



INSTITUTO NACIONAL  
DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(11) Número de Publicação: **PT 1137410 E**

(51) Classificação Internacional:

**A61K 31/165** (2006.01) **A61K 31/5375**  
(2006.01)

**A61K 31/40** (2006.01) **A61K 31/495** (2006.01)

**C07C 237/32** (2006.01) **C07C 237/34** (2006.01)

**C07C 237/36** (2006.01) **C07C 237/38** (2006.01)

**C07D 295/00** (2006.01) **C07D 207/00** (2006.01)

(22) Data de pedido: **1999.11.18**

(30) Prioridade(s): **1998.11.18 US 108948**  
**1998.11.18 US 0195013**

(43) Data de publicação do pedido: **2001.10.04**

(45) Data e BPI da concessão: **2006.08.16**  
**001/2007**

(73) Titular(es):

**COLLAGENEX PHARMACEUTICALS, INC.**  
**41 UNIVERSITY DRIVE NEWTOWN, PA 18940US**

(72) Inventor(es):

**JOSEPH J. HLAVKA**  
**ROBERT A. ASHLEY**

**US**  
**US**

(74) Mandatário:

**FRANCISCO NOVAES CUNHA BRITO SOTO MAIOR DE**  
**ATAYDE**  
**AV. DUQUE D'AVILA, N.º 32, 1º ANDAR 1000-141 LISBOA PT**

(54) Epígrafe: **NOVOS DERIVADOS DA TETRACICLINA 4-DEDIMETILAMINA**

(57) Resumo:

### DESCRIÇÃO

EPÍGRAFE:	<b><u>"NOVOS DERIVADOS DA TETRACICLINA 4-DEDIMETILAMINA"</u></b>
-----------	--

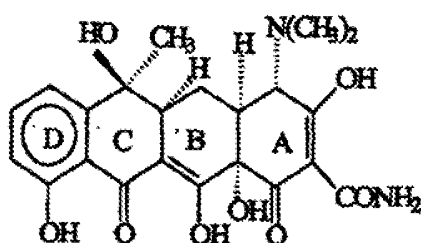
A presente invenção é uma continuação-em-parte do Pedido de Patente Provisório Norte Americano N°. de Série 60/108, 948, depositado em 18 de Novembro de 1998.

## CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção está relacionada com novos derivados da tetraciclina 4- dedimetilamina, com os métodos para produção dos novos derivados e com os métodos de utilização destes derivados.

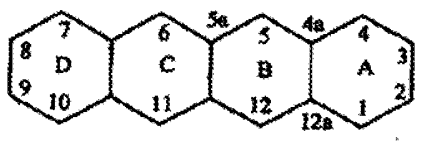
## ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

O composto tetraciclina apresenta a seguinte estrutura geral



## Estrutura A

Com o seguinte sistema de numeração dos anéis do núcleo



Estrutura B

A tetraciclina existe na Natureza, tal como os seus derivados 5-OH (terramicina) e 7-Cl (aureomicina) e todos são antibióticos bem conhecidos. As tetraciclinas naturais podem ser modificadas sem perda das suas propriedades antibióticas, embora seja necessário manter alguns elementos da sua estrutura. As modificações que podem e não podem ser feitas na estrutura básica da tetraciclina foram revistas por Mitscher em *The Chemistry of Tetracyclines*, capítulo 6, Marcel Dekker, Publishers, Nova Iorque (1978). Segundo Mitscher, os substituintes nas posições 5 - 9 do sistema de anéis da tetraciclina podem ser modificados sem que haja perda total das propriedades antibióticas. No entanto, as mudanças no sistema de anéis básico ou substituição dos substituintes nas posições 1 -4 e 10 -12 levam geralmente à obtenção de tetraciclinas sintéticas com actividade antimicrobiana muito reduzida ou sem actividade antimicrobiana efectiva. A tetraciclina 4-dedimetilamina (designada daqui em diante como CMT) é um exemplo de uma das tetraciclinas modificadas quimicamente não antimicrobiana.

Alguns derivados de tetraciclinas 4-dedimetilamina são revelados nas Patentes U.S. Nº 3,029,284 e U.S. Nº 5,122,519. Entre eles incluem-se a tetraciclina 6-demetil-6-desoxi-4-dedimetilamina e a tetraciclina 5-hidroxi-6-desoxi-4-dedimetilamina, com hidrogénio e outros substituintes nas posições C-7 e C-9 do anel D. Estes substituintes incluem os

grupos amina, nitro, di(alquilo baixo) amina e mono (alquilo baixo) amina ou halogéneo. Os derivados da tetraciclina 6-demetil-6-desoxi-4-dedimetilamina e da tetraciclina 5-hidroxi-6-desoxi-4-dedimetilamina são considerados úteis como agentes antimicrobianos.

Outros derivados da tetraciclina 4-dedimetilamina com um grupo oxima na posição C-4 do anel A são revelados nas patentes U.S. N° 3,622,627 e U.S. N° 3,824,285. Estes derivados de oxima têm hidrogénio e halogéneo como substituintes na posição C-7 e incluem a 7-halo-6-demetil-6-desoxi-4-dedimetilamina-4-oximina-tetraciclina e a 7-halo-5-hidroxi-6-desoxi-4-dedimetilamina-4-oximina-tetraciclina.

Os grupos alquilamina (NH-Alquilo) e alquilohidrazona (N-NH-Alquilo) foram substituídos na posição C-4 do anel A da 4-dedimetilamina-tetraciclina. Estes compostos são conhecidos pelas suas propriedades antimicrobianas. Ver as patentes U.S. N° 3,345,370, U.S. N° 3,609,188, U.S. N° 3,622,627, U.S. N° 3,824,685, U.S. N° 3,502,660, U.S. N° 3,509,184, U.S. N° 3,502,696, U.S. N° 3,516,731, U.S. N° 3,265,732, U.S. N° 5,122,519, U.S. N° 3,849,493, U.S. N° 3,722,363 e U.S. N° 3,829,453.

Para além das suas propriedades antimicrobianas, as tetraciclinas têm sido descritas como tendo várias outras utilizações. Por exemplo, sabe-se que as tetraciclinas também inibem a actividade das enzimas da degradação do colagénio, tais como as metaloproteinases de matriz (MMP), incluindo a collagenase (MMP-1), gelatinase (MMP-2) e a estromielina (MMP-3) (Golub e al. , *J. Periodont. Res.* 20: 12-23 (1985); Golub e al. , *Crit. Revs. Oral Biol. Med.* 2: 297-322 (1991); Patente U.S. N° 4,666,897, U.S. N° 4,704,383, U.S. N° 4,935,411, U.S. N° 4,935,412. Também se sabe que as tetraciclinas inibem a perda e a degradação de proteínas do músculo esquelético do

mamífero, Patente U.S. N°. 5,045,538, e estimulam a produção de IL-10 nas células de mamíferos.

Além disso, demonstrou-se na Patente U.S. No. Re. 34,656 que as tetraciclinas aumentam a síntese de proteína no osso e na Patente U.S. N°. 4,704,383 que reduzem a reabsorção do osso em culturas de órgãos.

Da mesma maneira, a Patente U.S. N°.5,532,227 de Golub e al. revela que as tetraciclinas podem melhorar a glicosilação excessiva das proteínas. Em particular, as tetraciclinas inibem a ligação cruzada excessiva do colagénio que é provocada pela glicosilação excessiva do colagénio na diabetes.

Sabe-se que as tetraciclinas inibem a actividade excessiva da fosfolipase A<sub>2</sub> envolvida nas condições inflamatórias tal como a psoríase, como é revelado na Patente U.S. N°.5,532,227. Adicionalmente, sabe-se também que as tetraciclinas inibem a ciclooxigenase (COX-2), o factor de necrose dos tumores (TNF), o óxido nítrico e a IL-1 (interleucina-1).

Estas propriedades fazem com que as tetraciclinas sejam úteis para o tratamento de várias doenças. Por exemplo, foi sugerido por diversas vezes que as tetraciclinas, incluindo as não antimicrobianas, são eficazes para o tratamento de artrites. Ver, por exemplo, 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 New York Academy of Sciences* 732: 181-198 (1994); Klopenburg et al., "Minocycline in Active Rheumatoid Arthritis", *Arthritis Rheum* 37: 629-636 (1994); Ryan et al., "Potentila of Tetracyclines 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).

Também foi sugerida a utilização das tetraciclinas no tratamento de doenças de pele. Por exemplo, White et al., *Lancet*, Apr.29, p.966 (1989) relatou que a tetraciclina minociclina é eficaz no tratamento da epidermólise distrófica bulhosa, que é uma condição da pele mortal que se pensa estar relacionada com o excesso de colagenase.

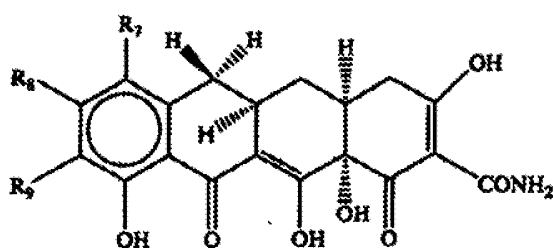
Além disso, há estudos que também apontam para que as tetraciclinas e os inibidores das metaloproteínases inibam a progressão de tumores (DeClerck et al., *Annals N.Y. Acad. Sci.*, 732: 222-232 (1994)), a reabsorção do osso (Rifkin et al., *Annals N.Y. Acad. Sci.*, 732: 165-180 (1994)), a angiogénese (Maragoudakis et al., *Br. J. Pharmacol.*, 111: 894-902 (1994)), e podem ter propriedades anti-inflamatórias (Ramamurthy et al., *Annals N.Y. Acad. Sci.*, 732: 427-430 (1994)).

Com base no descrito, descobriu-se que as tetraciclinas são eficazes em diferentes tratamentos. No entanto, há uma procura de novos derivados da 4-dedimetilamina-tetraciclina, de métodos para produzir os novos derivados e de métodos para utilização destes derivados no tratamento de diferentes tipos de doenças ou condições.

