

Synthesen von neuen Tetracyclinderivaten mit antibakterieller Wirkung bei tetracyclinresistenten Keimen

Von

Hellmuth Reinshagen und Eberhard Schütze

Pharma-Forschung, Hoechst AG, Frankfurt a. M.,
Bundesrepublik Deutschland

(Eingegangen am 31. März 1976)

Syntheses of New Tetracycline Derivatives Active Against Tetra- cycline Resistant Bacteria

The syntheses of N(b)-cycloheptatrienyltetracyclines and N(b)-cycloheptyltetracyclines are reported. The type of substitution at N(b) of tetracyclines is correlated with the antibacterial activity against tetracycline resistant strains.

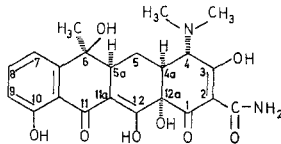
Unter den klinisch angewandten Antibiotika nehmen die Tetracycline eine besondere Stellung ein, gehören sie doch zur Gruppe der sogenannten Breitbandantibiotika¹, die sowohl grampositive wie gramnegative Bakterien als auch pathogene Erreger aus der Gruppe der Rickettsien, Chlamydien und Mykoplasmen, in ihrem Wachstum hemmen. Damit stellen die Tetracycline für den Arzt die Mittel der ersten Wahl dar, wenn es gilt, eine bedrohliche Infektion zu bekämpfen, ehe noch die Natur der Erreger ermittelt werden konnte.

Der Wert von Antibiotika wird bei länger dauernder Anwendung eingeschränkt durch die Abwehrreaktion der Mikroorganismen, die durch Ausbildung von Resistenzen gegen die antimikrobielle Aktivität der Antibiotika unempfindlich werden². Durch strukturelle Abwandlungen der Antibiotika gelingt es manchmal, Resistenzen zu durchbrechen. Das Ziel der in diesem Beitrag beschriebenen Umsetzungen mit Tetracyclinen war die Herstellung von Derivaten dieser Antibiotika, die in niedrigen Konzentrationen solche Bakterien in ihrem Wachstum hemmen, die gegen die als Ausgangsmaterial eingesetzten Tetracycline resistent geworden sind.

Chemisch bietet sich im Molekül des Tetracyclins (1) eine Reihe von Strukturteilen an, die durch Abänderung zu einer Modifikation der

antibakteriellen und pharmakokinetischen Eigenschaften der Verbindung führen könnten³.

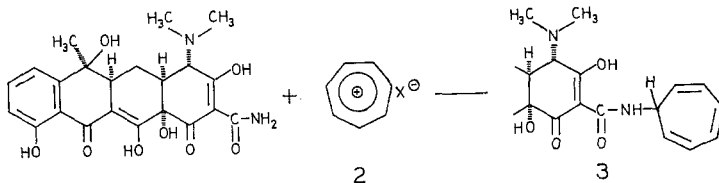
Der Stickstoff der Dimethylaminogruppe wird als N(a), der der Carboxamidgruppe als N(b) bezeichnet.



1

Ein Teil dieser Möglichkeiten wird bereits von den Streptomyccetenstämmen, die Tetracycline produzieren, verwirklicht. Bekannt sind davon neben anderen das 5-Hydroxytetracyclin oder das 7-Chlortetracyclin. Für chemische Modifikationen kommt neben dem aromatischen Ring und den C-Atomen 6 und 12 a besonders die Carboxamidgruppe in Stellung 2 in Frage. Sehr erfolgreich wurde die Aminomethylierung^{4, 5} der Carboxamidgruppe bearbeitet, die zu gut in Wasser löslichen, biologisch voll wirksamen, parenteral anwendbaren Tetracyclinen führte. Alle übrigen, bisher bekannt gewordenen Substitutionen am Carboxamidstickstoff der Tetracycline ergaben dem zugehörigen Tetracyclin entweder unterlegene oder antibakteriell gänzlich wirkungslose Derivate⁴.

Ähnlich wie bei der Aminomethylierung wurde der nucleophile Charakter der Carboxamidgruppe am C-Atom 2 der Tetracycline auch für die zu beschreibenden Umsetzungen genützt. Die Reaktion von Tropyliumsalzen (2) führte in guten Ausbeuten zu den N(b)-Cycloheptatrienyltetracyclinen (3), neuen Derivaten dieses Ringsystems.



