концентрировали досуха, растворяли в метаноле и добавляли по каплям к 50 мл холодной воды. Выделившееся твердое вещество отфильтровывали и высушивали под вакуумом, и получали 217 мг продукта.

4-Дедиметиламино-7-амино-9-трет-бутил-доксциклин

К перемешиваемому раствору 4-дедиметиламино-7-нитро-9-трет-бутил-доксциклина (217 мг, 0,42 ммоль) в 12 мл монометилового эфира этиленгликоля добавляли 170 мг 10%-ного Pd/C и полученную смесь гидрировали при атмосферном давлении в течение 13 часов. Катализатор фильтровали через целит, промывая метанолом. Фильтрат концентрировали и вливали в 20 мл смеси эфир/петролейный эфир (3:1), и получали 40 мг продукта. Оранжевый фильтрат концентрировали досуха с получением еще 138 мг продукта.

4-Дедиметиламино-7-диазоний-9-трет-бутил-доксциклин

К перемешиваемому раствору 4-дедиметиламино-7-амино-9-трет-бутил-доксциклина (165 мг) в 5 мл 0,1 н. соляной кислоты в метаноле, охлажденной на ледяной бане, добавляли 0,15 мл н-бутилнитрита. Раствор перемешивали при 0°C в течение 30 минут; половину раствора вливали в 50 мл холодного эфира при перемешивании. Выделившееся твердое вещество отфильтровывали и высушивали под вакуумом, и получали 50 мг продукта.

4-Дедиметиламино-7-амино-доксциклин

К перемешиваемому раствору 4-дедиметиламино-доксциклина (400 мг) в 4 мл ТГФ и 4,5 мл метансульфокислоты при 0°C добавляли 418 мг (1,4 ммоль) дибензилазодикарбоксилата, и полученную смесь перемешивали в течение 4 часов, нагревая до комнатной температуры. Добавляли воду и н-бутанол, и два слоя разделяли. Водный слой экстрагировали смесью эфир/н-бутанол. Объединенные органические экстракты концентрировали досуха и добавляли 10 мл монометилового эфира этиленгликоля. Затем добавляли 430 мг 10%-ного Pd/C и полученную смесь гидрировали при атмосферном давлении в течение 12 часов. Катализатор фильтровали через целит, промывая метанолом. Фильтрат концентрировали и вливали в холодную смесь эфир/петролейный эфир (3:1) при перемешивании. Выделившийся продукт отфильтровывали и высушивали под вакуумом, и получали 114 мг продукта.

9-Нитро-миноциклина сульфат

К перемешиваемому раствору миноциклина гидрохлорида (1 г, 2,02 ммоль) в 30 мл концентрированной серной кислоты при 0°C добавляли нитрат калия (246 мг). Полученную смесь перемешивали в течение 45 минут при 0°C, затем вливали в 1,2 л холодного эфира при перемешивании. Выделившееся твердое вещество отфильтровывали, промывали холодным эфиром и высушивали под вакуумом, и получали 1,33 г продукта.

9-Амино-миноциклина сульфат

К перемешиваемому раствору 9-нитро-миноциклина сульфата (500 мг, 0,83 ммоль) в 10

мл монометилового эфира этиленгликоля и 7 мл метанола добавляли 250 мг 10%-ного Pd/C. Реакционную смесь гидрировали при атмосферном давлении в течение 4 часов. Катализатор фильтровали через целит, промывая метанолом. Фильтрат концентрировали, затем добавляли по каплям к 600 мл холодного эфира при перемешивании. Выделившееся
5 твердое вещество отфильтровывали, промывали холодным эфиром и высушивали под вакуумом, и получали 465 мг продукта.

9-Диазоний-миноциклина сульфата гидрохлорид

К перемешиваемому раствору 9-амино-миноциклина сульфата (100 мг) в 3 мл 0,1 н. соляной кислоты в метаноле, охлажденной на ледяной бане, добавляли 0,1 мл трет-бутил
10 нитрита (или н-бутилнитрита). Раствор перемешивали при 0°C в течение 30 минут, затем вливали в 100 мл холодного эфира при перемешивании. Выделившееся твердое вещество отфильтровывали и высушивали под вакуумом, и получали 87 мг оранжево-коричневого продукта.

9-Азидо-миноциклина сульфат

15 К перемешиваемому раствору 9-диазоний-миноциклина сульфата гидрохлорида (485 мг, 0,83 ммоль) в 18 мл 0,1 н. соляной кислоты в метаноле добавляли 59 мг азидата натрия. Раствор перемешивали при комнатной температуре в течение 2 часов, затем фильтровали и фильтрат вливали в 500 мл холодного эфира при перемешивании. Выделившееся
20 твердое вещество отфильтровывали и высушивали под вакуумом, и получали 480 мг бежевого продукта.

9-Ацетамино-миноциклин

К перемешиваемому раствору 9-амино-миноциклина сульфата (100 мг, 0,175 ммоль) в 1,5 мл 1,3-диметил-2-имидазолидинона добавляли 100 мг бикарбоната натрия, затем 0,05
25 мл ацетилхлорида. Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 45 минут и затем вливали в 150 мл холодного эфира при перемешивании. Выделившееся твердое вещество отфильтровывали и высушивали под вакуумом, и получали 165 мг продукта.

4-Дедиметиламино-миноциклин

30 Миноциклина свободное основание (175 мг, 0,38 ммоль) растворяли в 2 мл ТГФ, затем добавляли 0,43 мл метилиодида. Кристаллизации продукта не наблюдалось. Реакционную смесь концентрировали и вливали в 200 мл смеси холодной смеси эфир/петролейный эфир (40:60) при перемешивании. Выделившийся продукт отфильтровывали и высушивали под вакуумом; продукт снова подвергали реакционным условиям еще в течение 3 дней, затем осаждали из эфира, как описано выше, и получали 123 мг миноциклина метилиодида. Неочищенный продукт растворяли в 2 мл уксусной кислоты и добавляли 2 мл воды и 60 мг
35 цинковой пыли при перемешивании. Через 15 минут цинковый порошок отфильтровывали. Фильтрат разбавляли 15 мл воды, содержащей концентрированную соляную кислоту. Объединенные органические экстракты высушивали над сульфатом магния и концентрировали. Выделившееся твердое вещество отфильтровывали и высушивали под вакуумом, и получали 150 мг желтого продукта.