#### SUMÁRIO DA INVENÇÃO

Descobriu-se agora que este e outros objectivos podem ser conseguidos por compostos de 4-dedimetilamina tetraciclina com as fórmulas gerais (I) a (III):

#### FÓRMULA GERAL (I)

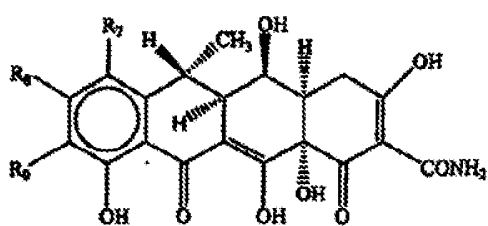


Estrutura K

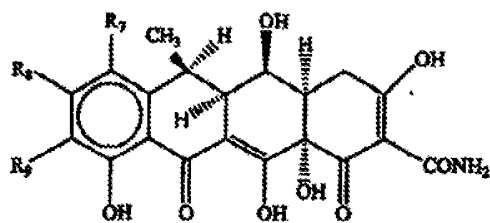
Onde R7, R8 e R9, tomados em conjunto, para cada caso, significam o seguinte:

R7	R8	R9
hidrogénio	hidrogénio	amina
hidrogénio	hidrogénio	palmitamida
hidrogénio	hidrogénio	dimetilamina

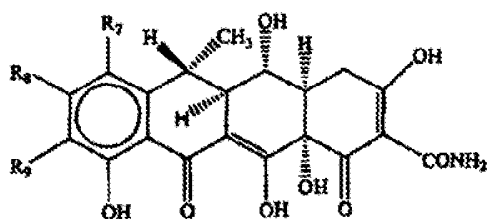
### FÓRMULA GERAL (II)



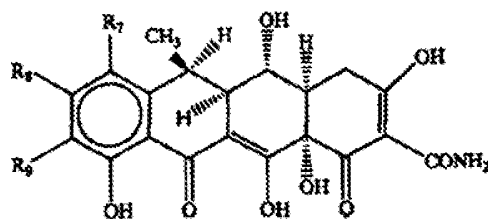
Estrutura L



Estrutura M



Estrutura N

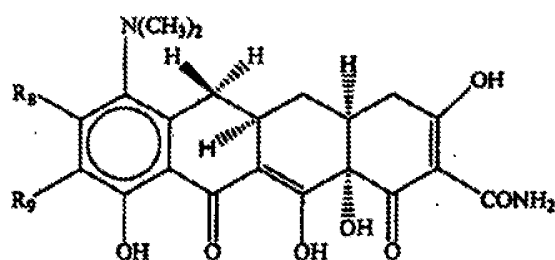


Estrutura O

Onde R7, R8 e R9, tomados em conjunto, para cada caso, significam o seguinte:

R7	R8	R9
hidrogénio	hidrogénio	amina
hidrogénio	hidrogénio	nitro
acrilamina	hidrogénio	hidrogénio
hidrogénio	hidrogénio	acetamida
hidrogénio	hidrogénio	dimetilaminoacetamida

### FÓRMULA GERAL (III)



Estrutura P

Onde R8 é hidrogénio e R9 é nitro.

A presente invenção inclui um método para o tratamento de um mamífero que sofra de uma patologia que possa ser melhorada por administração de uma dose de um composto de tetraciclina não antimicrobiano. Alguns exemplos deste tipo de condições incluem os que se caracterizam pela destruição excessiva do colagénio, excesso de actividade da enzima MMP, excesso de actividade do TNF, excesso de actividade do óxido nítrico, excesso de actividade da IL-1, excesso de actividade da elastase, perda excessiva da densidade óssea, excesso de degradação das proteínas, excesso de definhamento muscular, excesso de glicosilação do colagénio, actividade excessiva de



COX-2, insuficiência de síntese de proteína do osso, produção insuficiente de interleucina 10 ou excesso de actividade da fosfolipase A<sub>2</sub>. O método para tratamento compreende a administração a um mamífero de uma quantidade eficaz de um composto de tetraciclina da invenção.

Estas e outras vantagens poderão ser apreciadas a partir da descrição detalhada da invenção e dos exemplos que aí são apresentados. A descrição detalhada da invenção e os exemplos apresentados aumentam a compreensão da invenção.

#### BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A figura 1 representa o factor de fotoinibição (PIF), também designado por factor de foto irritação, para diversos compostos de tetraciclina.

Para a estrutura K, os compostos indicados são os que se seguem:

COL	R7	R8	R9
308	hidrogénio	hidrogénio	amina
311	hidrogénio	hidrogénio	palmitamida
306	hidrogénio	hidrogénio	dimetilamina

Para as estruturas L, M, N ou O, os compostos indicados são os que se seguem:

COL	R7	R8	R9
801	hidrogénio	hidrogénio	acetamida
802	hidrogénio	hidrogénio	dimetilaminoacetamida
804	hidrogénio	hidrogénio	nitro
805	hidrogénio	hidrogénio	amina

Para a estrutura P, R8 é hidrogénio e R9 é nitro.

## DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

Os compostos particularmente preferidos da presente invenção apresentam substituintes nas posições 7 e/ou 9 da molécula de 4-dedimetilamina-tetraciclina. Estes compostos incluem a 9-amino-6-demetil-6-desoxi-4-dedimetilamina tetraciclina, a 9-nitro-6-demetil-6-desoxi-4-dedimetilamina tetraciclina, a 9-amino-5-hidroxi-6-desoxi-4-dedimetilamina tetraciclina, a 9-nitro-5-hidroxi-6-desoxi-4-dedimetilamina tetraciclina, a 9-acetamida-5-hidroxi-6-desoxi-4-dedimetilamina tetraciclina.

Assume-se que, caso não seja especificada a estereometria de um substituinte nos anéis A-D do novo derivado da tetraciclina 4-dedimetilamina, se pretende incluir ambos os epímeros.

Nesta patente, os grupos NH-alquilo, N-NH-alquilo, alcoxi e alquilo contêm cadeias de carbono de alquilo saturadas ou insaturadas, ramificadas ou não ramificadas contendo de um a vinte e seis átomos de carbono. Por exemplo, os grupos alquilo incluem alquilo gordos, os quais contêm dez a vinte e seis átomos de carbono. Alguns exemplos de grupos alquilo gordos saturados incluem laurilo, miristilo, palmitilo, estearilo, etc. Alguns exemplos de grupos alquilo gordos não saturados incluem palmitoleilo, oleilo, linoleilo, linolenilo, etc.

Os grupos alquilo também incluem os alquilo baixos, os quais incluem cadeias de carbono ramificadas ou não ramificadas, saturadas ou insaturadas, contendo um a seis átomos de carbono. Alguns exemplos de grupos de alquilo baixos são o metilo, etilo, propilo, butilo, isobutilo, n-butilo, butilo secundário, butilo terciário, n-pentilo e benzilo. A variedade de alquilo com grupos acilo é definida como acima. Alguns exemplos de grupos acilo incluem acetilo, propionilo, butirilo e grupos acilo compreendendo ácidos gordos tais como os descritos acima.

Os novos compostos derivados da 4-dedimetilamina tetraciclina da presente invenção ou os seus sais podem ser preparados por substituição das posições C7, C8 e/ou C9 do anel D, utilizando reagentes de partida que podem ser preparados prontamente ou comprados através de métodos conhecidos da arte. Ver, por exemplo, Mitscher, L.A., *The Chemistry of the Tetracyclines Antibiotics*, Marcel Dekker, Nova Iorque (1978), Ch.6; Hlavka, J. and J.H. Boothe, *The Tetracyclines*, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, page 18 (1985) e as Patentes U.S. N°.4,704,383, U.S. N°.3,226,436, U.S. N°.3,047,626, U.S. N°.3,518,306 e U.S. N°.5,532,227.

Por exemplo, pode conseguir-se nitrar a posição C9 do anel D e podem obter-se novos compostos 9-nitro utilizando reagentes de partida conhecidos tais como a tetraciclina 7-dimetilamina-6-demetil-6-desoxi-4-dedimetilamina ou a tetraciclina 6-desoxi-4-dedimetilamina e tratando estes compostos com um ácido forte e sais de nitrato metálicos. Exemplos de ácidos fortes convenientes para utilização na presente invenção: ácido sulfúrico, ácido trifluoroacético, ácido metanossulfónico ou ácido perclórico. Sais de nitrato metálicos convenientes são, por exemplo, nitrato de sódio, potássio ou cálcio. A posição C9 do anel D sofre nitração para formar os compostos de 9-nitro-7-dimetilamina-6-demetil-6-desoxi-4-dedimetilamina tetraciclina ou 9-nitro-6-desoxi-4-dedimetilamina tetraciclina correspondentes.

A aminação da posição C9 do anel D pode ser conseguida tratando uma 9-nitro-4-dedimetilamina tetraciclina tal como a 9-nitro-7-dimetilamina-6-demetil-6-desoxi-4-dedimetilamina ou a 9-nitro-6-desoxi-4-dedimetilamina tetraciclina com azoto na presença de um catalizador compatível conveniente tal como o níquel de Rayne, óxido de platina ou paládio em carbono. A reacção é então filtrada e lavada com um solvente orgânico, tal como éter. O substituinte C9 é reduzido para formar os

compostos 9-amino-7-dimetilamina-6-demetil-6-desoxi-4-dedimetilamina tetraciclina ou 9-amino-6-desoxi-4-dedimetilamina tetraciclina correspondentes.

O grupo amina da posição C9 do anel D pode ser convertido num grupo acilamida, preferivelmente, num grupo acetamida. Por exemplo, os compostos 9-amino-7-dimetilamina-6-demetil-6-desoxi-4-dedimetilamina tetraciclina ou 9-amino-6-desoxi-4-dedimetilamina tetraciclina são tratados com cloreto de acilo, anidrido de acilo, anidrido de acilo misto ou anidrido de sulfonilo na presença de um capturador ácido disperso num solvente. O capturador ácido conveniente pode ser escolhido entre o bicarbonato de sódio, acetato de sódio, piridina, trietilamina, acetamida de N<sub>3</sub>O-bis(trimetilsililo), trifluoroacetamida de N<sub>3</sub>O-bis(trimetilsililo) e uma resina básica de troca iónica. Os solventes convenientes para a acilação incluem água, tetrahidrofurano em água, N-metilpirrolidona, 1,2-dimetil-2-imidazolidiona, hexametilfosforamida, 1,3-dimetil-3,4,5,6-tetrahidro-2-(1H)-pirimidinona ou 1,2-dimetoxietano. O grupo amina da posição C9 pode ser convertido no grupo acetamida para formar, por exemplo, os compostos 9-acetamida-7-dimetilamina-6-demetil-6-desoxi-4-dedimetilamina tetraciclina ou 9-acetamida-6-desoxi-4-dedimetilamina tetraciclina correspondentes.