Die N(b)-Cycloheptatrienyltetracycline stellen gelbe bis cremefarbene, kristalline Substanzen dar, die unter Zersetzung schmelzen, in Wasser unlöslich sind, jedoch sowohl in protonenhaltigen organischen Lösungsmitteln, wie Alkoholen, Aminen und dergleichen, aber auch in protonfreien Lösungsmitteln, wie Halogenkohlenwasserstoffen und Äthern, gut bis sehr gut löslich sind. Aus den Elementaranalysen und den spektroskopischen Befunden geht hervor, daß die neuen Verbindungen im Tetracyclinteil strukturell unverändert sind. Darüber hinaus zerfallen die Verbindungen

bei mehrtägigem Aufbewahren in verdünnt saurer wäßriger Lösung, und die Ausgangstetracycline können unverändert sowohl chromatographisch nachgewiesen wie auch präparativ isoliert werden. Die Verteilung der Doppelbindungen im Cycloheptatrienylrest wurde durch die NMR-Spektren bewiesen, die 6 Protonen an doppelt gebundenen C-Atomen anzeigen. Die Werte für N(b)-Cycloheptatrienyltetracyclin lauten: $\delta = 6,77$ (2 H, t); $\delta = 6,30$ (2 H, m); $\delta = 5,52$ (2 H, q); sowie durch das Signal für das Proton bei $\delta = 4,34$ (1 H, m), das dem Proton am C-Atom im Siebenring zugeordnet wird, das auch das NH- der Carbonamidgruppe trägt. Das Massenspektrum zeigt mit $M = 534$ für das N(b)-Cycloheptatrienyltetracyclin die Molmasse.

Beweisend für die Bindung des Cycloheptatrienylrestes am Stickstoff der Carbonamidgruppe war der Abbau des Cycloheptyloxytetracyclins, das durch katalytische Hydrierung der Cycloheptatrienylverbindung erhalten wurde. Bei der alkalischen Spaltung der Amidbindung des Cycloheptylderivates entstand unter Zerstörung des Tetracyclineiles Cycloheptylamin, das sowohl gaschromatographisch identifiziert wurde, als auch in Form des Benzoylderivates mit einer authentischen Probe völlig übereinstimmte.

Als beste Ausführungsform der Reaktion von Tetracyclinen mit Tropyliumsalzen erwies sich die Umsetzung in wäßriger Lösung mit einem Mol einer Base, wie Triäthylamin. Wie die Zusammenstellung im experimentellen Teil zeigt, eignen sich alle bekannten, antibakteriell wirksamen Tetracycline für die beschriebene Reaktion. Als Tropyliumsalze kommen das Bromid, Chlorid, Perchlorat und besonders das Fluoroborat in Frage, das in einfacher Weise nach der Vorschrift in Organic Syntheses⁶ dargestellt werden kann.

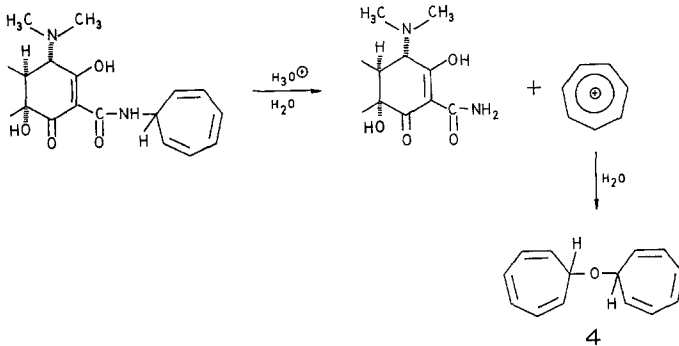
Bei der Umsetzung von substituierten Tropyliumsalzen mit Tetra-

Tabelle 1. Minimale Hemmkonzentrationen (in $\mu\text{g/ml}$) von N(b)-Cycloheptatrienyltetracyclin (1), N(b)-Cycloheptatrienyl-5-hydroxytetracyclin (2), Tetracyclinhydrochlorid (3) und 5-Hydroxytetracyclinhydrochlorid (4) gegen tetracyclinsensible und tetracyclinresistente Staphylokokken- und Streptokokkenstämmen

Stämme	1	2	3	4
Streptokokkus pyogenes 308 (serol. Gr. A)	0,6	0,3	0,08	0,03
Streptokokkus faecalis (serol. Gr. D)	0,5	0,5	0,3	0,3
Streptokokkus faecium MD 8 b (serol. Gr. D)	3,1	6,2	25	25
Staphylokokkus aureus SG 511	1,3	1,3	0,08	0,08
Staphylokokkus aureus 285	1,3	6,2	125	250
Staphylokokkus aureus 503	1,3	6,2	250	250

cyclinen entstehen größtenteils Gemische der Cycloheptatrienylderivate, über deren Trennung und Strukturzuordnung später berichtet werden soll.