4-Дедиметиламино-9-нитро-миноциклин

40 4-Дедиметиламиноминоциклин (415 мг, 1 ммоль) растворяли в 30 мл концентрированной серной кислоты при комнатной температуре. Раствор охлаждали на ледяной бане и добавляли нитрат калия (110 мг, 1,09 ммоль) при перемешивании. Полученную смесь перемешивали в течение 15 минут, затем вливали в 300 мл холодного эфира при
45 перемешивании. Выделившееся твердое вещество отфильтровывали, промывали холодным эфиром и высушивали под вакуумом. ЖХ/МС показала неполное превращение исходного материала, поэтому продукт снова растворяли в 15 мл концентрированной серной кислоты, добавляли 50 мг нитрата калия при 0°C и полученную смесь перемешивали в течение 45 минут. Продукт выделяли, как описано выше, и получали 542
50 мг продукта.

7,9-Дибромсанциклин

К перемешиваемому раствору санциклина (50 мг, 0,12 ммоль) в 1,5 мл концентрированной серной кислоты при 0°C добавляли 42 мг N-бромсукцинимид. Через 30

минут реакционную смесь вливали в 60 мл холодного эфира при перемешивании. Выделившееся твердое вещество отфильтровывали и высушивали под вакуумом, и получали 70 мг желтого продукта.

Смесь 7-нитро- и 9-нитро-санциклина

- 5 К перемешиваемому раствору санциклина (40 мг, 0,09 ммоль) в 1,5 мл концентрированной серной кислоты при 0°C добавляли 10 мг нитрата калия. Через 20 минут реакционную смесь вливали в 50 мл холодного эфира при перемешивании. Выделившееся твердое вещество отфильтровывали и высушивали под вакуумом, и получали 59 мг продукта. ЖХ/МС демонстрирует два моно-нитрированных продукта в соотношении 1,6:1.

- 10 При дополнительном тестировании настоящего изобретения оценивали Минимальные Ингибирующие Концентрации (МИК) пяти исследуемых продуктов при введении в организм десяти разных штаммов микроорганизмов. Исследование представляло собой определение МИК для пяти исследуемых продуктов, выполненное с использованием модификации Способа Макроразведений Бульона, изложенного в документе
- 15 Национального комитета по Клиническим Лабораторным Стандартам США (NCCLS) M7-A5 (Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically, 5th Edition). Каждый исследуемый продукт оценивали в двойной повторности относительно провокационных суспензий десяти штаммов микроорганизмов. Перед тестированием
- 20 каждого продукта его разбавляли (масса/объем) в стерильном бульоне Мюллера-Хинтона (MHB от англ. Mueller-Hinton Broth) для достижения начальной концентрации 160 мкг/мл, основываясь на эффективности 1000 мкг/мл.

- | | | |
|----|--|-----------------------------------|
| 25 | Продукт 1 - Производное тетрациклина, 14,8 мг этого продукта растворяли в 92,5 мл МНВ для достижения
номер серии: INN01 182 (MW 615) | начальной концентрации 160 мкг/мл |
| | Продукт 2 - Производное тетрациклина, 13,6 мг этого продукта растворяли в 85,0 мл МНВ для достижения
номер серии: INN01 183 (MW 627) | начальной концентрации 160 мкг/мл |
| | Продукт 3 - Производное тетрациклина, 11,9 мг этого продукта растворяли в 74,4 мл МНВ для достижения
номер серии: INN01 185 (MW 655) | начальной концентрации 160 мкг/мл |
| | Продукт 4 - Производное тетрациклина, 9,6 мг этого продукта растворяли в 60,0 мл МНВ для достижения
номер серии: INN01 189 (MW 625) | начальной концентрации 160 мкг/мл |
| 30 | Продукт 5 - Производное тетрациклина, 13,8 мг этого продукта растворяли в 86,25 мл МНВ для достижения
номер серии: INN01 195 (MW 643) | начальной концентрации 160 мкг/мл |

- Приблизительно за 48 часов до тестирования отдельные стерильные пробирки с триптическим соевым бульоном (Tryptic Soy Broth) были инокулированы из виал, каждая из которых содержала лиофилизированные провокационные микроорганизмы, как указано
- 35 в Таблице I ниже. Бульонные культуры инкубировали при 35±2°C в течение приблизительно 24 часов. Эти бульонные культуры, приготовленные, как описано выше, инокулировали на поверхность триптического соевого агара, содержащегося в чашках Петри, и инкубировали при 35±2°C в течение приблизительно 24 часов. Это приводило к образованию "газонов" микроорганизмов на поверхности чашек с агаром, которые
- 40 использовали для приготовления провокационных суспензий.

- До начала тестирования для каждого микроорганизма приготавливали исходную провокационную суспензию, содержащую приблизительно 1,0×10⁹ КОЕ/мл, путем инокуляции тест-пробирки микроорганизмами, взятыми из чашек с твердой средой после орошения хлоридом натрия, приготовленных, как описано выше. Конечные
- 45 провокационные суспензии, содержащие приблизительно 1,0×10⁶ КОЕ/мл, приготавливали для каждого вида микроорганизмов, помещая аликвоту 0,2 мл суспензии с концентрацией 1,0×10⁹ КОЕ/мл в стерильный полипропиленовый флакон объемом 250 мл, содержащий 200 мл бульона Мюллера-Хинтона. Конечные провокационные суспензии тщательно
- 50 перемешивали перед тем, как использовать в тестировании. Конечные разведения на чашках составляли 10⁻³, 10⁻⁴ и 10⁻⁵. Эти чашки инкубировали при 35±2°C до тех пор, пока наблюдался достаточный рост (Таблица I).

После инкубации колонии на чашках подсчитывали вручную, используя счетчик с ручным

подсчетом (hand-tally). При расчете данных использовали подсчеты в диапазоне от 30 до 300 КОЕ.

Исходную популяцию (КОЕ/мл) рассчитывали для каждой провокационной суспензии следующим образом:

$$5 \quad \text{КОЕ/мл} = (C_i \times 10^{-D})$$

где:

C_i = Среднее для 2 подсчитанных чашек

D = Фактор разведения используемых для подсчета чашек.

10 Популяцию (КОЕ/мл) в пробирке, содержащей продукт/бульон, рассчитывали после инокуляции для каждой провокационной суспензии следующим образом:

$$\text{Популяция в пробирке (КОЕ/мл)} = \frac{(C_i \times 10^{-D})}{2}$$

где:

C_i = Среднее для двух (2) подсчитанных чашек

15 D = Фактор разведения используемых для подсчета чашек

2 = Общий объем (мл) в каждой пробирке, содержащей продукт/бульон, после инокуляции.

