

ANGEWANDTE CHEMIE

87. Jahrgang 1975
Heft 21
Seite 751–784

Tetracycline: Chemie, Biochemie und Struktur-Wirkungs-Beziehungen^[**]

Von Walter Dürckheimer^[*]

Die Antibiotika der Tetracyclin-Reihe spielen nach wie vor eine wichtige Rolle in der Human- und Veterinärmedizin sowie in der Tierernährung. Zu den klassischen, fermentativ gewonnenen Tetracyclinen sind partialsynthetische Produkte gekommen, die vor allem durch günstigere pharmakokinetische Eigenschaften und bessere Verträglichkeit Vorteile bieten. Nach einem Rückblick auf ältere Arbeiten werden Partial- und Totalsynthesen von Tetracyclinen und die Einflüsse elektronischer, sterischer und lipophiler Faktoren sowie der Komplexbildung auf die biologische Wirksamkeit beschrieben. Auch auf die Hemmung biochemischer Systeme, die für die Deutung der Wirkungsweise von Interesse sind, und auf Probleme der Resistenzentwicklung wird eingegangen.

1. Einleitung

Die Ära der Antibiotika begann vor rund 30 Jahren. Zwischen 1940 und 1960 wurden die Prototypen der meisten Antibiotika, die heute eine bedeutende Rolle in der Therapie spielen, entdeckt. Kennzeichnend war die rasche Folge der Entdeckungen und die baldige Einführung in die Praxis.

Seit 1960 sind relativ wenige, in Struktur und Wirkung völlig neuartige Antibiotika zur Anwendung gekommen, obwohl die Zahl neu entdeckter mikrobieller Metaboliten nicht abgenommen hat^[1]. Ein Hauptgrund liegt darin, daß die Anforderungen an ein neues Antibiotikum ständig gestiegen sind. Fragen der Toxizität, der Pharmakokinetik, der Stabilität, der Reinheit und des Metabolismus spielen eine zentrale Rolle bei der Beurteilung. Die Zeit und die Kosten für eine Neuentwicklung haben enorm zugenommen.

Waksman^[2] schrieb 1945, daß dem Chemiker eine bedeutende Rolle bei der Weiterentwicklung der Antibiotika zukommen werde, indem er in diesen Naturstoffen Wirkmodelle erkennt und sie durch chemische Abwandlung oder Totalsynthesen optimiert. Diese Theorie erwies sich in vielen Fällen als fruchtbar. Die Fortschritte der letzten Dekade sind hauptsächlich durch chemische Abwandlungen der klassischen Antibiotika erzielt worden.

2. Entdeckung und Strukturaufklärung

Das erste Tetracyclin war das von Duggar^[3] 1948 aus dem Kulturfiltrat von *Streptomyces aureofaciens* isolierte Aureomycin (1) (Tabelle 1). Terramycin (2) wurde 1950 von Finlay et al.^[4] aus *S. rimosus* isoliert und als erster Vertreter dieser Verbindungsklasse von Woodward und einem Forscherteam der Firma Chas. Pfizer and Co.^[5] strukturell aufgeklärt. Den Prototyp, das Tetracyclin (3), stellte man zunächst durch katalytische Hydrierung von Aureomycin (1) her^[6, 7], konnte es aber kurze Zeit später auch fermentativ gewinnen^[8]. McCor-

[*] Dr. W. Dürckheimer
Hoechst AG
623 Frankfurt a. M.-Höchst 80, Postfach

[**] Erweiterte Fassung eines Vortrages vor der Gesellschaft Deutscher Naturforscher und Ärzte am 17. Sept. 1974 in Berlin.

mick et al.^[9] entdeckten 1957 6-Desmethylchlortetracyclin (4), das von einer *S.aureofaciens*-Mutante gebildet wird.

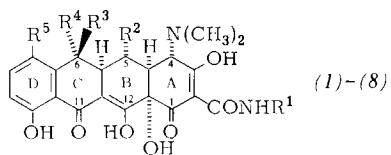


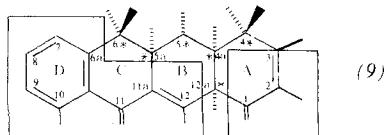
Tabelle 1. Therapeutisch wichtige Tetracycline (1)-(8).