Die neuen Cycloheptatrienyltetracycline sind antibakteriell den zugehörigen Tetracyclinen bei den gegen diese empfindlichen Bakterienstämmen gleichwertig, zeigen aber besonders gegen tetracyclinresistente Staphylokokken und Streptokokken gute bis sehr gute Hemmwerte, wie aus Tab. 1 hervorgeht. Man könnte annehmen, daß die Cycloheptatrienyltetracycline nur eine biologische Transportform der Tetracycline darstellen, denn die Verbindungen werden in saurer Lösung rückgespalten, wobei das Tropyliumsalz in nicht zu starker Säure zum Bis-tropylidenäther (4) weiterreagiert.



Dieser Auffassung steht die biologische Wirkung der N(b)-Cycloheptyltetracycline entgegen, die, wie vorstehend beschrieben, hergestellt und nur unter extremen Bedingungen gespalten werden. Tab. 2 zeigt die Hemmwerte von N(b)-Cycloheptyltetracyclinen im Vergleich zu den zugehörigen Tetracyclinen bei tetracyclinresistenten Bakterienstämmen.

Tabelle 2. Minimale Hemmkonzentrationen (in $\mu\text{g/ml}$) von N(b)-Cycloheptyltetracyclin (1), N(b)-Cycloheptyl-5-hydroxytetracyclin (2), Tetracyclinhydrochlorid (3) und 5-Hydroxytetracyclinhydrochlorid (4) bei tetracyclinresistenten Staphylokokken- und Streptokokkenstämmen

Stämme	1	2	3	4
Staphylokokkus aureus 285	0,3	0,3	125	250
Staphylokokkus aureus 503	0,3	0,3	250	250
Streptokokkus R 63/569 (serol. Gr. A)	1,6	6,2	31,5	31,5
Streptokokkus R 63/3136 (serol. Gr. A)	1,6	6,2	31,5	31,5
Streptokokkus faecium MD 8 b (serol. Gr. D)	3,1	6,2	25	25

Es muß erwähnt werden, daß die N(b)-Cycloheptyltetracycline bei tetracyclinsensiblen Bakterienstämmen den am N(b)- unsubstituierten Verbindungen deutlich unterlegen sind.

Experimenteller Teil

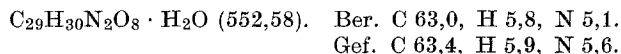
Es werden nur zwei typische Ausführungsformen der Darstellung der neuen Tetracyclinderivate beschrieben und die übrigen aufgezählt. Schmelzpunkte wurden auf dem Heitzisch nach *Kofler* bestimmt und sind unkorrigiert.

NMR-Spektren wurden auf einem Varian HA 100, Massenspektren mit dem Varian CH 7 gemessen.

N(b)-Cycloheptatrienyltetracyclin

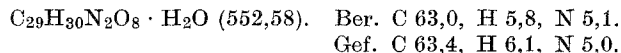
3,33 g (7,5 mMol) Tetracyclinbase wurden in 30 ml trock. Tetrahydrofuran (*THF*) gelöst und nach Zufügen von 0,75 g (7,5 mMol) Et_3N unter kräftigem Rühren bei Raumtemp. 1,34 g (7,5 mMol) fein gepulv. Tropyliumfluorborat eingetragen. Nach weiterem 2stdg. Rühren wurde unter Umrühren in 120 ml Wasser gegossen. Der Niederschlag wurde abgesaugt, dreimal mit je 10 ml Wasser gewaschen und noch feucht mit 10 ml Wasser im Turbomischer durchgearbeitet. Nach dem Absaugen wurde aus Äthanol/Wasser umkristallisiert: 3,10 g (74% d. Th.) feine gelbe Nadeln, Schmp.: 153—158 °C.

Die Verbindung ist das Monohydrat des N(b)-Cycloheptatrienyltetracyclin.