Um grupo diazónio pode também ser substituído na posição C9 do anel D. Tipicamente, um derivado da 9-amino-4-dedimetilamina tetraciclina tal como a 9-amino-7-dimetilamina-6-demetil-6-desoxi-4-dedimetilamina tetraciclina ou a 9-amino-6-desoxi-4-dedimetilamina tetraciclina em HCl 0.1N em metanol é tratado com nitrato de butilo para formar o derivado de 9-diazónio correspondente tal como a 9-diazónio-7-dimetilamina-6-demetil-6-desoxi-4-dedimetilamina tetraciclina ou 9-diazónio-6-desoxi-4-dedimetilamina tetraciclina.

Os derivados da 9-diazóonio-4-dedimetilamina tetraciclina tais como a 9-diazóonio-7-dimetilamina-6-demetil-6-desoxi-4-dedimetilamina tetraciclina ou a 9-diazóonio-6-desoxi-4-dedimetilamina tetraciclina podem ser tratados com ácido clorídrico metanólico juntamente com um composto triazo, tal como a azida de sódio, para formar derivados 9-azido, tais como a 9-azido-7-dimetilamina-6-demetil-6-desoxi-4-dedimetilamina tetraciclina ou a 9-azido-6-desoxi-4-dedimetilamina tetraciclina.

Em alternativa, um grupo etoxitiocarbonilotio pode ser substituído na posição C9 do anel D. Por exemplo, um derivado 9-diazóonio-4-dedimetilamina tal como a 9-diazóonio-7-dimetilamina-6-demetil-6-desoxi-4-dedimetilamina tetraciclina ou a 9-diazóonio-6-desoxi-4-dedimetilamina tetraciclina é tratado com um sal metálico ácido, tal como etil xantato de potássio para formar o 9-etoxitiocarbonilotio-7-dimetilamina-6-demetil-6-desoxi-4-dedimetilamina tetraciclina ou a 9-etoxitiocarbonilotio-6-desoxi-4-dedimetilamina tetraciclina correspondente.

As reacções acima descrevem a substituição na posição C9 da molécula de tetraciclina 4-dedimetilamina. Algumas substituições podem também ocorrer na posição C7, dependendo dos reagentes de partida e das condições utilizadas, levando à obtenção dos derivados 7-substituídos da tetraciclina 4-dedimetilamina tais como a 7-diazóonio-6-demetil-6-desoxi-4-dedimetilamina tetraciclina ou a 7-azida-6-demetil-6-desoxi-4-dedimetilamina tetraciclina. Os derivados 7-substituídos podem ser separados dos 9-substituídos e purificados tal como discutido abaixo.

Exemplos de melhoramentos específicos são descritos acima como derivados da tetraciclina. Os compostos da invenção não se encontram, no entanto, limitados aos derivados da tetraciclina. A invenção também inclui, embora não se limite a

eles, os mesmos derivados de 4-dedimetilamina e de 4-dedimetilamina 4-substituídos da sanciclina, minociclina e doxiciclina, tal como os derivados da tetraciclina mencionados acima.

A presente invenção engloba os sais, incluindo os sais de adição ácida e sais metálicos dos compostos de tetraciclina 4-dedimetilamina. Estes sais formam-se através de procedimentos bem conhecidos utilizando tanto ácidos e metais farmaceuticamente aceitáveis como farmaceuticamente inaceitáveis. Por "farmaceuticamente aceitáveis" entendem-se todos os sais de ácidos e de metais cuja formação não aumenta substancialmente a toxicidade do composto.

Alguns exemplos de sais convenientes incluem os sais de ácidos minerais tais como os ácidos clorídrico, hidroiódico, brômico, fosfórico, metafosfórico, nítrico e sulfúrico, tal como os sais dos ácidos orgânicos tais como os ácidos tartárico, acético, cítrico, maleico, benzóico, glicólico, glucónico, gulónico, succínico, sulfónico de arilo, e.g., ácidos p-sulfónicos de tolueno, e similares. Os sais de adição farmaceuticamente não aceitáveis, embora não sejam úteis para a terapia, são importantes para o isolamento e purificação das novas substâncias. Mais ainda, eles são utilizados para a preparação de sais farmaceuticamente aceitáveis. Deste grupo, os sais mais comuns incluem os formados pelo ácido fluorídrico e perclórico. Os sais de ácido fluorídrico são particularmente úteis na preparação de sais farmaceuticamente aceitáveis, e.g., os sais de ácido clorídrico, por solução em ácido clorídrico e cristalização do sal de ácido clorídrico formado. Os sais de ácido perclórico são úteis para a purificação e cristalização dos novos produtos.

Enquanto que os sais metálicos podem, em geral, ser preparados e são úteis para várias finalidades, os sais metálicos farmaceuticamente aceitáveis são particularmente

valiosos devido à sua utilidade na terapia. Os metais farmacêuticamente aceitáveis incluem mais vulgarmente o sódio, potássio e os metais alcalino-terrosos de número atômico igual ou menor a 20, i.e., magnésio, e cálcio e, adicionalmente, alumínio, zinco, ferro e manganês, entre outros. É claro que os sais de metais incluem os sais de complexos. i.e., os quelatos metálicos, os quais são bem conhecidos na arte da tetraciclina.

Após a preparação, os novos compostos da presente invenção podem ser convenientemente purificados por métodos padrão conhecidos na arte. Alguns exemplos convenientes incluem a cristalização a partir de um solvente adequado ou a cromatografia de partição em coluna.

Os novos compostos de tetraciclina 4-dedimetilamina da presente invenção podem ser usados *in vivo*, *in vitro* e *ex vivo*, em mamíferos vivos assim como em culturas de tecidos, órgãos ou sistemas de células. Os mamíferos incluem, por exemplo, seres humanos, assim como animais de estimação, tais como cães e gatos, animais criados em laboratório, tais como ratos e ratinhos e animais de quinta, tais como cavalos e vacas. Os tecidos, tal como são aqui utilizados, são agregados de células similarmente especializadas que, em conjunto, desempenham certas funções especiais. Os sistemas celulares cultivados incluem todas as células de mamíferos, tais como células epiteliais, endoteliais, glóbulos vermelhos e glóbulos brancos. Mais particularmente, os monócitos periféricos de sangue humano, células sinoblastóides sinuviais e outras do mesmo tipo.

A presente invenção está orientada para a utilização de um dos compostos derivados da 4-dedimetilamina tetraciclina de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 - 10, para o fabrico de um medicamento para o tratamento de um mamífero que tenha uma patologia que possa melhorar com uma dose não

antimicrobiana do dito composto, a dita patologia sendo caracterizada por destruição excessiva do colagénio, excesso de actividade da enzima MMP, excesso de actividade do TNF, excesso de actividade do óxido nítrico, excesso de actividade da IL-1, excesso de actividade da elastase, perda excessiva da densidade óssea, excesso de degradação das proteínas, excesso de definhamento muscular, excesso de glicosilação do colagénio, actividade excessiva de COX-2, insuficiência de síntese de proteína do osso, produção insuficiente de interleucina 10 ou excesso de actividade da fosfolipase A<sub>2</sub>. O método para tratamento compreende a administração a um mamífero de uma quantidade eficaz de um composto de tetraciclina da invenção.

O termo "excessivo", tal como é aqui utilizado, refere-se ao aumento da actividade em comparação com a actividade normal, o que provoca a algumas patologias em mamíferos ou em células de mamíferos.

O treino *in vivo* da invenção permite a aplicação no alívio ou cuidado paliativo das doenças, patologia e síndromas médicos e veterinários. Em particular, a presente invenção inclui um método para tratar um mamífero que sofra de doenças ou patologias incluindo aneurisma aórtico abdominal, ulceração da córnea, doença periodontal, diabetes, diabetes mellitus, esclerodermia, progeria, doença pulmonar, cancro, doenças de enxerto *versus* hospedeiros, doença da função da medula óssea deprimida, trombocitopenia, desprendimento de articulações protéticas, espondiloartropatias, osteoporose, doença de Paget, doença autoimune, lúpus eritematoso sistémico, patologias inflamatórias crónicas ou agudas, doença renal ou doença do tecido conjuntivo, por administração de uma quantidade eficaz de um composto de tetraciclina ao mamífero.

As doenças cancerosas passíveis de tratamento com os compostos de tetraciclina da presente invenção incluem, sem



estar a eles limitados, carcinomas, blastomas, sarcomas, tal como o sarcoma de Kaposi, gliomas e os doze maiores cancros: cancro da próstata, cancro da mama, cancro do pulmão, cancro colorectal, cancro da bexiga, linfoma não hodgkin, cancro do útero, melanoma, cancro do rim, leucemia, cancro do ovário e cancro do pâncreas.

As patologias inflamatórias agudas ou crónicas passíveis de tratamento pelos compostos de tetraciclina da presente invenção incluem, por exemplo, a doença inflamatória do intestino, artrite, osteoartrite, artrite reumatóide, pancreatite, nefrite, glomerulonefrite, sepsia, choque séptico, choque de endotoxina lipopolissacárida, falência orgânica múltipla ou psoríase.

Entre as doenças pulmonares que é possível tratar por meio da presente invenção incluem-se, por exemplo, a ARDS (Síndrome da dificuldade respiratória do adulto), fibrose quística, enfisema ou danos agudos do pulmão provocados pela inalação de tóxicos. Os produtos tóxicos da combustão, o fumo de cigarro, os venenos industriais e militares, os produtos químicos, e os ácidos são alguns exemplos de tóxicos.

Os novos compostos de tetraciclina da presente invenção podem também ser utilizados para tratar doenças renais. A insuficiência renal crónica, a insuficiência renal aguda, a nefrite ou a glomerulonefrite são exemplos de doenças renais.

Uma quantidade eficaz de um composto de tetraciclina significa aqui a quantidade suficiente para produzir o resultado especificado no tratamento da patologia ou doença. Preferencialmente, o composto ou derivado de tetraciclina é fornecido numa quantidade que apresenta pouca ou nenhuma actividade antimicrobiana. Um composto ou derivado de tetraciclina não é efectivamente antimicrobiano se não evitar significativamente o crescimento de micróbios. Consequentemente, o método pode empregar de forma benéfica um

derivado de tetraciclina que foi modificado quimicamente para reduzir ou eliminar as suas propriedades antimicrobianas. A utilização deste tipo de tetraciclinas modificadas é preferencial na presente invenção, dado que estas podem ser utilizadas a níveis mais elevados do que as tetraciclinas antimicrobianas, ao mesmo tempo que evitam certas desvantagens destas, tal como a eliminação indiscriminada de micróbios benéficos e o aparecimento de micróbios resistentes que acompanha frequentemente a utilização de doses destes compostos antimicrobianos ou antibacterianos.