Процедуру тестирования проводили следующим образом: аликвоты по 30 мл бульона Мюллера-Хинтона переносили в стерильные флаконы. Аликвоту продукта объемом 30 мл с 20 исходной концентрацией 160 мкг/мл переносили в первый из 11 стерильных флаконов, каждый из которых содержит 30 мл бульона Мюллера-Хинтона, и тщательно перемешивали, для того чтобы получить разведение продукта 1:2 (об/об). Аликвоту 30 мл отбирали из флакона, приготовленного, как описано выше, и использовали для 25 последовательных разведений 1:2 (об/об) в оставшихся 10 флаконах (разведения продукта - 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512, 1:1024 и 1:2048), каждый из которых содержит 30 мл бульона Мюллера-Хинтона. Каждый флакон тщательно перемешивали перед тем, как отобрать аликвоту 30 мл, необходимую для следующего в этой последовательности разведения. Аликвоты по 1,0 мл из каждого приготовленного 30 разведения продукта и аликвоты по 1,0 мл из исходного препарата продукта (концентрация продукта 160 мкг/мл) переносили в отдельные стерильные тест-пробирки. Для каждого микроорганизма, оцениваемого относительно каждого продукта, 35 приготавливали серию из 12 пробирок, каждая из которых содержит 1,0 мл соответствующего разведения продукта (1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512, 1:1024 и 1:2048) (Таблица I). Эта процедура давала в итоге концентрации продукта, варьирующие от 160 мкг/мл до 0,078 мкг/мл.

Аликвоту суспензии 1,0 мл, содержащую приблизительно $1,0 \times 10^6$ КОЕ/мл, вносили в 40 каждую пробирку для разведения продукта в этой серии, получая таким образом конечную последовательность разведения продукта 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512, 1:1024, 1:2048 и 1:4096, с каждой пробиркой для разведения, содержащей приблизительно $5,0 \times 10^5$ КОЕ/мл провокационного микроорганизма. Это давало конечные концентрации продукта, варьирующие от 80 мкг/мл до 0,039 мкг/мл. Описанную выше 45 процедуру тестирования выполняли в двойных повторностях для каждого тестируемого вида микроорганизма (Таблица I) относительно каждого исследуемого продукта. Для каждого микроорганизма приготавливали положительную контрольную пробирку (контроль 45 роста), содержащую аликвоту 1,0 мл бульона Мюллера-Хинтона и аликвоту 1,0 мл провокационной суспензии (Таблица I). Приготавливали также отрицательную (среда) контрольную пробирку (контроль стерильности; без инокуляции микробов) с бульоном Мюллера-Хинтона.

50 Контроли плотности продукта приготавливали для каждого продукта путем переноса аликвот по 1,0 мл из каждого разведения продукта в отдельные стерильные тест-пробирки. Аликвоту 1,0 мл стерильного бульона Мюллера-Хинтона вносили в каждую из полученных пробирок для разведения продукта и тщательно перемешивали, используя вихревой смеситель и получая, таким образом, конечную последовательность разведений

продукта, идентичную той, что описана выше. Пробирки, содержащие провокационную суспензию/разведение продукта, и контроли инкубировали при $35 \pm 2^\circ\text{C}$ в течение 20 часов, до тех пор, пока в положительных контрольных пробирках наблюдался хороший рост.

После инкубации пробирки проверяли на рост микроорганизмов, определяемый визуально на основании плотности.

Минимальная Ингибирующая Концентрация (МИК) для каждого исследуемого продукта в зависимости от каждого провокационного микроорганизма регистрировалась как наибольшее разведение исследуемого продукта, которое полностью ингибировало рост этого микроорганизма, что определялось невооруженным глазом. Результаты дублированных измерений для каждого исследуемого продукта в зависимости от каждого микроорганизма регистрировали и затем усредняли одновременно с получением конечных представленных значений.

ТАБЛИЦА I				
Вид микроорганизма	ATCC#	Время инкубации* (МИК-пробирки)	Темп. инкубации*	Среда
Enterococcus faecalis	29212	20 часов	$35 \pm 2^\circ\text{C}$	TSB/TSA/MHB
Escherichia coli	25922	20 часов	$35 \pm 2^\circ\text{C}$	TSB/TSA/MHB
Escherichia coli (тетрациклин-устойчивый)	51657	20 часов	$35 \pm 2^\circ\text{C}$	TSB/TSA/MHB
Escherichia coli (тетрациклин-устойчивый)	51658	20 часов	$35 \pm 2^\circ\text{C}$	TSB/TSA/MHB
Escherichia coli (тетрациклин-устойчивый)	51659	20 часов	$35 \pm 2^\circ\text{C}$	TSB/TSA/MHB
Staphylococcus aureus (тетрациклин-устойчивый)	27217	20 часов	$35 \pm 2^\circ\text{C}$	TSB/TSA/MHB
Staphylococcus aureus (тетрациклин-устойчивый)	27659	20 часов	$35 \pm 2^\circ\text{C}$	TSB/TSA/MHB
Staphylococcus aureus (тетрациклин-устойчивый)	27660	20 часов	$35 \pm 2^\circ\text{C}$	TSB/TSA/MHB
Staphylococcus aureus	29213	20 часов	$35 \pm 2^\circ\text{C}$	TSB/TSA/MHB
*Чашки с исходной популяцией непреднамеренно инкубировали при комнатной температуре (20°C - 27°C) в течение приблизительно 48 часов до инкубации при $35 \pm 2^\circ\text{C}$ в течение приблизительно 72 часов.				

Таблица II представляет Минимальные Ингибирующие Концентрации, выраженные как разведение продукта для каждого исследуемого продукта в отношении каждого из 10 тестируемых микроорганизмов. Таблица III представляет Минимальные Ингибирующие Концентрации, выраженные как концентрация продукта (мкг/мл) для каждого исследуемого продукта в отношении каждого из 10 тестируемых микроорганизмов. Исходный раствор, приготовленный для каждого продукта, имел концентрацию 160 мкг/мл, основанную на эффективности 1000 мкг/мл.