	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵	Chem. Kurzbezeichnung	Abkürz.	Handelsname [a]	Ent- deckerungs- jahr
(1)	H		H	OH	CH ₃	Chlortetracyclin	CTC	Aureomycin	1948
(2)	H		OH	OH	CH ₃	Oxytetracyclin	OTC	Terramycin, Terravenös, Vendarcin, Macocyn	1950
(3)	H		H	OH	CH ₃	H	TC	Achromycin, Hostacyclin, Supramycin, Tetalution, Tetraciro, Tefilin	1953
(4)	H		H	OH	H	Desmethylchlortetracyclin	DMCT	Ledermycin	1957
(5)	CH ₂ -Pyrrolidino		H	OH	CH ₃	Roflitetraacyclin, Pyrrolidinomethyltetraacyclin	PMT	Reverin	1956
(6)	H			OH	CH ₂ =	Methacyclin	MOTC	Rondomycin	1961
(7)	H			OH	H	Doxycyclin	DOOTC	Vibramycin Vibraveneös	1963
(8)	H		H	H	N(CH ₃) ₂	Minocyclin	MITC	Klinomycin	1967

[a] Rote Liste 1974. Ed. Cantor, Aulendorf/Württ., 11187B-11213B.

3. Grundstruktur

Wie der Name andeutet, leiten sich Tetracycline von einem System (9) aus vier linear anellierten sechsgliedrigen Ringen, dem 1,4,4a,5,5a,6,11,12a-Octahydronaphthalen mit charakteristischer Anordnung der Doppelbindungen ab. Man unterscheidet die beiden chromophoren Bereiche A und BCD, die durch das sp³-Kohlenstoffatom 12a getrennt werden. Die Kohlenstoffatome 4,4a,5,5a,6 und 12a sind bei entsprechender



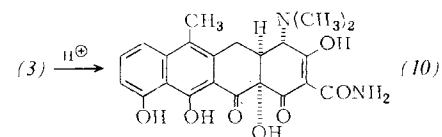
Substitution asymmetrisch. Terramycin (2) besitzt sechs, Aureomycin (1), Tetracyclin (3) und Desmethylchlortetracyclin (4) besitzen je fünf Asymmetriezentren, die das Moleköl optisch aktiv machen. Die absolute Konfiguration wurde durch Röntgen-Strukturanalyse^[10-14] und ergänzende NMR-^[15, 16] sowie CD-Messungen^[17] geklärt.

4. Charakteristische physikalische und chemische Eigenschaften

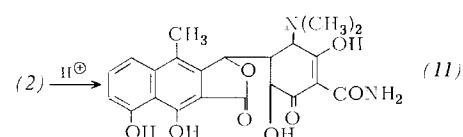
Tetracycline sind gelbe, kristalline, geruchlose, bitterschmeckende, lichtempfindliche Verbindungen. Im physiologischen pH-Bereich sind die natürlichen Vertreter sehr wenig löslich (ca. 1 mg/ml). Aufgrund der sauren Gruppen und des basischen Dimethylamino-Restes verhalten sie sich amphoter. Die gemessenen pK_a-Werte liegen z. B. für Tetracyclin bei 3.30, 7.68 und 9.69, der isoelektrische Punkt bei 4.8^[18]. Die UV-Spektren der Tetracycline sind sehr charakteristisch. Der BCD-Chromophor absorbiert bei 225, 285, 320 und 360 nm, der Ring-A-Chromophor bei 262 nm. Eine Bande bei 275 nm

setzt sich aus mehreren Absorptionen zusammen^[19]. Die Fluoreszenz von Tetracyclinen, die durch Komplexierung mit Kationen verstärkt wird, kann zur qualitativen und quantitativen Bestimmung dieser Stoffe in Arzneimitteln und biologischem Material herangezogen werden (s. Abschnitt 7.1). Eine Zusammenfassung chemischer und physikalischer Bestimmungsmethoden von Tetracyclinen geben Hughes und Wilson^[20].

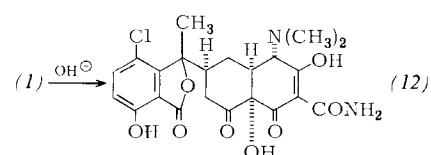
Tetracycline geben unter milden Bedingungen eine Reihe von Abbau- und Umwandlungsreaktionen mit interessanten Unterschieden zwischen den einzelnen Vertretern (Zusammenfassungen siehe^[21-28]).