A dose máxima para um mamífero é a dose mais elevada que não provoca efeitos secundários indesejáveis ou intoleráveis. A dose mínima é a dosagem mais baixa, à qual se observa pela primeira vez um resultado eficaz. Por exemplo, o composto de tetraciclina pode ser administrado em doses desde cerca de 0.1 mg/kg/dia até cerca de 30 mg/kg/dia e, preferencialmente, desde cerca de 1 mg/kg/dia até cerca de 18mg/kg/dia. Em qualquer caso, o especialista guia-se pela sua perícia e conhecimento neste campo e a presente invenção inclui sem limitações dosagens que são eficazes para conseguir o efeito descrito.

O método envolve a administração ou fornecimento de um derivado de tetraciclina numa quantidade que seja eficaz para o tratamento de doenças ou patologias em mamíferos ou em células de mamíferos. A administração dos derivados da tetraciclina pode ser efectuada de diversas maneiras. Em culturas de sistemas celulares (*in vitro*), os derivados da tetraciclina podem ser administrados por contacto directo das células com uma quantidade eficaz do derivado de tetraciclina.

Em mamíferos vivos (*in vivo*), os derivados da tetraciclina da presente invenção podem ser administrados sistemicamente por via parenteral e enteral, o que também inclui sistemas de administração de libertação controlada. Por exemplo, os

derivados da tetraciclina da presente invenção podem ser facilmente administrados por via intravenosa (por exemplo, injeção intravenosa), a qual é uma via preferencial de administração. A administração intravenosa pode ser conseguida misturando os derivados de tetraciclina num transportador farmacêutico conveniente ou excipiente, como é corrente entre os especialistas da arte.

A via oral ou enteral também é contemplada e formulações tais como tabletes, cápsulas, pilhas, trocistos, elixires, suspensões, xaropes, hóstias, pastilhas e afins podem ser utilizados para suplementar o derivado de tetraciclina.

Alternativamente, a administração do derivado da tetraciclina pode incluir a aplicação tópica. Consequentemente, o transportador é preferencialmente conveniente para uso tópico. As composições que se acredita serem convenientes para tais aplicações tópicas incluem géis, salvas, loções, cremes de unguento e afins. O derivado da tetraciclina também pode ser incorporado numa base ou matriz de suporte ou afim para fornecer um penso ou compressa pré-empacotado que podem ser directamente aplicados sobre a pele. A aplicação tópica de derivados de tetraciclina em quantidades até cerca de 25 por cento (m/m) num meio é portanto apropriada dependendo das aplicações. Mais preferencialmente, acredita-se que a aplicação de derivados de tetraciclina em quantidades desde cerca de 0,1% até cerca de 10% é eficaz no tratamento de doenças ou patologias. Acredita-se que estas quantidades não induzem toxicidade significativa nos indivíduos sujeitos ao tratamento.

Por exemplo, em alguns casos pode preferir-se compostos de tetraciclina que apresentem apenas uma biodistribuição limitada, para actividade localizada. A aplicação tópica destes CMTs não absorvíveis é desejável nas lesões orais, uma

vez que os CMTs não serão significativamente absorvidos, mesmo se ingeridos.

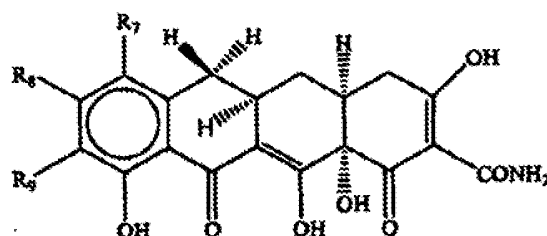
A administração sistémica e tópica coordenada ou combinada de derivados de tetraciclina também se encontra contemplada no âmbito da invenção. Por exemplo, um composto de tetraciclina não absorvível pode ser administrado topicamente, enquanto que um composto de tetraciclina capaz de uma absorção substancial e com uma distribuição sistémica efectiva num sujeito pode ser administrado sistemicamente.

### FOTOTOXICIDADE

Numa modalidade, a invenção relaciona-se com uma classe de compostos com baixa toxicidade. Para identificar os derivados de tetraciclina potencialmente fototóxicos utilizou-se o ensaio de fototoxicidade 3T3 com Vermelho Neutro. Este ensaio é descrito em *Toxicology In Vitro* 12:305-327, 1998.

Resumidamente, cultivam-se células 3T3 em placas de 96 poços e incubam-se de um dia para o outro. O meio de crescimento é removido e substituído por uma solução salina equilibrada de Hank livre, de vermelho fenol, contendo séries de diluições dos CMTs (2 placas por composto). Após incubação inicial durante 1 hora a 37° C, expõe-se uma das placas a 5 Joules/cm<sup>2</sup> de luz branca/UVA originada por um simulador solar, enquanto que a outra é mantida no escuro. As placas são então lavadas, adiciona-se novo meio de cultura e incubam-se durante 24 horas. A visibilidade das células é medida pela absorção do vermelho neutro. A fototoxicidade é medida pela toxicidade relativa entre as doses com e sem exposição à luz seguindo as orientações publicadas (compostos de referência incluem tetraciclina, doxiciclina e minociclina comercialmente disponíveis). A fototoxicidade relativa é designada por factor de fotoinibição (PIF). A resposta fototóxica dos compostos no presente ensaio é consistente com o seu comportamento *in vivo*.

A classe de derivados de tetraciclina com baixa fototoxicidade apresenta menos de 75% da fototoxicidade da minociclina, preferencialmente menos de 70%, mais preferencialmente menos de 60%, e mais preferencialmente 50% ou menos. Idealmente a classe de tetraciclina com baixa fototoxicidade apresenta valores PIF de 1. Ao apresentar um PIF de valor 1, considera-se que um composto não apresenta fototoxicidade mensurável. Os membros desta classe incluem, mas não se limitam a, compostos de tetraciclina com a seguinte fórmula geral:

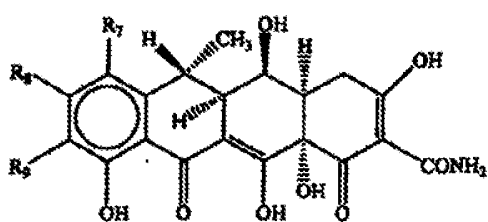


Estrutura K

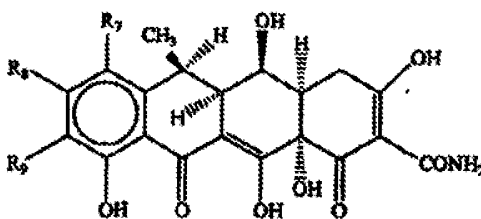
Onde R7, R8 e R9, tomados em conjunto, para cada caso, significam o seguinte:

R7	R8	R9
hidrogénio	hidrogénio	amina
hidrogénio	hidrogénio	palmitamida
hidrogénio	hidrogénio	dimetilamina

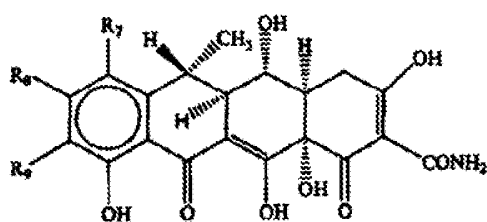
e



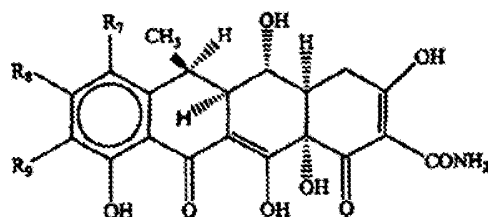
Estrutura L



Estrutura M



Estrutura N

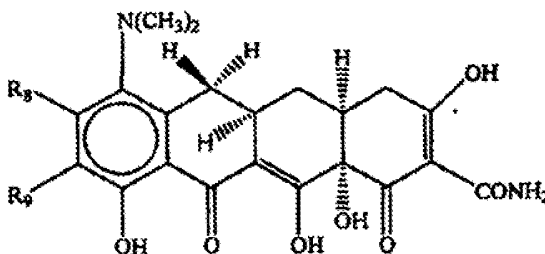


Estrutura O

Onde R7, R8 e R9, tomados em conjunto, para cada caso, significam o seguinte:

R7	R8	R9
hidrogénio	hidrogénio	acetamida
hidrogénio	hidrogénio	dimetilaminoacetamida
hidrogénio	hidrogénio	nitro
hidrogénio	hidrogénio	amina

e



Estrutura P

Onde R8 e R9, tomados em conjunto são hidrogénio e nitro, respectivamente.

#### EXEMPLOS

Os seguintes exemplos servem para fornecer uma melhor apreciação da invenção.

#### EXEMPLO 1

Sulfato de 4-dedimetilamino-7-dimetilamino-6-demetil-6-desoxi-9-nitrotetraciclina

Foram adicionados, a 0°C, 1.05 mmol de nitrato de potássio a uma solução de 1 milimol de 4-dedimetilamino-7-dimetilamino-6-demetil-6-desoxitetraciclina em 25 ml de ácido sulfúrico concentrado. A solução resultante foi agitada em banho de gelo durante 15 minutos e vertida em 1 litro de éter frio com agitação. O sólido precipitado foi deixado em repouso e a maior parte do solvente decantado. O material restante foi filtrado através dum funil de vidro poroso e o sólido recolhido foi bem lavado com éter frio. O produto foi seco num excicador de vácuo durante a noite.

#### EXEMPLO 2

Sulfato de 9-amino-4-dedimetilamino-7-dimetilamino-6-demetil-6-desoxi-tetraciclina

Foram adicionados 50 mg de PtO<sub>2</sub> a uma solução de 300 mg do composto 9-nitro do exemplo 1, em 30 ml de etanol. A mistura foi hidrogenada à pressão atmosférica até a quantidade teórica de hidrogénio ter sido absorvida. O sistema é saturado por pressão com nitrogénio, o catalisador PtO<sub>2</sub> é filtrado e o filtrado adicionado gota-a-gota a 300 ml de éter. O produto assim separado é filtrado e seco num excicador de vácuo.