ТАБЛИЦА II						
Вид микроорганизма	ATCC#	Минимальные Ингибирующие Концентрации (выраженные как разведение продукта)				
		Продукт #1	Продукт #2	Продукт #3	Продукт #4	Продукт #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 (тетрациклин-устойчивый)	51657	<1:2	<1:2	<1:2	<1:2	<1:2
Escherichia coli (тетрациклин-устойчивый)	51658	<1:2	<1:2	<1:2	<1:2	<1:2
Escherichia coli (тетрациклин-устойчивый)	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 (тетрациклин-устойчивый)	27217	<1:2	1:32	1:32	1:8	1: 16
Staphylococcus aureus (тетрациклин-устойчивый)	27659	<1:2	1:32	1:24	1:8	1: 16
Staphylococcus aureus (тетрациклин-устойчивый)	27660	<1:2	1:32	1: 16	1:8	1:32
Staphylococcus aureus	29213	1:8	1:32	1:32	1:8	1:32

ТАБЛИЦА III						
Вид микроорганизма	ATCC#	Минимальные Ингибирующие Концентрации (выраженные как разведение продукта)				
		Продукт #1	Продукт #2	Продукт #3	Продукт #4	Продукт #5
Enterococcus faecalis	29212	>80	10	10	80	20
Escherichia coli	25922	80	>80	>80	>80	80
Escherichia coli (Тетрациклин-устойчивый)	51657	>80	>80	>80	>80	>80
Escherichia coli (Тетрациклин-устойчивый)	51658	>80	>80	>80	>80	>80
Escherichia coli (Тетрациклин-устойчивый)	51659	>80	>80	>80	>80	>80
Pseudomonas aeruginosa	27853	>80	>80	>80	>80	>80

Staphylococcus aureus (Тетрациклин-устойчивый)	27217	>80	5	5	20	10
Staphylococcus aureus (Тетрациклин-устойчивый)	27659	>80	5	6,67	20	10
Staphylococcus aureus (Тетрациклин-устойчивый)	27660	>80	5	10	20	5
Staphylococcus aureus	29213	20	5	5	20	5

В дополнительных исследованиях изучали активность производных тетрациклина по настоящему изобретению в качестве ингибиторов матрикс-разрушающих металлопротеиназ (ММР), которые вовлекаются в злокачественный опухолевый рост и метастазы. В этих исследованиях использовали опухолевую модель Dunning MAT LyLu, которая развивалась в крысах Copenhagen из трансплантируемой опухоли, перенесенной из первичной опухоли простаты из дорзальной простаты старых самцов крыс Copenhagen. Опухоль MAT LyLu является спонтанно метастазирующей в лимфатические узлы и легкие при инъекции и дает метастазы в кости приблизительно у 80-100% реципиентных животных. Свежие дозированные растворы, содержащие 10 мг/мл каждого исследуемого вещества в 2%-ной карбоксиметилцеллюлозе, приготавливали ежедневно и использовали при тестировании.

Сначала в исследованиях оценивали токсичность в двух группах из пяти не несущих опухоль животных, каждое из которых получало два аналога тетрациклина (9-амино-доксидоциклин и 9-нитро-доксидоциклин) в дозе 40 мг/кг ежедневно в течение семи дней.

Трем группам животных (10/группу) вводили либо носитель, либо один из двух аналогов ежедневно в течение трех недель и затем трижды в неделю до смерти или до забоя. Введение доз начинали за семь дней до имплантации опухолевых клеток MAT LyLu инъекцией в хвостовую вену. Приблизительно 0,1 мл суспензии опухолевых клеток инъецировали в одну из боковых хвостовых вен. Доза, которую нужно выбрать, основывалась на двух факторах: (1) эффективности и (2) заболеваемости, связанной с введением аналога, если таковая имеется. Следующая таблица (Таблица IV ниже) демонстрирует время жизни и еженедельный вес тела животных в контрольных и обработанных группах. Как показано в Таблице, 9-амино-доксидоциклин и 9-нитро-доксидоциклин продемонстрировали значительное увеличение коэффициента выживания после опухолевой имплантации, хотя и дающее лишь незначительные изменения в весе тела, по сравнению с контрольной группой. Это последнее открытие является особенно важным, так как обычные способы лечения рака часто приводят к значительной потере веса.

ТАБЛИЦА IV			
Количество дней после опухолевой имплантации	Коэффициент выживания		
	9-амино-доксидоциклин	9-нитро-доксидоциклин	Контроль
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

В дополнительных исследованиях оценивали ингибирующую активность ММР, а также процентное ингибирование разных злокачественных опухолей различными производными тетрациклина. Результаты представлены в Таблице V ниже и демонстрируют эффективность способов лечения по настоящему изобретению. Одна цель исследований состояла в том, чтобы оценить ряд производных тетрациклина в качестве ингибиторов очищенных матриксных металлопротеиназ человека, включая ММР1, 2, 3, 7, 9 и 14. Производные тетрациклина были эффективными ингибиторами в диапазоне от мМ до мкМ.

ПРОТОКОЛЫ ЭКСПЕРИМЕНТОВ

1. Протокол измерения ингибирования ММР1 (коллагеназы-1) производными тетрациклина

Активность MMP1 определяли по высвобождению растворимых ^{14}C -меченых фрагментов коллагена из ^{14}C -ацетилованного коллагена I типа из кожи крысы (Methods in Enzymology 80, 711, 1981).

Составляющие анализа:

100 мкг ^{14}C -меченного коллагена I типа из кожи крысы (5-6000 dpm)

50 mM Трис-HCl, pH 7,9

15 mM CaCl_2 , 0,02% азида

Рекомбинантная MMP1 человека, 3-4 нМ

± Тетрациклин (до 1 mM) в общем объеме 300 мкл.

Инкубации проводили при 35°C в течение 5 часов. Нерасщепленные фибриллы коллагена, которые образуются в течение первых 10 минут, удаляли центрифугированием при 10000 g, 4°C, 10 минут. 200 мкл супернатанта просчитывали в Packard Opti Phase Supermix сцинтилляционной жидкости с помощью сцинтилляционного счетчика.

Использовали только данные, полученные в пределах линейной части анализа (10-70% лизиса коллагена). На основании процентного ингибирования активности только MMP1 диапазоном концентраций каждого образца рассчитывали величину IC_{50} для каждого тетрациклина с помощью линейного регрессивного анализа.

2. Протокол измерения ингибирования MMP2 (желатиназы A)

Активность MMP2 определяли по высвобождению ТХУ (трихлоруксусная кислота)-растворимых фрагментов из ^{14}C -ацетилованного желатина I типа из кожи крысы (Methods in Enzymology 248, 470, 1995; Biochem. J. 195. 1981)

Составляющие анализа:

100 мкг ^{14}C -меченного желатина (коллагена I типа, денатурированного при 60°C в течение 20 мин)

50 mM Трис-HCl, pH 7,9

15 mM CaCl_2 , 0,02% азида

Рекомбинантная MMP1 человека, 0,1-0,5 нМ

± Тетрациклин (до 1 mM) в общем объеме 250 мкл.