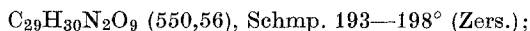


N(b)-Cycloheptatrienyl-5-oxy-6-desoxy-tetracyclin

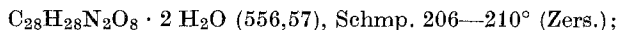
2,40 g (5 mMol) 5-Oxy-6-desoxy-tetracyclinhydrochlorid wurden in 50 ml Wasser gelöst, die Lösung mit 1,07 g (6 mMol) Tropyliumfluorborat versetzt und bei Raumtemp. während 15 Min. 1,40 ml (10 mMol) Et_3N zugeotropft. Der pH-Wert der Lösung stieg dabei auf 6,7 an. Es wurde 45 Min. nachgerührt, danach im Eisbad abgekühlt, der Niederschlag abgesaugt und mit 3 ml Eiswasser nachgewaschen. Das noch feuchte Rohprodukt wurde in 50 ml *THF* gelöst, die Lösung filtriert und im Vak. auf ca. 15 ml eingeeengt. Dabei fällt das Monohydrat der Verbindung in Form beigegelber Kristalle aus. Abkühlen der eingeeengten Lösung und Absaugen sowie Trocknen der Kristalle ergab 1,74 g (63% d. Th.) N(b)-Cycloheptatrienyl-5-oxy-6-desoxytetracyclin-Monohydrat, das bei 128—130 °C (Zers.) schmilzt.



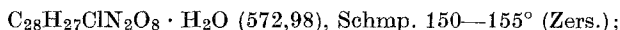
N(b)-Cycloheptatrienyl-5-hydroxytetracyclin



N(b)-Cycloheptatrienyl-6-desmethyltetracyclin



N(b)-Cycloheptatrienyl-6-desmethyl-7-chlortetracyclin



N(b)-Cycloheptatrienyl-7-chlortetracyclin

$C_{29}H_{29}ClN_2O_8$ (569,01), Schmp. 155—157° (Zers.).

Für alle aufgeführten Verbindungen wurden befriedigende Elementaranalysen erhalten.

N(b)-Cycloheptyltetracyclin

5,52 g (10 mMol) N(b)-Cycloheptatrienyltetracyclin-monohydrat wurden in 100 ml Methanol mit 0,5 g 10proz. Pd/C bei 20,5 °C unter H_2 geschüttelt. Nach 4½ Stdn. war die ber. Wasserstoffmenge aufgenommen. Die Lösung wurde vom Katalysator abfiltriert und im Vak. zur Trockene eingedampft. Der Rückstand wurde in 40 ml CH_2Cl_2 aufgenommen, über eine kurze Kieselgelsäule filtriert und nach dem Eindampfen aus Äthylacetat kristallisiert. 5,1 g (94% d. Th.) Substanz, Schmp. 169—172 °C (Zers.) erhalten.

$C_{29}H_{36}N_2O_8$ (540,62). Ber. C 64,3, H 6,7, N 5,2.

Gef. C 63,9, H 6,8, N 5,4.

N(b)-Cycloheptyl-5-hydroxytetracyclin

$C_{29}H_{36}N_2O_9$ (557,12), Schmp. 203—206° (Zers.).

N(b)-Cycloheptyl-6-desoxy-5-oxytetracyclin

$C_{29}H_{36}N_2O_8$ (540,62), Schmp. oberhalb 180° (Zers.).

0,57 g N(b)-Cycloheptyl-5-hydroxytetracyclin wurden in 5 ml 25proz. KOH 30 Min. auf 110° erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde auf etwa 15 ml mit Wasser verdünnt und nach dem Sättigen mit KCl viermal mit je 10 ml CH_2Cl_2 extrahiert. Nach dem Trocknen über KOH wurde eingedampft. Der Rückstand wurde gaschromatographisch mit Cycloheptylamin identifiziert.

Benzoylieren des Rückstandes ergab Kristalle, Schmp. 130—131 °C, die nach IR-Spektrum und Mischschmelzpunkt mit einer authentischen Probe von N-Benzoylcycloheptylamin identisch waren.

Literatur

- ¹ A. M. Walter und L. Heilmeyer, Antibiotikafibel, 3. Aufl. Stuttgart: G. Thieme. 1969.
- ² H. Zähler, Biologie der Antibiotika. Berlin-Heidelberg-New York: Springer. 1965.
- ³ W. Dürckheimer, Angew. Chem. **87**, 751 (1975).
- ⁴ F. Lindner, W. Siedel und A. Söder, Münchn. Med. Wochenschr. **100**, 661 (1958).
- ⁵ W. J. Gottstein, W. F. Minor und L. C. Cheney, J. Amer. Chem. Soc. **81**, 1198 (1959).
- ⁶ Organic Syntheses **43**, 101 (1963).

Korrespondenz und Sonderdrucke:

Dr. H. Reinshagen
Sandoz Forschungsinstitut
Brunnerstraße 59
A-1235 Wien
Österreich