#### EXEMPLO 3

Sulfato de 9-acetamido-4-dedimetilamino-7-dimetilamino -6-demetil -6-desoxi-tetraciclina

A uma solução fria bem agitada de 500 mg de sulfato de 9-amino-4-dedimetilamino-7-dimetilamino-6-demetil-6-desoxi-

tetraciclina do exemplo 2, em 2.0 ml de 1,3-dimetil-2-imidazolidinona, foram adicionados 500 mg de bicarbonato de sódio seguido de 0.21 ml de cloreto de acetilo. A mistura é agitada à temperatura ambiente durante 30 minutos, filtrada e o filtrado foi adicionado gota-a-gota a 500 ml de éter. O produto assim separado foi filtrado e seco num excicador de vácuo.

#### EXEMPLO 4

Sulfato de 4-dedimetilamino-7-dimetilamino-6-demetil-6-desoxi-9-diazônio-tetraciclina

A uma solução de 0.5 g de sulfato de 9-amino-4-dedimetilamino-7-dimetilamino-6-demetil-6-desoxi-tetraciclina, do exemplo 2, em 10 ml de ácido hidrocloreico 0.1 N em metanol arrefecido num banho de gelo, foram adicionados 0.5 ml de nitrito de n-butilo. A solução foi agitada num banho de gelo durante 30 minutos e depois vertida em 250 ml de éter. O produto assim separado foi filtrado, lavado com éter e seco num excicador de vácuo.

#### EXEMPLO 5

Sulfato de 9-azido-4-dedimetilamino-7-dimetilamino-6-demetil-6-desoxi-tetraciclina

A uma solução de 0.3 mmol de sulfato de 4-dedimetilamino-7-dimetilamino-6-demetil-6-desoxi-9-diazônio-tetraciclina, do exemplo 4, foram adicionados 10 ml de cloreto de hidrogénio metanólico 0.1 N e 0.33 mmol de azida de sódio. A mistura foi agitada à temperatura ambiente durante 1.5 horas. A mistura reaccional foi depois vertida em 200 ml de éter. O produto assim separado foi filtrado e seco num excicador de vácuo.



#### EXEMPLO 6

Sulfato de 9-amino-8-cloro-4-dedimetilamino-7-dimetilamino-6-demetil-6-desoxitetraciclina

Foi dissolvido 1 grama de hidrocloreto de 9-azido-4-dedimetilamino-7-dimetilamino-6-demetil-6-desoxi-tetraciclina, do exemplo 4, em 10 ml de ácido sulfúrico concentrado saturado com HCl a 0°C. A mistura foi agitada num banho de gelo durante 1.5 horas e depois foram adicionados lentamente gota-a-gota a 500 ml de éter frio. O produto assim separado foi filtrado, lavado com éter e seco num excicador de vácuo.

#### EXEMPLO 7

Sulfato de 4-dedimetilamino-7-dimetilamino-6-demetil-6-desoxi-9-etoxitiocarboniltiotetra-ciclina

Uma solução de 1.0 mmol de sulfato de 4-dedimetilamino-7-dimetilamino-6-demetil-6-desoxi-9-diazónio-tetraciclina, do exemplo 4, em 15 ml de água foi adicionado a uma solução de 1.15 mmol de etil xantato de potássio em 15 ml de água. A mistura foi agitada à temperatura ambiente durante 1 hora. O produto separado foi filtrado e seco num excicador de vácuo.

#### EXEMPLO 8

Procedimento Geral para a Nitração

Foram adicionados a 1 mmol de 4-dedimetilamino-6-desoxitetraciclina, em 25 ml de ácido sulfúrico concentrado a 0°C, 1 mmol de nitrato de potássio com agitação. A solução de reacção foi agitada durante 15 minutos e depois vertida para 100 g de gelo triturado. A solução aquosa foi extraída 5 vezes com 20 ml de butanol de cada vez. Os extractos de butanol foram lavados 3 vezes com 10 ml de água de cada vez e

concentrados em vácuo até um volume de 25 ml. O sólido cristalino amarelo-claro que precipitou foi filtrado, lavado com 2 ml de butanol e seco em vácuo a 60°C durante 2 horas. Este sólido era uma mistura dos dois isômeros mononitro.

#### EXEMPLO 8B

##### 4-Dedimetilamino-6-desoxi-9-nitrotetraciclina

A 980 mg do produto de nitração de 4-dedimetilamino-6-desoxitetraciclina (uma mistura dos 2 isômeros) em 25 ml de metanol foi adicionada trietilamina suficiente para dissolver o sólido. A solução filtrada (pH 9.0) foi ajustada para pH 5.2 com ácido sulfúrico concentrado. Foi obtido um sólido cristalino amarelo (236 mg) (rendimento de 29%). Neste ponto o material estava consideravelmente puro e continha apenas pequenas quantidades do 7-isômero. A purificação final foi conseguida por cromatografia de partição líquida usando uma coluna com empacotamento de terras de diatomáceas e o sistema solvente: clorofórmio: butanol: tampão fosfato 0.5 M (pH 2) (16:1:10).

#### EXEMPLO 9

##### 4-Dedimetilamino-6-desoxi-7-nitrotetraciclina

O filtrado de metanol do exemplo 8 foi imediatamente ajustado para pH 1.0 com ácido sulfúrico concentrado. O sólido cristalino amarelo-claro foi obtido como o sal de sulfato. Foi obtida uma base livre purificada por ajuste de uma solução aquosa do sal de sulfato (25 mg/ml) para pH 5.2 com carbonato de sódio 2 N.

#### EXEMPLO 10

##### 9-Amino-4-dedimetilamino-6-desoxitetraciclina

Foram adicionados 50 mg de  $\text{PtO}_2$  a uma solução de 300 mg do composto 9-nitro, preparado no exemplo 8, em 30 ml de etanol. A mistura foi hidrogenada à pressão atmosférica até a quantidade teórica de hidrogénio ter sido absorvida. O sistema é saturado por pressão com nitrogénio, o catalisador  $\text{PtO}_2$  é filtrado e o filtrado adicionado gota-a-gota a 300 ml de éter. O sólido assim separado é filtrado e seco num excicador de vácuo.

#### EXEMPLO 11

##### Sulfato de 9-acetamido-4-dedimetilamino-6-desoxi-tetraciclina

A uma solução fria bem agitada de 500 mg de sulfato de 9-amino-4-dedimetilamino-6-desoxi-tetraciclina, do exemplo 10, em 2.0 ml de 1,3-dimetil-2-imidazolidinona, foram adicionados 500 mg de bicarbonato de sódio seguido de 0.21 ml de cloreto de acetilo. A mistura foi agitada à temperatura ambiente durante 30 minutos, filtrada e o filtrado foi adicionado gota-a-gota a 500 ml de éter. O sólido assim separado foi filtrado e seco num excicador de vácuo.

#### EXEMPLO 12

##### Sulfato de 4-dedimetilamino-6-desoxi-9-diazónio-tetraciclina

A uma solução de 0.5 g de sulfato de 9-amino-4-dedimetilamino-6-desoxi-tetraciclina, do exemplo 10, em 10 ml de ácido hidroclicórico 0.1 N em metanol arrefecido num banho de gelo, foram adicionados 0.5 ml de nitrito de n-butilo. A solução foi agitada num banho de gelo durante 30 minutos e

depois vertida em 250 ml de éter. O sólido assim separado foi filtrado, lavado com éter e seco num excicador de vácuo.

#### EXEMPLO 13

Sulfato de 9-Azido-4-dedimetilamino-6-desoxi-tetraciclina

A uma solução de 0.3 mmol de sulfato de 4-dedimetilamino-6-desoxi-9-diazônio-tetraciclina, do exemplo 12, foram adicionados 10 ml de cloreto de hidrogénio metanólico 0.1 N e 0.33 mmol de azida de sódio. A mistura foi agitada à temperatura ambiente durante 1.5 horas. A mistura reaccional foi depois vertida em 200 ml de éter. O sólido assim separado foi filtrado e seco num excicador de vácuo.

#### EXEMPLO 14

Sulfato de 9-Amino-8-cloro-4-dedimetilamino-6-desoxi-tetraciclina

Foi dissolvido 1 grama de hidrocloreto de 9-azido-4-dedimetilamino-7-dimetilamino-6-desoxitetraciclina, do exemplo 13, em 10 ml de ácido sulfúrico concentrado saturado com HCl a 0°C. A mistura foi agitada num banho de gelo durante 1.5 horas e depois foram adicionados lentamente gota-a-gota a 500 ml de éter frio. O sólido assim separado foi filtrado, lavado com éter e seco num excicador de vácuo.

#### EXEMPLO 15

Sulfato de 4-dedimetilamino-6-desoxi-9-etoxitiocarboniltio-tetraciclina

Uma solução de 1.0 mmol de sulfato de 4-dedimetilamino-6-desoxi-9-diazônio-tetraciclina, do exemplo 12, em 15 ml de água foi adicionada a uma solução de 1.15 mmol de etil xantato

de potássio em 15 ml de água. A mistura foi agitada à temperatura ambiente durante 1 hora. O sólido assim separado foi filtrado e seco num excicador de vácuo.

#### EXEMPLO 16

Sulfato de 9-dimetilamino-4-dedimetilamino-6-desoxi-tetraciclina

A uma solução de 100 mg de sulfato do composto 9-amino, do exemplo 10, em 10 ml de éter etilenoglicol monometílico são adicionados 0.05 ml de ácido sulfúrico concentrado, 0.4 ml de uma solução aquosa de formaldeído a 40% e 100 mg de um catalisador de paládio a 10% sobre carbono. A mistura é hidrogenada à pressão atmosférica e temperatura ambiente durante 20 minutos. O catalisador foi filtrado e o filtrado foi evaporado até à secura sob pressão reduzida. O resíduo é dissolvido em 5 ml de metanol e esta solução foi adicionada a 100 ml de éter. O produto assim separado foi filtrado e seco, com rendimento de 98 mg.

#### EXEMPLO 17

7-Amino-4-dedimetilamino-6-desoxitetra-ciclina

Este composto pode ser feito usando o Procedimento A ou B. Procedimento A. A uma solução de 300 mg do composto 7-nitro, do exemplo 1, em 30 ml de etanol foram adicionados 50 mg de  $\text{PtO}_2$ . A mistura foi hidrogenada à pressão atmosférica até a quantidade teórica de hidrogénio ter sido absorvida. O sistema é saturado por pressão com nitrogénio, o catalisador  $\text{PtO}_2$  é filtrado e o filtrado adicionado gota-a-gota a 300 ml de éter. O sólido assim separado é filtrado e seco num excicador de vácuo.