Инкубации проводили при 37°C в течение 16 часов. Реакцию останавливали охлаждением инкубации и добавлением 50 мкл холодной 90% (масса/объем) трихлоруксусной кислоты при осторожном перемешивании. ТХУ-преципитацию продолжали в течение 15 минут при 4°C перед центрифугированием при 10000 g в течение 10 минут при 4°C. 200 мкл ТХУ-супернатанта брали для определения содержания радиоактивности с помощью сцинтилляционного счетчика (сцинтилляционная жидкость Packard Opti Phase Supermix). Использовали только данные, полученные в пределах линейной части анализа (10-70% лизиса). Процентное ингибирование MMP2 каждой концентрацией тетрациклина наносили на график, для того чтобы получить величину IC_{50} , используя линейный регрессивный анализ.

3. Протокол измерения ингибирования MMP3 (стромелизина 1)

Активность MMP3 определяли по высвобождению ТХУ-растворимых фрагментов из ^{14}C -ацетилованного β -казеина (Sigma), как описано в Methods in Enzymology 248, 451 (1995).

Составляющие анализа:

100 мкг ^{14}C -казеина (7000 dpm)

50 mM Трис-HCl, pH 7,9

15 mM CaCl_2 , 0,02% азида

Рекомбинантная MMP3 человека, 0,25-1,0 нМ

±тетрациклин (до 1 mM) в общем объеме 250 мкл.

Инкубации проводили при 37°C в течение 16 часов. Реакцию останавливали добавлением 500 мкл холодной 18%-ной ТХУ и выдерживанием на льду в течение 15 минут. ТХУ-преципитаты удаляли центрифугированием при 10000 g в течение 10 минут при 4°C, и 200 мкл супернатанта брали для сцинтилляционного подсчета. Использовали только данные, полученные в пределах линейной части анализа (10-60% лизиса). Процентное

ингибирование MMP3 каждой концентрацией тетрациклина-кандидата наносили на график, для того чтобы получить величину IC_{50} , используя линейный регрессивный анализ.

4. Протокол измерения ингибирования MMP7 (матрилизина)

Активность MMP7 определяли по высвобождению ТХУ-растворимых фрагментов из ^{14}C -ацетилированного β -казеина (Sigma), как описано в Methods in Enzymology 248, 451 (1995).

Составляющие анализа:

100 мкг ^{14}C -казеина (7000 dpm)

50 mM Трис-HCl, pH 7,9

15 mM $CaCl_2$, 0,02% азида

Рекомбинантная MMP7 человека, 1,5 нМ

$\pm$ тетрациклин (до 1 mM) в общем объеме 250 мкл.

Инкубации проводили при 37°C в течение 16 часов. Инкубацию останавливали добавлением 500 мкл холодной 18%-ной ТХУ и выдерживанием на льду в течение 15 минут. ТХУ-преципитаты удаляли центрифугированием при 10000 g в течение 10 минут при 4°C, и 200 мкл супернатанта брали для сцинтилляционного подсчета. Использовали только данные, полученные в пределах линейной части анализа (10-60% лизиса). Процентное ингибирование MMP7 каждой концентрацией тетрациклина-кандидата наносили на график, для того чтобы получить величину IC_{50} .

5. Протокол измерения ингибирования MMP9 (желатиназы В)

Активность MMP9 определяли по высвобождению ТХУ-растворимых фрагментов из ^{14}C -ацетилированного коллагена I типа из кожи крысы (Methods in Enzymology 248, 470, 1995; Biochem. J. 195, 1981)

Составляющие анализа:

100 мкг ^{14}C -меченного желатина (коллагена, денатурированного при 60°C в течение 20 мин)

50 mM Трис-HCl, pH 7,9

15 mM $CaCl_2$, 0,02% азида

Рекомбинантная MMP9 человека, 1,2-2 нМ

$\pm$ Тетрациклин (до 1 mM) в общем объеме 250 мкл.

Инкубации проводили при 37°C в течение 16 часов. Инкубации останавливали охлаждением инкубации и добавлением 50 мкл холодной 90%-ной (масса/объем) трихлоруксусной кислоты при осторожном перемешивании. ТХУ-преципитацию продолжали в течение 15 минут при 4°C перед центрифугированием при 10000 g в течение 10 минут при 4°C. 200 мкл ТХУ-супернатанта брали для определения содержания радиоактивности с помощью сцинтилляционного счетчика (сцинтилляционная жидкость Packard Opti Phase Supermix). Использовали только данные, полученные в пределах линейной части анализа (10-70% лизиса). Процентное ингибирование MMP9 каждой концентрацией тетрациклина наносили на график, для того чтобы получить величину IC_{50} .

6. Протокол измерения ингибирования MMP14 (MT1-MMP) производными тетрациклина

Активность MMP14 определяли по высвобождению растворимых ^{14}C -меченых фрагментов коллагена из ^{14}C -ацетилированного коллагена I типа из кожи крысы (Methods in Enzymology 80, 711, 1981).

Составляющие анализа:

100 мкг ^{14}C -меченого коллагена (5-6000 dpm)

50 mM Трис-HCl, pH 7,9

15 mM $CaCl_2$ 0,02% азида

Человеческий рекомбинантный MMP14 50-100 нМ

$\pm$ Тетрациклин (до 1 mM) в общем объеме 300 мкл.

Инкубации проводили при 35°C в течение 15 часов. Нерасщепленные фибриллы коллагена, которые образуются в течение первых 10 минут, удаляли центрифугированием при 10000 g, 4°C, 10 минут. 200 мкл супернатанта просчитывали в сцинтилляционной жидкости Packard Opti Phase Supermix с помощью сцинтилляционного счетчика.

Использовали только данные, полученные в пределах линейной части анализа (10-70% лизиса коллагена). На основании процентного ингибирования активности только MMP1 диапазоном концентраций каждого образца рассчитывали величину IC₅₀ для каждого тетрациклина.