Tetracycline mit einer Hydroxygruppe an C⁶ spalten bei pH ≤ 2 leicht Wasser ab und bilden unter Aromatisierung von Ring C Anhydrotetraacycline, z. B. (10) aus Tetracyclin (3). Im Falle des Oxytetracyclins (2) isoliert man anstelle der Anhydroverbindung die in einer raschen Folgereaktion entstehenden Epimeren α- und β-Apooxytetracycline (11).



In Gegenwart von Basen isomerisieren die Tetracycline zu iso-Tetracyclinen. Chlortetracyclin (1) ist besonders labil und bildet bereits bei pH = 7.5 in der Wärme iso-Chlortetracyclin (12). Verbindungen ohne Methylgruppe an C⁶ sind gegen Basen stabiler. Epimerisierung an C⁴ tritt leicht bei pH-Werten zwischen 2 und 6 ein. Sie verläuft nach 1. Ordnung, ist reversibel und führt zu einem Gleichgewichtszustand.



bel und wird durch Phosphat, Citrat^[29], mehrwertige Kationen^[30], Neutralstoffe wie z. B. Harnstoff^[31] und Lösungsvermittler^[32] beeinflußt.

Zwischen den aciden Hydroxygruppen in 3-, 10- und 12-Stellung und den benachbarten Carbonylgruppen bestehen starke intramolekulare Wechselwirkungen, die zu einer stark verminderten Reaktivität gegenüber den für diese Gruppen typischen Agentien führen. Die 4-Dimethylamino- und 12a-Hydroxygruppe können reduktiv entfernt werden.

5. Wirkungsspektrum und Anwendung

Die Tetracycline eröffneten eine neue Ära der antibakteriellen Chemotherapie. Sie waren oral und parenteral wirksam, relativ gut verträglich^[33, 34] und besaßen ein breiteres Wirkungsspektrum^[34] als jedes andere damals bekannte Antibiotikum. Sie wurden deshalb neben den Penicillinen die am meisten benutzten Antibiotika.

Entsprechend ihrer chemischen Verwandtschaft weisen alle Tetracycline ein sehr ähnliches Wirkungsspektrum auf. Es umfaßt gram-positive und gram-negative Bakterien und Kokken, Spirochäten, Rickettsien, große Viren und Mykoplasmata, zeigt deutliche Lücken bei Pseudomonaden, Proteus und Salmonellen, wird aber ansonsten in der Wirkungsbreite nur von Chloramphenicol übertroffen. Mykobakterien, Protozoen, Pilze und Hefen sind resistent. Die einzelnen Tetracycline unterscheiden sich weniger in der Wirkungsintensität als in den pharmakokinetischen Eigenschaften wie Resorption, Gewebediffusion und Elimination. Dies gilt auch für die partialsynthetischen Tetracycline. Hauptindikationen sind: Infektion durch *E. coli* und *Haemophilus influenzae*, Gallenwegsinfektionen, bakterielle Erkrankungen der Atmungswege einschließlich Bronchitisprophylaxe, Mischinfektionen, die vom Mund, Rachen oder Intestinaltrakt ausgehen, Brucellose, Tularämie, Pest und andere Pasteurellosen, Leptospirose, Lymphogranuloma inguinale, Cholera, Rickettsiosen. Für die Behandlung von Staphylokokken-, Streptokokken- und Pneumokokken-Infekten gelten Tetracycline heute nicht mehr als Mittel der ersten Wahl^[35].

6. Wege zur Wirkungsverbesserung

Trotz des breiten Wirkungsspektrums sind Tetracycline keineswegs ideale Chemotherapeutika, die jede bakterielle Erkrankung heilen. Im Laufe der Jahre beobachtete man bei ihrer häufigen Anwendung manche Schwächen und Nebenwirkungen. Da die Kliniker immer höhere Anforderungen an die Wirksamkeit und Sicherheit stellten, wurden weltweit Anstrengungen zur Entwicklung neuer Tetracycline mit besseren Eigenschaften unternommen. Dazu wurde die Struktur dieser Moleküle mit chemischen oder enzymatischen Methoden abgewandelt, um die Bedeutung der einzelnen Strukturelemente für die biologische Aktivität zu ergründen. Solche Studien leisteten auch einen wichtigen Beitrag zur Aufklärung der Wirkungsweise. Welche Ziele hatten diese Arbeiten im einzelnen?