Procedimento B. Foi dissolvido 1 g de 6-desoxi-4-dedimetilamino-tetraciclina em 7.6 ml THF e 10.4 ml de ácido metanossulfônico a -10°C. Após a mistura aquecer até 0°C foi adicionada uma solução de 0.86 g de azodicarboxilato de dibenzilo e a mistura foi agitada durante 2 horas a 0°C para render 7-[1,2-bis(carbobenziloxi)hidrazino]-4-dedimetilamino-6-desoxitetraciclina. Uma solução de 1 milimol deste material em 70 ml de 2-metoxietanol e 300 mg de Pd-C a 10% foi hidrogenada à temperatura ambiente para dar 7-amino-6-desoxi-4-dedimetilamino-tetraciclina.

#### EXEMPLO 18

##### 7-Amino-6-desoxi-5-hidroxi-4-dedimetilamino-tetraciclina

Foi dissolvido 1g de 6-desoxi-5-hidroxi-4-dedimetilamino-tetraciclina 3 em 7.6 ml THF e 10.4 ml de ácido metanossulfônico a -10°C. Após a mistura aquecer até 0°C foi adicionada uma solução de 0.86 g de azodicarboxilato de dibenzilo em 0.5 ml de THF e a mistura foi agitada durante 2 horas a 0°C para render 7-[1,2-bis(carbobenziloxi)hidrazino]-4-dedimetilamino-6-desoxi-5-hidroxi-tetraciclina. Uma solução de 1 milimol deste material em 70 ml de 2-metoxietanol e 300 mg de Pd-C a 10% foi hidrogenada à temperatura ambiente para dar 7-amino-6-desoxi-5-hidroxi-tetraciclina.

#### EXEMPLO 19

##### Sulfato de 7-acetamido-4-dedimetilamino-6-desoxi-5-hidroxi-tetraciclina

A uma solução fria bem agitada de 500 mg de sulfato de 7-amino-4-dedimetilamino-6-desoxi-5-hidroxi-tetraciclina, do exemplo 18, em 2.0 ml de 1,3-dimetil-2-imidazolidinona, foram adicionados 500 mg de bicarbonato de sódio seguido de 0.21 ml

de cloreto de acetilo. A mistura foi agitada à temperatura ambiente durante 30 minutos, filtrada e o filtrado foi adicionado gota-a-gota a 500 ml de éter. O sólido assim separado foi filtrado e seco num excicador de vácuo.

#### EXEMPLO 20

Hidrocloreto de 4-dedimetilamino-6-desoxi-5-hidroxi-7-diazónio-tetraciclina

A uma solução de 0.5 g de sulfato de 7-amino-4-dedimetilamino-6-desoxi-5-hidroxitetraciclina, do exemplo 19, em 10 ml de ácido hidrocloreto 0.1 N em metanol arrefecido num banho de gelo, foram adicionados 0.5 ml de nitrito de n-butilo. A solução foi agitada num banho de gelo durante 30 minutos e depois vertida em 250 ml de éter. O sólido assim separado foi filtrado, lavado com éter e seco num excicador de vácuo.

#### EXEMPLO 21

7-Azido-4-dedimetilamino-6-desoxi-5-hidroxi-tetraciclina

A uma solução de 0.3 mmol de hidrocloreto de 4-dedimetilamino-6-desoxi-5-hidroxi-7-diazónio-tetraciclina, do exemplo 20, foram adicionados 10 ml de cloreto de hidrogénio metanólico 0.1 N e 0.33 mmol de azida de sódio. A mistura foi agitada à temperatura ambiente durante 1.5 horas. A mistura reaccional foi depois vertida em 200 ml de éter. O sólido assim separado foi filtrado e seco num excicador de vácuo.

#### EXEMPLO 22

Sulfato de 7-amino-8-cloro-4-dedimetilamino-6-desoxi-5-hidroxi-tetraciclina

Foi dissolvido 1 grama de sulfato de 7-azido-4-dedimetilamino-7-dimetilamino-6-desoxi-5-hidroxi-tetraciclina, do exemplo 21, em 10 ml de ácido sulfúrico concentrado (previamente saturado com cloreto de hidrogénio) a 0°C. A mistura foi agitada num banho de gelo durante 1.5 horas e depois foram adicionados lentamente gota-a-gota a 500 ml de éter frio. O sólido assim separado foi filtrado, lavado com éter e seco num excicador de vácuo.

#### EXEMPLO 23

4-Dedimetilamino-6-desoxi-5-hidroxi-7-etoxitiocarboniltio-tetraciclina

Uma solução de 1.0 mmol de hidrocloreto de 4-dedimetilamino-6-desoxi-5-hidroxi-7-diazónio-tetraciclina, do exemplo 20, em 15 ml de água foi adicionado a uma solução de 1.15 mmol de etil xantato de potássio em 15 ml de água. A mistura foi agitada à temperatura ambiente durante 1 hora. O sólido assim separado foi filtrado e seco num excicador de vácuo.

#### EXEMPLO 24

Sulfato de 7-dimetilamino-4-dedimetilamino-6-desoxi-5-hidroxi-tetraciclina

A uma solução de 100 mg de sulfato do composto 7-amino em 10 ml de éter etilenoglicol monometílico são adicionados 0.05 ml de ácido sulfúrico concentrado, 0.4 ml de uma solução aquosa de formaldeído a 40% e 100 mg de um catalisador de



paládio a 10% sobre carbono. A mistura é reduzida com hidrogénio à pressão atmosférica e temperatura ambiente durante 20 minutos. O catalisador foi filtrado e o filtrado foi evaporado até à secura sob pressão reduzida. O resíduo é dissolvido em 5 ml de metanol e esta solução foi adicionada a 100 ml de éter. O produto assim separado foi filtrado e seco, com rendimento de 78 mg.

#### EXEMPLO 25

Sulfato de 7-dietilamino-4-dedimetilamino-5-hidroxi-tetraciclina

A uma solução de 100 mg de sulfato do composto 7-amino em 10 ml de éter etilenoglicol monometílico são adicionados 0.05 ml de ácido sulfúrico concentrado, 0.4 ml de acetaldeído e 100 mg de um catalisador de paládio a 10% sobre carbono. A mistura é reduzida com hidrogénio à pressão atmosférica e temperatura ambiente durante 20 minutos. O catalisador foi filtrado e o filtrado foi evaporado até à secura sob pressão reduzida. O resíduo é dissolvido em 5 ml de metanol e esta solução foi adicionada a 100 ml de éter. O produto assim separado foi filtrado e seco.

#### EXEMPLO 26

Hidrocloreto de 4-dedimetilamino-6-desoxi-7-diazónio-tetraciclina

A uma solução de 0.5 g de sulfato de 7-amino-4-dedimetilamino-6-desoxi-tetraciclina, do exemplo 17, em 10 ml de ácido hidrocloreto 0 N em metanol arrefecido num banho de gelo, foram adicionados 0.5 ml de nitrito de n-butilo. A solução foi agitada num banho de gelo durante 30 minutos e

depois vertida em 250 ml de éter. O sólido assim separado foi filtrado, lavado com éter e seco num excicador de vácuo.

#### EXEMPLO 27

##### 7-Azido-4-dedimetilamino-6-desoxi-tetraciclina

A uma solução de 0.3 mmol de hidrocloreto de 4-dedimetilamino-6-desoxi-7-diazônio-tetraciclina, do exemplo 26, foram adicionados 10 ml de cloreto de hidrogénio metanólico 0.1 N e 0.33 mmol de azida de sódio. A mistura foi agitada à temperatura ambiente durante 1.5 horas. A mistura reaccional foi depois vertida em 200 ml de éter. O sólido assim separado foi filtrado e seco num excicador de vácuo.

#### EXEMPLO 28

##### Sulfato de 7-amino-8-cloro-4-dedimetilamino-6-desoxi-tetraciclina

Foi dissolvido 1 grama de sulfato de 7-azido-4-dedimetilamino-7-dimetilamino-6-desoxitetraciclina em 10 ml de ácido sulfúrico concentrado (previamente saturado com cloreto de hidrogénio) a 0°C. A mistura foi agitada num banho de gelo durante 1.5 horas e depois foram adicionados lentamente gota-a-gota a 500 ml de éter frio. O sólido assim separado foi filtrado, lavado com éter e seco num excicador de vácuo.

#### EXEMPLO 29

##### 4-Dedimetilamino-6-desoxi-7-etoxitiocarboniltio-tetraciclina

Uma solução de 1.0 mmol de hidrocloreto de 4-dedimetilamino-6-desoxi-7-diazônio-tetraciclina, do exemplo 26, em 15 ml de água foi adicionada a uma solução de 1.15 mmol de etil xantato de potássio em 15 ml de água. A mistura foi

agitada à temperatura ambiente durante 1 hora. O sólido assim separado foi filtrado e seco num excicador de vácuo.

#### EXEMPLO 30

Sulfato de 7-dimetilamino-4-dedimetilamino-6-desoxi-tetraciclina

A uma solução de 100 mg do composto 7-amino, do exemplo 26, em 10 ml de éter etilenoglicol monometílico são adicionados 0.05 ml de ácido sulfúrico concentrado, 0.4 ml de uma solução aquosa de formaldeído a 40% e 100 mg de um catalisador de paládio a 10% sobre carbono. A mistura é reduzida com hidrogénio à pressão atmosférica e temperatura ambiente durante 20 minutos. O catalisador foi filtrado e o filtrado foi evaporado até à secura sob pressão reduzida. O resíduo é dissolvido em 5 ml de metanol e esta solução foi adicionada a 100 ml de éter. O produto assim separado foi filtrado e seco.

#### EXEMPLO 31

9-Acetamido-8-cloro-4-dedimetilamino-7-dimetilamino-6-desoxi-6-demetiltetraciclina

A uma solução fria bem agitada de 500 mg de sulfato de 9-amino-8-cloro-4-dedimetilamino-6-desoxi-6-demetil-7-dimetilamino-tetraciclina, do exemplo 6, em 2.0 ml de 1,3-dimetil-2-imidazolidinona, foram adicionados 500 mg de bicarbonato de sódio seguido de 0.21 ml de cloreto de acetilo. A mistura foi agitada à temperatura ambiente durante 30 minutos, filtrada e o filtrado foi adicionado gota-a-gota a 500 ml de éter. O sólido assim separado foi filtrado e seco num excicador de vácuo.

#### EXEMPLO 32

8-Cloro-4-dedimetilamino-7-dimetilamino-6-desoxi-6-demetil-9-etoxitiocarboniltio tetraciclina

Uma solução de 1.0 mmol de hidrocloreto de 8-cloro-4-dedimetilamino-6-desoxi-6-demetil-7-dimetil-amino-9-diazônio-tetraciclina, em 15 ml de água foi adicionada a uma solução de 1.15 mmol de etil xantato de potássio em 15 ml de água. A mistura foi agitada à temperatura ambiente durante 1 hora. O sólido assim separado foi filtrado e seco num excicador de vácuo.