- 5 Другая цель состояла в том, чтобы проанализировать *in vitro* эффекты специфических, тетрациклин-производных соединений на хемоинвазивный потенциал следующих клеточных линий:

C8161, клетки меланомы человека

MDA-MB-231, клетки рака молочной железы человека

- 10 PC3, клетки рака простаты человека

RPMI-8226, клетки миеломы человека

Ark, клетки миеломы человека

Arp-1, клетки миеломы человека

- 15 Хемоинвазивный анализ *in vitro* с мембранной инвазивной культуральной системы (МИКС) был выбран, для того чтобы измерить изменения в инвазивном потенциале специфических раковых клеток человека в ответ на тетрациклин-производные соединения. Маточные растворы каждого соединения гидратировали в воде, содержащей 2% ДМСО, с pH 10,0. После солюбилизации к раствору добавляли HCl для установления pH 7,5-8,0. Затем этот раствор заворачивали в фольгу и хранили при 4°C в течение 24 часов

- 20 анализа. Для каждого анализа приготавливали свежее соединение. Анализы по хемоинвазии *in vitro* для определения инвазивности опухолевых клеток выполняют с помощью мембранной инвазивной культуральной системы (МИКС), как описано ранее.

- МИКС-система представляет собой термически обработанную пластиковую разветвленную (коллекторную) систему, состоящую из двух подогнанных комплектов
- 25 чашек, содержащих четырнадцать лунок с диаметром 13 мм. Между этими чашками был размещен поликарбонатный фильтр, содержащий 10 мкм поры и покрытый определенным матриксом, состоящим из человеческого ламинина, коллагена IV, желатина, образующих барьер толщиной 35 мкм между верхней и нижней частями лунок в МИКС. До помещения этого барьера на место нижние лунки заполняли бессывороточной культуральной средой
- 30 RPMI, сделанной на 50% из кондиционированной среды, полученной от 2-дневных культур фибробластов человека, которая была очищена от клеток и клеточного дебриса либо центрифугированием, либо фильтрацией через 0,45 мкм стерильный фильтр. Затем в нижние лунки помещали барьер, и после сборки системы в верхние лунки добавляли свежую бессывороточную среду. Затем в лунки добавляли пятьдесят тысяч опухолевых
- 35 клеток либо в присутствии соединения, либо в присутствии носителя ДМСО (контроли). Из 12 аналитических лунок в каждом коллекторе 3 случайным образом выбранные лунки служили в качестве контролей, 3 лунки содержали 1 мкг/мл соединения, 3 лунки - 10 мкг/мл и 3 лунки - 25 мкг/мл. Через 24 часа из нижних лунок удаляли клетки и среду и заменяли фосфатно-солевым буфером плюс 2 мМ ЭДТА. Этот раствор использовали для
- 40 удаления всех клеток из нижней лунки, и эту промывку добавляли к полученным клеткам плюс среда из той же лунки. Эти образцы затем собирали на полилизин-содержащую поликарбонатную мембрану, содержащую 3 мкм поры, используя дот-блот коллекторную систему. Эти коллектор-фильтры затем фиксировали в метаноле и окрашивали *in situ* с помощью красителя Райта (набор для окрашивания Leukostat). Затем фильтры помещали
- 45 на предметные стекла для микроскопа с иммерсионным маслом для микроскопии, которое уменьшало преломление света от пор, и просчитывали 5 микроскопических полей для расчета количества клеток, которые проникли через мембрану в течение 24 часов. Эти числа затем статистически анализировали, как описано ниже.

ТАБЛИЦА V

№ соеди- нения	Ингибирующая активность матричных металлопротеиназ (ММР)'							Оцениваемые клеточные линии человека и процентное ингибирование				
	ММР-1	ММР-2	ММР-3	ММР-7	ММР-9	ММР-14	Молочная железа MDA-MB-231	Меланома C8161	Множественная миелома RPMI-8226	Предстательная железа PC-3 ML		
1	267	>700	258	815	43	86	7 ^B 20 ^B 5 ^B 25 ^B 25 ^B 32 ^B	5 20 35 ^B 40 ^B 49 ^B 56 ^B	20 10 15 21 ^B 21 ^B 29 ^B	2 47 ^B 60 ^B 13 ^B 24 ^B 24 ^B		
2	479	80	348	>1000	117	119	20 15 30 ^B	20 ^B 25 ^B 27 ^B	+8 +10 ^B +11 1 ^B +4 ^B 7 ^B	20 8 15		
3	>1000	>1000	304	>1000	136	216	+8 +2 12	30 ^B 22 ^B 15 ^B	+7 +23 ^B 27 +22 +3 +24 ^B	3 +1 25 ^B		
4	409	421	219	278	36	61	5 6 2	27 ^B 24 ^B 17	+4 +5 +14	10 +8 3		
5	647	86	237	441	194	447	6 +4 46 ^B	15 27 ^B 35 ^B	6 4 36 17 37 ^B 42 ^B	44 ^B 35 46 ^B		
6	394	135	241	>1000	83	56	+5 +17 ^B 27 ^B 24 44 ^B 42 ^B	18 ^B 33 ^B 32 ^B 8 21 ^B 33 ^B	+6 +25 ^B +5 12 ^B 10 5	21 26 41 ^B 13 32 ^B 30 ^B		
7	П (S)	>1000	300	335	64	>1000	+18 +41 ^B +27	7 14 16	+14 ^B 12 +2	0 0 3		
8	>1000	599	232	388	>1000	>1000	+10 +5 +13	13 ^B 41 ^B 40 ^B	11 3 +2	0 +4 0		
9	372	337	154	507	28	29						

ТАБЛИЦА V

№ соеди- нения	Ингибирующая активность матричных металлопротеиназ (ММР) ¹						Оцениваемые клеточные линии человека и процентное ингибирование											
	ММР-1	ММР-2	ММР-3	ММР-7	ММР-9	ММР-14	Молочная железа MDA-MB-231	Меланома C8161	Множественная миелома RPMI-8226	Предстательная железа PC-3 ML								
10	499	484	96	>1000	41	53	9 +5	27 ^B 0	37 ^B 8	21 7	22 28 ^B	11 30 ^B	3	5	29 ^B	40 ^B 9	50 ^B 16	65 ^B 5
11	427	>1000	270	>1000	96	46	6	15	36 ^B	16	46 ^B	41 ^B				+3	0	36 ^B
12	>1000	>1000	390 ²	503	270	>1000				+11	+13	+12						
13	126	48	206	>1000	64	14	4	0	+9	6	12	14	+11	+13	+12	8	23 ^B	13
14	279	Π	>1000	Π	Π	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												