1. Verbesserung der Hemmwirkung (MHK-Werte), um auch weniger empfindliche Keime zu erfassen.
2. Überwindung der sekundären Resistenz, die durch die häufige Anwendung der Tetracycline stark zugenommen hat.

3. Ausschaltung oder zumindest Verringerung von Nebenwirkungen.

4. Verbesserung der Resorption und Optimierung der Pharmakokinetik.

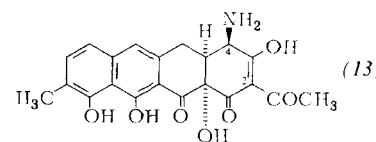
5. Höhere Stabilität und Löslichkeit, um die Applikation und Bioverfügbarkeit („bioavailability“) zu verbessern.

6.1. Mikrobiologische Methoden

Durch Isolierung neuer Stämme, Mutation bekannter *Streptomyces*-Stämme, Variation der Fermentationsmedien, Zusatz von Vorläufern („precursors“) und Inhibitoren erhielt man etwa zwanzig neue Tetracycline, von denen einige medizinisch, andere nur für das Studium der Biogenese oder als synthetische Vorstufen interessant waren^[35–39].

6-Desmethyltetracyclin (4), R⁵ = H und 6-Desmethylchlor-tetracyclin (4) isolierte man aus einer *S.-aureofaciens*-Mutante^[9]. (4) besitzt ausgezeichnete antibakterielle Eigenschaften und hat breite Anwendung als orales Breitbandantibiotikum gefunden. Es ist gegen Säuren und Basen stabiler und erzeugt länger anhaltende Blutspiegel als Tetracyclin, führt aber häufiger zu Photodermatosen^[33, 40].

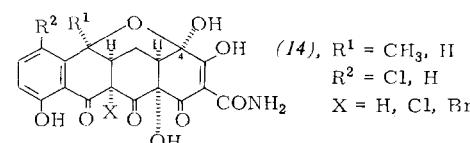
Chelocardin (13)^[41, 42], ein Breitbandantibiotikum aus einem *Nocardia-sulphurea*-Stamm, wurde bereits 1956 isoliert und 1970 strukturell aufgeklärt^[43]. Sein antimikrobielles Spektrum ähnelt dem von Chloramphenicol. Chelocardin ist in



vivo gut wirksam, erzeugt aber bei Tieren Leberschäden und wurde deshalb nicht weiterentwickelt. Auffallend sind die primäre 4-Aminogruppe in β-Konfiguration (natürliche Tetracycline: α-konfigurierte Dimethylaminogruppe) und der aromatische Ring C.

6.2. Partialsynthesen

Der meistbegangene Weg zu neuen Tetracyclinen war die chemische Abwandlung der fermentativ einfach zugänglichen Vertreter, nämlich Tetracyclin (3), Oxytetracyclin (2), 6-Desmethyltetracyclin (4), R⁵ = H und 6-Desmethylchlortetracyclin (4). Die Hydrogenolyse der benzylischen Hydroxygruppe an C⁶ in den beiden letztgenannten Tetracyclinen führte in die Reihe der säurestabilen 6-Desoxytetracycline^[44–46], an denen elektrophile Substitutionen in 7- und 9-Stellung gelangen^[25, 23]. An der exocyclischen Doppelbindung der 6-Methylen-tetracycline vom Typ des Methacyclins (6) ließen sich Additionsreaktionen durchführen^[47]. Die Tetracycloxide vom Typ (14) waren ein günstiges Ausgangsmaterial zur Abwandlung der 4-Stellung des Ringes A^[48, 49]. Durch Mannich-Reaktion



tion konnten zahlreiche, im physiologischen pH-Bereich leicht wasserlösliche Derivate erhalten werden^[50, 51].

Im folgenden werden partialsynthetische Produkte besprochen, die aufgrund hervorragender antibiotischer Eigenschaften weltweite Anwendung gefunden haben.