#### EXEMPLO 33

Sulfato de 8-cloro-9-dimetilamino-4-dedimetilamino-7-dimetilamino-6-desoxi-6-demetil-tetraciclina

A uma solução de 100 mg de sulfato do composto 9-amino, do exemplo 6, em 10 ml de éter etilenoglicol monometílico são adicionados 0.05 ml de ácido sulfúrico concentrado, 0.4 ml de acetaldeído e 100 mg de um catalisador de paládio a 10% sobre carbono. A mistura é reduzida com hidrogénio à pressão atmosférica e temperatura ambiente durante 20 minutos. O catalisador foi filtrado e o filtrado foi evaporado até à secura sob pressão reduzida. O resíduo é dissolvido em 5 ml de metanol e esta solução foi adicionada a 100 ml de éter. O produto assim separado foi filtrado e seco.

#### EXEMPLO 34

N-(4-metilpiperazin-1-il) metil-4-dedimetilamino-6-demetil-6-desoxitetraciclina

Uma solução aquosa de 58 mg (37%) de formaldeído (0.72 mmol) foi adicionada a uma solução de 203 mg (0.49 mmol) de 4-

dedimetilamino-6-demetil-6-desoxitetraciclina em 5.0 ml de etilenoglicol dimetil éter. A mistura foi agitada à temperatura ambiente durante 0.5 horas. Foram então adicionados 56 mg (0.56 mmol) de 1-metilpiperazina e a mistura resultante foi agitada durante a noite e posta em refluxo durante 20 minutos. A mistura foi então arrefecida e foi recolhido um produto sólido por filtração. O produto sólido foi então lavado com o solvente e seco por filtração com vácuo.

#### EXEMPLO 35

N-(4-metilpiperazin-1-il)metil-4-dedimetilamino-6-demetil-6-desoxi-9-hexanoilamino-tetraciclina

Uma solução aquosa de 49 mg (37 %) de formaldeído (0.60 mmol) foi adicionada a uma solução de 146 mg (0.30 mmol) de 4-dedimetilamino-6-demetil-6-desoxi-9-hexanoiltetraciclina em 5.0 ml de etilenoglicol dimetil éter. A mistura foi agitada à temperatura ambiente durante 0.5 horas. Foram então adicionados 60 mg (0.60 mmol) de 1-metilpiperazina e a mistura resultante foi agitada durante a noite e posta em refluxo durante 20 minutos. A mistura foi então arrefecida e foi recolhido um produto sólido por filtração. O produto sólido foi então lavado com o solvente e seco por filtração com vácuo.

#### EXEMPLO 36

4-Dedimetilamino-6-demetil-6-desoxi-9-hexanoilaminotetraciclina

Adicionaram-se 1.54 g (7.2 mmol) de anidrido hexanóico e 150 mg de catalisador Pd/C a 10% a 300 mg (0.72 mmol) de 4-dedimetilamino-6-demetil-6-desoxitetraciclina em 6.0 ml de

1,4-dioxano e 6.0 ml de metanol. A mistura foi hidrogenada durante a noite à temperatura ambiente. O catalisador foi removido por filtração e o filtrado foi concentrado sob pressão reduzida. O resíduo foi dissolvido em 7 ml de acetato de etilo e triturado com 50 ml de hexano para produzir um produto sólido. O produto sólido foi filtrado e seco por filtração com vácuo.

Assim, apesar daquilo que foi descrito que se crê serem as modalidades preferidas da presente invenção, os especialistas no ramo compreenderão que podem ser feitas outras modalidades sem afastamento do espírito da invenção, e pretende-se incluir todas essas outras modificações e variações dentro do verdadeiro âmbito do conjunto das reivindicações anexas.

#### EXEMPLO 37

##### Determinação da Fototoxicidade

Obtiveram-se células BALB/c 3T3 (CCL-163) da ATCC que foram postas em cultura em Meio Essencial Mínimo Dulbecco sem antibiótico (4.5g/l de glucose) (DMEM - Dulbecco's Minimum Essential Medium) suplementado com L-glutamina (4mM) e 10% de soro de vitelo recém-nascido. O local de trabalho de células foi preparado de modo a ficar livre de micoplasma. Foram adicionados sulfato de estreptomicina (100 µg/ml) e penicilina (100 IU/ml) ao meio, após as células terem sido tratadas com o objecto de teste em placas de 96 poços.

Foram preparadas diluições em série dos derivados de tetraciclina em DMSO em concentrações de 100 x a concentração de teste final. As diluições CMT em DMSO foram então diluídas numa solução salina equilibrada de Hanks (HBSS - Hanks' Balanced Salt Solution) para aplicação às células. A concentração de DMSO final foi de 1% nas culturas tratadas e de controlo. Para o ensaio de determinação do intervalo de

dose, 8 diluições em série cobriram o intervalo de 100 a 0.03 mg/ml em intervalos de semi-log, enquanto que o ensaio definitivo usou 6 a 8 doses preparadas em intervalos de quarto-log, centradas no ponto de 50% de toxicidade esperável. Em muitos casos, o intervalo de dose para o tratamento sem luz UV foi diferente do intervalo de dose seleccionado com luz UV. 100 µg/ml é a dose mais elevada recomendada para prevenir resultados falsos negativos da absorção UV pelas soluções doseadas.

**Controlos:** Cada ensaio incluiu controlos quer negativos (solvente) quer positivos. Foram usados 12 poços de culturas de controlo negativo em cada placa de 96 poços. Foi usada cloropromazina (Sigma) como controlo positivo e foi preparada e doseada do mesmo modo que os derivados de tetraciclina de teste.

**Simulador Solar:** Um simulador solar Dermalight SOL 3, equipado com um filtro UVA H1 (320–400 nm), foi ajustado para a altura apropriada. A medição da energia através da cobertura de uma placa de microtitulação de 96 poços foi realizada usando um sensor UVA radiómetro UV calibrado. O simulador de altura foi ajustado para distribuir  $1.7 \pm 0.1 \text{ m/Wcm}^2$  de energia UVA (a dose resultante foi de  $1 \text{ J/cm}^2$  durante 10 min.)

**Ensaio de fototoxicidade:** Foram preparadas placas em duplicado para cada material de teste colocando em cultura  $10^4$  3T3 células por poço em µl de meio completo, 24 horas antes do tratamento. Antes do tratamento, o meio foi removido, e as células foram lavadas uma vez com 125 µl de HBSS pré-aquecido. Foram adicionados 50 µl de HBSS pré-aquecido a cada poço. Foram adicionados 50 µl das diluições do objecto de teste aos poços apropriados e as placas retornaram à incubadora durante aproximadamente 1 hora. A seguir à incubação de 1 h, as placas destinadas ao ensaio de fotoirritação foram expostas (com a tampa colocada) a  $1.7 \pm 0.1 \text{ mW/cm}^2$  de luz UVA durante  $50 \pm 2$

minutos à temperatura ambiente, resultando numa dose de irradiação de  $5 \text{ J/cm}^2$ . As placas em duplicado destinadas para o ensaio de citotoxicidade foram mantidas no escuro à temperatura ambiente durante  $50 \pm 2$  minutos. Após os 50 minutos do período de exposição as diluições do objecto de teste foram decantadas das placas e as células lavadas uma vez com 125  $\mu\text{l}$  de HBSS. Foram adicionados 100  $\mu\text{l}$  de meio aos poços e as células incubadas como acima durante  $24 \pm 1$  horas.

Após 24 horas de incubação, o meio foi decantado e foram adicionados 100  $\mu\text{l}$  de meio com Vermelho Neutro (Neutral Red) a cada poço. As placas voltaram para a incubadora e foram incubadas durante aproximadamente 3 horas. Após 3 horas, o meio foi decantado e cada poço enxaguado uma vez com 250  $\mu\text{l}$  de HBSS. As placas foram enxugadas para remover a HBSS e foram adicionados 100  $\mu\text{l}$  de Solvente Vermelho Neutro a cada poço. Após pelo menos 20 minutos de incubação à temperatura ambiente (com agitação), foi medida a absorvância a 550 nm com uma leitor de placas, usando o meio como referência em poços exteriores de branco. Foram obtidos os sobreviventes relativos por comparação da quantidade de vermelho neutro tomado pelo objecto de teste e pelos grupos tratados de controlo positivo com o vermelho neutro tomado pelo grupo negativo na mesma placa. Os valores de  $\text{IC}_{50}$  foram determinados para os dois grupos de UVA, exposto e não exposto, sempre que possível. Foi realizada uma busca do intervalo de dose e pelo menos dois espalhamentos definitivos para cada composto derivado de tetraciclina e controlo.

**Determinação da Fototoxicidade:** A fototoxicidade dos derivados da tetraciclina pode ser medida através do factor fotoinibição (PIF). O PIF foi determinado por comparação do  $\text{IC}_{50}$  sem UVA [ $\text{IC}_{50} (-\text{UVA})$ ] com o  $\text{IC}_{50}$  com UVA [ $\text{IC}_{50} (+\text{UVA})$ ]:



$$PIF = \frac{IC_{50}(-UVA)}{IC_{50}(+UVA)}$$

Se os dois valores  $IC_{50}$  podem ser determinados, o valor de intersecção do factor para discriminar entre fototóxicos e não fototóxicos é um factor de 5. Um factor superior a 5 é indicativo de fototoxicidade potencial do objecto de teste.

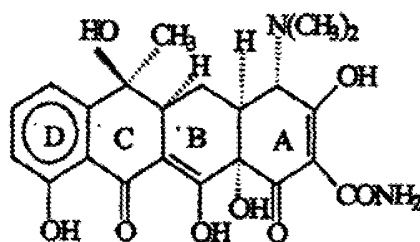
Se um composto químico apenas é citotóxico +UVA e não é citotóxico quando testado com -UVA, o factor não pode ser calculado, embora possa ter um resultado claro indicando algum nível de fototoxicidade potencial. Neste caso, um ">PIF" pode ser calculado e a maior dose de teste (-UVA) será usada para o cálculo de ">PIF."

$$>PIF = \frac{\text{max imum dose}(-UVA)}{IC_{50}(+UVA)}$$

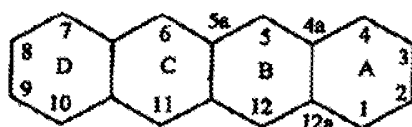
Se ambos,  $IC_{50}$  (-UVA) e  $IC_{50}$  (+UVA) não podem ser calculados porque o composto químico não mostra citotoxicidade (50% de redução da viabilidade) acima da maior dose testada, isto poderá indicar uma falta de fototoxicidade potencial.