ТАБЛИЦА V

№ соеди- нения	Ингибирующая активность матричных металлопротеиназ (ММП) ¹						Оцениваемые клеточные линии человека и процентное ингибирование				
	ММП-1	ММП-2	ММП-3	ММП-7	ММП-9	ММП-14	Молочная железа MDA-MB-231	Меланома C8161	Множественная миелома RPMI-8226	Предстательная железа 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 ^B 5 17 48 ^B	0 +1 73 11 +38 ^B +51 ^B	24 ^B 6 42 ^B 20 9 11	17 ^B 35 ^B 70 9 56 ^B 70	
28	>1000	>1000	231		125	49	+24 +36 ^B 54 ^B +7 +15 45 ^B	+20 34 ^B 40 ^B +25 ^B +53 ^B 19	4 +10 34 ^B 5 +3 62 ^B	7 +11 ^B 80 35 ^B 28 ^B 61	

ТАБЛИЦА V

№ соеди- нения	Ингибирующая активность матричных металлопротеиназ (ММР) ¹						Оцениваемые клеточные линии человека и процентное ингибирование				
	ММР-1	ММР-2	ММР-3	ММР-7	ММР-9	ММР-14	Молочная железа MDA-MB-231	Меланома C8161	Множественная миелома RPMI-8226	Предстательная железа PC-3 ML	
29	895	983	213		172	98	+41 ^B 7 59 ^B +13 +25 ^B 17	12 +20 61 ^B +10 +14 ^B 1	13 12 8 29 ^B 13 35 ^B	28 ^B 50 ^B 58 8 8 69	
30	576	>1000	938		>1000	>1000					
31	621	258	>1000		311	593					
32	601	236	244		214	197					
33	295	263	205		142	94					
34	242	242	136		308	197					
35	947	249	218		397	108					
36	539	>1000	283		>1000	608					
37	279	>1000	274		445	41	+6 1 46 ^B	+1 20 69 ^B	10 5 46 ^B	11 26 36	

ТАБЛИЦА V

№ соеди- нения	Ингибирующая активность матричных металлопротеиназ (ММР) ¹						Оцениваемые клеточные линии человека и процентное ингибирование			
	ММР-1	ММР-2	ММР-3	ММР-7	ММР-9	ММР-14	Молочная железа MDA-MB-231	Меланома C8161	Множественная миелома RPMI-8226	Предстательная железа PC-3 ML
38	230	175	95		215	69	+7 37 ^B 70 ^B +14 +14 37	3 1 66 ^B +28 +26 39	33 ^B 13 +11 4 +49 ^B +8	37 ^B 41 ^B 41 38 ^B 27 ^B 52
39	860	186	682		114	83	18 ^B 29 ^B 76 ^B	10 11 24	5 10 46 ^B	44 ^B 67 ^B 69 ^B
40	560	362	91		П	29	9 15 20 ^B	+1 +5 +4	16 11 9	+1 +7 +4
41	478	889	54		250	403	+8 3 2	2 8 6	7 +6 14	+4 4 4
42	П	606	1557		405	428				
43	600	2482	174		319					
44	1438	1468	224		591					
45	384	2446	194		6626					
46	194	3803	42		59	90	20 ^B +5 +1	21 7 10	7 +11 12	20 16 27 ^B

ТАБЛИЦА V

№ соединения	Ингибирующая активность матричных металлопротеиназ (ММР) ¹						Оцениваемые клеточные линии человека и процентное ингибирование			
	ММР-1	ММР-2	ММР-3	ММР-7	ММР-9	ММР-14	Молочная железа MDA-MB-231	Меланома C8161	Множественная миелома RPMI-8226	Предстательная железа PC-3 ML
47	318	117	68		88	60	+17 +16 ^B 0	+30 +4 +2	28 18 60 ^B	3 3 5
48	12831	1929	506		424	354				
49	372	1572	141		489	87	6 +5 +1	27 ^B 7 30 ^B	11 +2 15	4 +5 6
50	211	2533	48		34	40	7 0 2	5 +2 1	+14 +8 +13	+14 +17 +10
51							+15 ^B +18 25 ^B	+9 +31 ^B +122 ^B	14 +26 ^B +2	+4 +13 4
52	>1000	250	>1000	>1000	32	68	5 12 52 ^B	5 15 30	2 26 ^B 68 ^B 19 ^B 33 ^B 46 ^B	52 ^B 68 ^B 70 ^B 31 ^B 48 ^B 63 ^B
53							9 49 ^B 83 ^B	+40 ^B +158 ^B 83 ^B	+95 ^B 18 84 ^B	29 ^B 21 45 ^B

ТАБЛИЦА V

№ соеди- нения	Ингибирующая активность матричных металлопротеиназ (ММР) ¹						Оцениваемые клеточные линии человека и процентное ингибирование ^А								
	ММР-1	ММР-2	ММР-3	ММР-7	ММР-9	ММР-14	RPMI-8226		ARP-1		ARK				
1	276	>700	258	815	43	86	20 21 ^B	10 21 ^B	15 19 ^B	+9	+13	1	9 13	+9 8	+8 17 ^B
2	479	80	348	>1000	117	119	+8 1 ^B +	+10 ^B 4 ^B	+11 7 ^B	10	7	6	20 ^B	9 ^B	10
3	>1000	>1000	304	>1000	136	216	+7 +22	+23 ^B +3	+27 ^B +24 ^B	+13	+1	+16	+11	+6	+15
5	647	86	237	441	194	447	6 17	4 37 ^B	36 42 ^B	+25 ^B	1	4 ^B	+7	22 ^B	21 ^B
6	394	135	241	<1000	83	56	+6 12 ^B	+25 ^B 10	+5 5	HO			12	0	8
9	372	337	154	507	28	98	21 ^B	24 ^B	28 ^B	+14	+21 ^B	7	17 ^B	24 ^B	20 ^B
10	499	484	96	>1000	41	53	3	5	29 ^B	HO			6	+7	1
13	126	48	206	>1000	64	14	+11	+13	+12	HO			2	+7	1

Ключ к Таблице V:
Соединение Вещество

Для таблицы V:

^А использовали концентрации 1, 10 и 25 мкг/мл
в значительное, т.е. P<0,05
+ = повышенная инвазивность
НО = не оценивали
П = следует повторить (количество повторов)