Pyrrolidinomethyltetracyclin (5) (Reverin) war das erste partialsynthetische Tetracyclin. Es entsteht durch Mannich-Reaktion aus Tetracyclin (3), Formaldehyd und Pyrrolidin^[50–52]. In seinem Wirkungsspektrum stimmt es mit Tetracyclin weitgehend überein^[53]. Der große Vorteil gegenüber diesem liegt in der enorm hohen Wasserlöslichkeit im physiologischen pH-Bereich. Reverin ist eine ideale parenterale Applikationsform des Tetracyclins, besonders bei akut lebensbedrohlichen Infektionen, die einen raschen Wirkungseintritt verlangen^[54–57]. Während es in fester Form völlig stabil ist, zerfällt Reverin in wässrigen Lösungen langsam bis zu einem Gleichgewicht^[58] unter Rückbildung von Tetracyclin^[59–61].

Methacyclin (6) und Doxycyclin (7) sind Weiterentwicklungen von Terramycin (2). Methacyclin (6) wird aus 11a-Chlor-5-hydroxytetracyclin unter Dehydratisierung mit Fluorwasserstoff und anschließender Enthalogenierung durch milde Reduktionsmittel erhalten^[62]. Doxycyclin (7) entsteht durch radikalische Addition von Thiolen an die 6-Methylen-Doppelbindung von Methacyclin (6) und anschließende Entschwefelung mit Raney-Nickel^[47].

Methacyclin (6) ist dem Desmethylchlortetracyclin (4) bakteriostatisch und pharmakokinetisch weitgehend ähnlich^[63, 64]. Doxycyclin (7) hat ein tetracyclin-spezifisches Wirkungsspektrum; bei schwach tetracyclin-empfindlichen Staphylokokken- und Streptokokkenstämme und vereinzelt bei *Enterobacteriaceae* ist es wirksamer als die älteren Tetracycline^[64, 65]. Es ist lipophil und besitzt eine hohe Resorptionsquote, Resorptionsgeschwindigkeit und Gewebeaffinität. Die Elimination ist durch höhere Serumbindung verlangsamt. Die Halbwertszeit im Blut liegt in der Größenordnung von 15–20 Stunden^[63, 66–68]. Im allgemeinen genügt für Erwachsene eine einzige Dosis von 200 mg am ersten Tag und 100 mg an den folgenden Tagen.

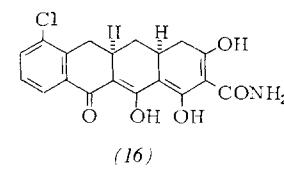
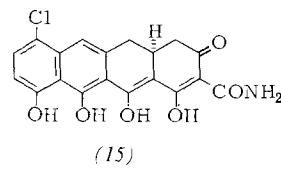
Minocyclin (8) ist das neueste Antibiotikum der Tetracyclingeruppe. Es wird durch reduktive Methylierung der Nitroverbindung (8), R⁵ = NO₂ erhalten^[69]. Im Wirkungsspektrum von Minocyclin fällt die größere Wirksamkeit gegen eine Reihe gram-positiver Staphylokokkenstämme auf, die gegen andere Tetracycline schon resistent sind^[70, 71]. Die wichtigsten Vorteile sind ähnlich wie beim Doxycyclin pharmakokinetischer Natur^[71, 72]. Die Halbwertszeit im Blut liegt mit über 20 Stunden deutlich über der anderer Tetracycline. Die Tagesdosen für Erwachsene betragen 200 mg.

6.3. Totalsynthesen

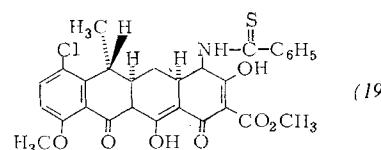
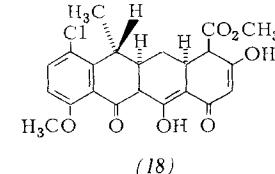
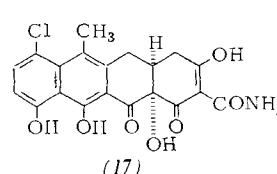
Bald nach der Strukturaufklärung der ersten Tetracycline suchte man nach Möglichkeiten zu ihrer Totalsynthese. Wegen der komplizierten Stereochemie und Substitution bezeichnete Woodward^[73] diese Moleküle einmal als „eine teuflische Verkettung von Atomen“. Die vielen Substituenten der Tetracycline, die sie gegenüber sauren, alkalischen und reduzierenden Agentien sehr reaktionsfähig machen, erschweren den stereospezifischen Aufbau dieses Molekültyps, für den es keinerlei synthetische Vorgänger gab.