#### ÍNDICE DE ESTRUTURAS

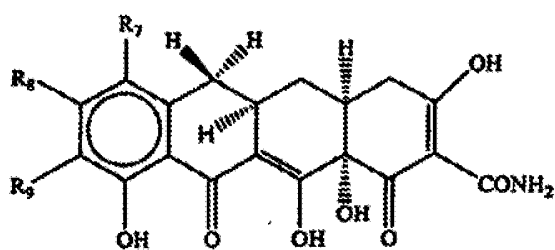
CONSIDERE-SE AS SEGUINTE DENOMINAÇÕES DAS ESTRUTURAS C, D, E, F, G, H, I, J, Q, R, S, T, U, V, W, X, Y E Z.



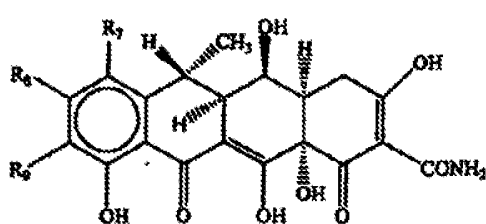
Estrutura A



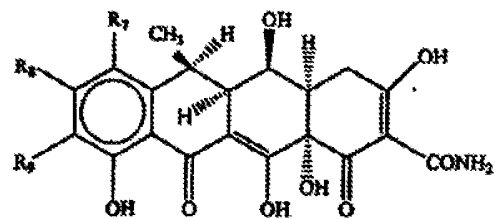
Estrutura B



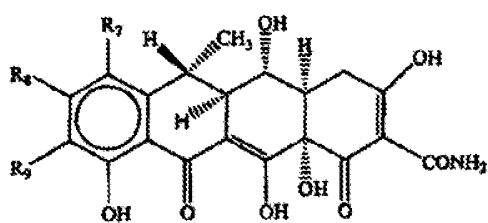
Estrutura K



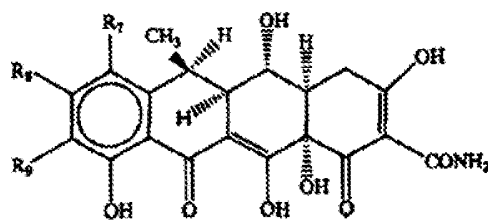
Estrutura L



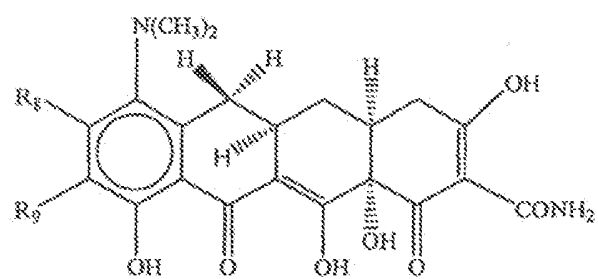
Estrutura M



Estrutura N



Estrutura O

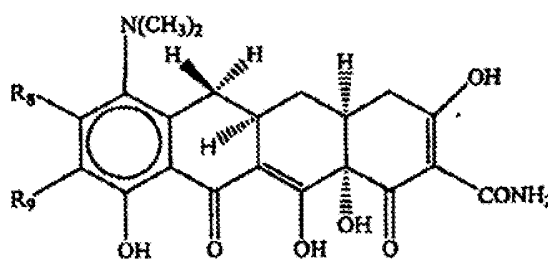


Estrutura P

Lisboa, 15 de Novembro de 2006

## REIVINDICAÇÕES

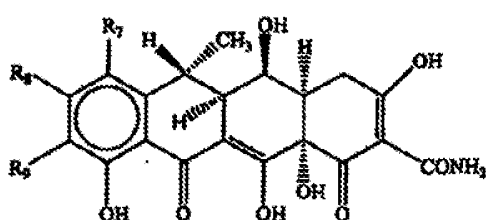
1. Um composto de 4-dedimetilaminotetraciclina com a estrutura P



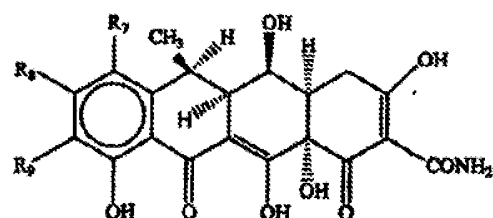
Estrutura P

Caracterizado por R8 ser hidrogénio e R9 ser nitro.

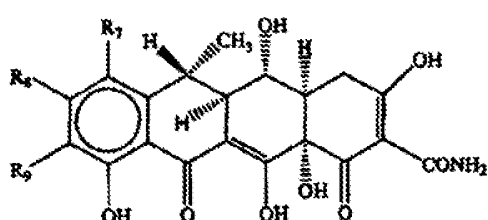
2- Um composto de 4-dedimeilaminotetraciclina com a estrutura L, M, N, ou O



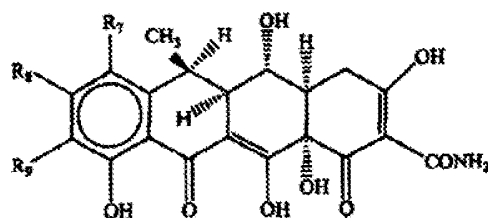
Estrutura L



Estrutura M



Estrutura N



Estrutura O

Caracterizado por: R7, R8 e R9 tomados em conjunto em cada caso, têm os seguintes significados:

R7	R8	R9
hidrogénio	hidrogénio	amino
hidrogénio	hidrogénio	nitro
hidrogénio	hidrogénio	acetamido
hidrogénio	hidrogénio	dimetilaminoacetamido

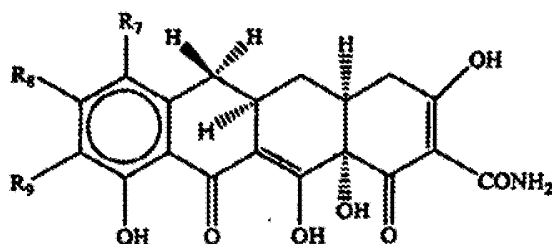
3- Um composto de 4-dedimetilaminotetraciclina, de acordo com a reivindicação N°.2, caracterizado por R7 ser hidrogénio, R8 ser hidrogénio e R9 ser amino.

4- Um composto de 4-dedimetilaminotetraciclina, de acordo com a reivindicação N°.2, caracterizado por R7 ser hidrogénio, R8 ser hidrogénio e R9 ser nitro.

5- Um composto de 4-dedimetilaminotetraciclina, de acordo com a reivindicação N°.2, caracterizado por R7 ser hidrogénio, R8 ser hidrogénio e R9 ser acetamido.

6- Um composto de 4-dedimetilaminotetraciclina, de acordo com a reivindicação N°.2, caracterizado por R7 ser hidrogénio, R8 ser hidrogénio e R9 ser dimetilaminoacetamido.

7- Um composto de 4-dedimetilaminotetraciclina com a estrutura K



Estrutura K

Caracterizado por R7, R8, e R9 tomados em conjunto em cada caso, têm os seguintes significados:

R7	R8	R9
hidrogénio	hidrogénio	amino
hidrogénio	hidrogénio	palmitamida
hidrogénio	hidrogénio	dimetilamino

**8-** Um composto de 4-dedimetilaminotetraciclina, de acordo com a reivindicação N°.7, caracterizado por R7 ser hidrogénio, R8 ser hidrogénio e R9 ser amino.

**9-** Um composto de 4-dedimetilaminotetraciclina, de acordo com a reivindicação N°.7, caracterizado por R7 ser hidrogénio, R8 ser hidrogénio e R9 ser palmitamido.

**10-** Um composto de 4-dedimetilaminotetraciclina, de acordo com a reivindicação N°.7, caracterizado por R7 ser hidrogénio, R8 ser hidrogénio e R9 ser dimetilamino.

**11-** Um composto de 4-dedimetilaminotetraciclina, de acordo com qualquer uma das reivindicações N°.1-N°.10, caracterizado por se destinar a ser usado como um medicamento.

**12-** O uso de um composto de 4-dedimetilaminotetraciclina, de acordo com qualquer uma das reivindicações N°.1-N°.10, para o fabrico de um medicamento para o tratamento de um mamífero com uma patologia que beneficia de uma dose não antimicrobiana do referido composto, a referida patologia sendo **caracterizada** pela destruição excessiva do colagénio, actividade excessiva da enzima MMP, actividade excessiva de TNF, actividade excessiva de óxido nítrico, actividade excessiva de IL-1, actividade excessiva da elastase, actividade excessiva de perda de densidade óssea, degradação excessiva de proteína, definhamento muscular excessivo, glicosilação excessiva de colagénio, actividade excessiva de COX-2, síntese de proteína óssea insuficiente, produção de interleucina-10 insuficiente ou actividade excessiva de fosfolipase A2.

**13-** O uso, de acordo com a reivindicação N°.12, caracterizado por a referida patologia ser um aneurisma da

aorta abdominal, ulceração da córnea, doença periodontal, diabetes, diabetes mellitus, esclerodermia, progeria, doença pulmonar, cancro, doença do enxerto versus hospedeiro, doença da função da medula óssea deprimida, trombocitopenia, desprendimento de articulações protéticas, espondiloartropatias, osteoporose, doença de Paget, doença autoimune, lúpus eritematoso sistémico, patologia inflamatória aguda ou crónica, doença renal ou doença do tecido conjuntivo.

**14-** O uso, de acordo com a reivindicação N°.13, caracterizado por a referida patologia inflamatória aguda ou crónica ser uma doença inflamatória intestinal, artrite, osteoartrite, artrite reumatóide, pancreatite, nefrite, glomerulonefrite, sepsia, choque séptico, choque de endotoxina lipopolissacárida, falência orgânica múltipla ou psoríase.

**15-** O uso, de acordo com a reivindicação N°.13, caracterizado por a referida patologia pulmonar ser ARDS, fibrose quística, enfisema ou dano pulmonar agudo em resultado da inalação de toxinas.

**16-** O uso, de acordo com a reivindicação N°.13, caracterizado por a referida doença renal ser insuficiência renal crónica, insuficiência renal aguda, nefrite ou glomerulonefrite.

Lisboa, 15 de Novembro de 2006