¹ IC₅₀ в мкМ, если не указано иначе
2 Предсказано

- 1: 9-Нитро-6-дезоксид-5-гидрокситетрациклин H_2SO_4
- 2: 9-Амино-6-дезоксид-5-гидрокситетрациклин H_2SO_4
- 3: 9-Изопропиламино-6-дезоксид-5-гидрокситетрациклин H_2SO_4
- 4: 7-Диметиламино-6-деметил-6-дезоксид-9-нитротетрациклин H_2SO_4
- 5 5: То же, что и 2
- 6: 9-Азидо-6-дезоксид-5-гидрокситетрациклин H_2SO_4
- 7: 9-Амино-7-диметиламино-6-деметил-6-дезокситетрациклин H_2SO_4
- 8: 9-Ацетамино-7-диметиламино-6-деметил-6-дезокситетрациклин H_2SO_4
- 9: 7-Диметиламино-6-деметил-6-дезокситетрациклин-9-дiazоний H_2SO_4 HCl
- 10 10: 9-Азидо-7-деметиламино-6-деметил-6-дезокситетрациклин H_2SO_4
- 11: 6-Дезоксид-5-гидрокситетрациклин-9-дiazоний H_2SO_4
- 12: 7-Амино-6-дезоксид-5-гидрокситетрациклин H_2SO_4
- 13: 7,9-Дибром-6-деметил-6-дезокситетрациклин H_2SO_4
- 14: 7-Амино-6-дезоксид-5-гидроксид-9-нитротетрациклин H_2SO_4
- 15 15: 7-Диметиламино-6-дезоксид-5-гидрокситетрациклин H_2SO_4
- 16: 9-Ацетамино-6-дезоксид-5-гидрокситетрациклин H_2SO_4
- 17: 7-Ди-н-Бутиламино-6-дезоксид-5-гидрокситетрациклин H_2SO_4
- 18: 7-Ди-н-Гексиламино-6-дезоксид-5-гидрокситетрациклин H_2SO_4
- 19: 7-Ди-(3,3-диметилбутил)амино-6-дезоксид-5-гидрокситетрациклин H_2SO_4
- 20 20: 7-Азидо-6-дезоксид-5-гидроксид-тетрациклин H_2SO_4
- 21: 6-Дезоксид-5-гидрокситетрациклин-7-дiazоний H_2SO_4
- 22: 7-Ацетамино-9-нитро-6-дезоксид-5-гидрокситетрациклин H_2SO_4
- 23: 7-Ацетамино-6-дезоксид-5-гидрокситетрациклин H_2SO_4
- 24: 7-Ди-н-пропиламино-6-дезоксид-5-гидрокситетрациклин H_2SO_4
- 25 25: 7-Изобутиламино-6-дезоксид-5-гидрокситетрациклин H_2SO_4
- 26: 7-Ацетамино-9-амино-6-дезоксид-5-гидрокситетрациклин H_2SO_4
- 27: 7-Изобутилметиламино-6-дезоксид-5-гидрокситетрациклин H_2SO_4
- 28: 6-Дезоксид-5-ацетоксид-тетрациклин H_2SO_4
- 29: 7-Ацетилизобутиламино-6-дезоксид-5-гидрокситетрациклин H_2SO_4
- 30 30: 7-Ацетамино-6-дезоксид-5-гидрокситетрациклин-9-дiazоний H_2SO_4
- 31: 7-Диметиламино-6-дезоксид-5-гидрокситетрациклин-9-дiazоний H_2SO_4
- 32: 7-Циклобутиламино-6-дезоксид-5-гидрокситетрациклин H_2SO_4
- 33: 7-Циклобутилметиламино-6-дезоксид-5-гидрокситетрациклин H_2SO_4
- 34: 4-Дедиметиламино-6-дезоксид-5-гидрокситетрациклин
- 35 35: 4-Дедиметиламино-6-дезоксид-5-гидроксид-9-нитротетрациклин
- 36: 9-Амино-4-дедиметиламино-6-дезоксид-5-гидрокситетрациклинсульфат
- 37: 4-Дедиметиламино-6-дезоксид-5-гидрокситетрациклин-9-дiazонийсульфат
- 38: 7-Нитро-9-трет-бутил-6-дезоксид-5-гидрокситетрациклин H_2SO_4
- 39: 9-трет-Бутил-6-дезоксид-5-гидрокситетрациклин H_2SO_4
- 40 40: 7-Нитро-9-трет-бутил-4-дедиметиламино-6-дезоксид-5-гидрокситетрациклин H_2SO_4
- 41: 4-Дедиметиламино-7-диметиламино-6-деметил-6-дезокситетрациклин H_2SO_4
- 42: 7-Ацетиламино-9-азидо-6-дезоксид-5-гидрокситетрациклин
- 43: 9-трет-Бутил-6-дезоксид-5-гидрокситетрациклин-7-дiazоний H_2SO_4
- 44: 7-Амино-9-трет-бутил-6-дезоксид-5-гидрокситетрациклин H_2SO_4
- 45 45: 7-Азидо-9-трет-бутил-6-дезоксид-5-гидрокситетрациклин H_2SO_4
- 46: 6-Дезоксид-5-гидрокситетрациклин-4-метилюидид
- 47: 7-(1,2-Бензилкарбоксихидразин)-6-дезоксид-5-гидрокситетрациклин HCl
- 48: 4-Дедиметиламино-7-амино-6-дезоксид-5-гидрокситетрациклин H_2SO_4
- 49: 7-Амино-9-трет-бутил-4-дедиметил-6-дезоксид-5-гидрокситетрациклин- H_2SO_4
- 50 50: 4-Дедиметиламино-9-трет-бутил-6-дезоксид-5-гидрокситетрациклин-7-дiazоний H_2SO_4
- 51: 9-(4-Фторфенил)-6-дезоксид-5-гидрокситетрациклин
- 52: 4-Эпи-7-хлортетрациклин гидрохлорид
- 53: 6-Деметил-6-дезокситетрациклин HCl

Хотя настоящее изобретение было описано со ссылкой на его частную форму осуществления, понятно, что другие многочисленные формы и модификации этого изобретения будут очевидны специалистам в данной области. Приложенную формулу изобретения и само изобретение следует истолковывать в общем смысле, для того чтобы

5 охватить все очевидные формы и модификации, которые соответствуют сущности и находятся в рамках настоящего изобретения.

Формула изобретения

1. Способ лечения рака, включающий введение субъекту, нуждающемуся в таком

10 лечении, эффективного количества 9-амино-6-дезоксидеокси-5-гидрокситетрациклина или его соли.

2. Способ по п.1, где рак выбран из группы, включающей рак молочной железы, меланому, миелому и рак простаты.

3. Способ лечения рака, включающий введение субъекту, нуждающемуся в таком

15 лечении, эффективного количества 9-нитро-6-дезоксидеокси-5-гидрокситетрациклина или его соли.

4. Способ по п.3, где рак выбран из группы, включающей рак молочной железы, меланому, миелому и рак простаты.

20

25

30

35

40

45

50