6.3.1. Tetracyclinvorstufen

Erstes Ziel der Totalsynthese war der Aufbau einfacher substituierter Tetracycline, wie sie teilweise auch durch Abbaureaktionen natürlich vorkommender Tetracycline erhalten wurden.

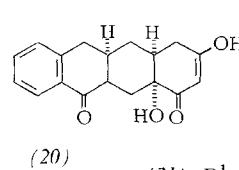


Fields, Kende, Boothe et al.^[74–77] gelang 1959–1961 die Synthese von (15) und (16).



Etwa zur gleichen Zeit synthetisierte die Arbeitsgruppe um Muxfeldt^[22, 78–80] die Vorstufen (17)–(19).

Ein großes Team von Chemikern um Shemyakin beschäftigte sich rund ein Jahrzehnt mit der Totalsynthese von Tetracyclinen. Aus diesen Arbeiten sollen die Verbindungen (20)–(24) erwähnt werden^[81–85].

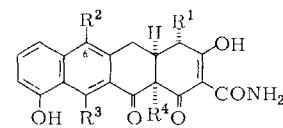


(21), R¹ = R² = R³ = R⁴ = H

(22), R¹ = R³ = R⁴ = H, R² = CH₃

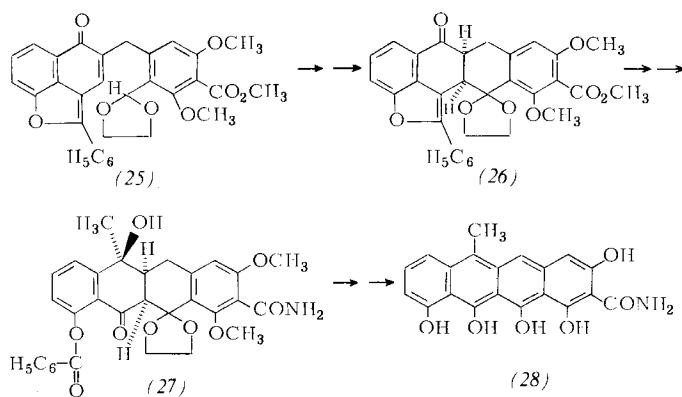
(23), R¹ = N(CH₃)₂, R² = CH₃, R³ = OH, R⁴ = H

(24), R¹ = H, R² = CH₃, R³ = R⁴ = OH



Die Verbindungen (20), (21) und (22) besitzen ein unvollständiges Keto-Enolsystem; es fehlt überdies die für die antibiotische Wirksamkeit wichtige 4-Dimethylaminogruppe. (23) lässt sich in 12a-Stellung hydroxylieren. Da man Anhydro-tetracycline durch Photooxidation an C⁶ und anschließende Reduktion des Hydroperoxids in Tetracycline überführen kann^[86, 87], sah Shemyakin in der Synthese von (23) formal eine Totalsynthese von DL-Tetracyclin. Allerdings ist die Photooxidation nur an Chlortetracyclinen durchgeführt worden und soll nach Muxfeldt^[88] auch nur in diesem Fall gelingen.

Barton und sein Arbeitskreis begannen 1957 mit den totalsynthetischen Arbeiten^[89]. Die Strategie bestand darin, ein Vierringsystem aufzubauen, in welchem die Ringe A und D aromatisch sind und Ring A später partiell zu hydrieren. Nach sehr vielen vergeblichen Versuchen fand man im relativ leicht zugänglichen Acetal (25) eine Vorstufe, die durch protonen-katalysierte Photocyclisierung in den Tetracyclus (26)

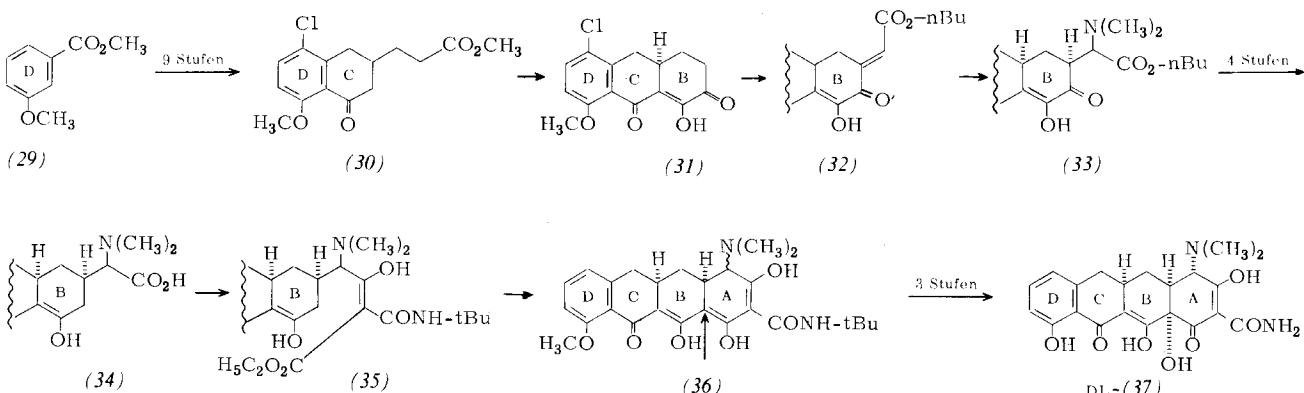


übergeht. Der stereospezifische Verlauf der Reaktion wurde durch Röntgen-Strukturanalyse bewiesen.

In mehrstufiger Reaktionsfolge (Esterspaltung und Amidierung (82 %), Methylierung mit CH_3Li (54 %) an C^6 , Ozonisierung und Reduktion des Ozonids (30 %)) erhält man (27), das bis auf Ring A die Strukturelemente des Tetracyclins enthält (Gesamtausbeute bezogen auf 1,5-Naphthalindiol ca. 0.4 %). Durch Abspaltung der Schutzgruppen gelangt man von (27) zum vollaromatischen 6-Methylprätetramid (28), dem ersten isolierbaren Zwischenprodukt der Tetracyclinbiosynthese.

6.3.2. Totalsynthese von DL-6-Desmethyl-6-desoxytetracyclin nach Woodward/Pfizer

Woodward und einer Arbeitsgruppe der Firma Chas. Pfizer and Co. gelang 1962 nach einem Jahrzehnt intensiver Versuche die Totalsynthese des einfachsten, biologisch wirksamen DL-6-Desmethyl-6-desoxytetracyclins (37)^[90, 91]. Einzelheiten der Synthese wurden erst 1968 publiziert^[92]. Muxfeldt und Rogalski^[93] konnten die Verbindung 1965 auf einfacherem Weg erhalten.



Die Woodward/Pfizer-Synthese beginnt mit dem aromatischen Ring D und baut die Ringe C, B und A schrittweise durch Kondensationsreaktionen auf.

m-Methoxy-benzoësäureester (29) wird in neun Stufen (meist Claisen-Kondensationen) in das Tetralon (30) überführt, das mit Oxalsäureester/Natriumhydrid zum Tricyclus (31) kondensiert. Der stufenweise Aufbau des letzten Rings A war das schwierigste Problem, da sämtliche Ringglieder substituiert und C^4 , C^{4a} und C^{12a} asymmetrisch sind. Man kondensiert (31) mit Glyoxylsäure-n-butylester zu (32) und addiert Dimethylamin stereospezifisch an die exocyclische Doppelbindung zu (33). Die raumerfüllende Seitenkette

nimmt dabei die äquatoriale, der Wasserstoff die axiale Lage ein. Aus (33) erhält man durch Reduktion der Ketogruppe im Ring B und Esterverseifung die Säure (34), die nach reduktiver Enthalogenierung in ein gemischtes Anhydrid überführt wird, das mit Äthyl-*N*-tert.-butyl-malonamat zu (35) reagiert. Mit Natriumhydrid als Kondensationsmittel schließt sich der Ring zum Tetracyclus (36).

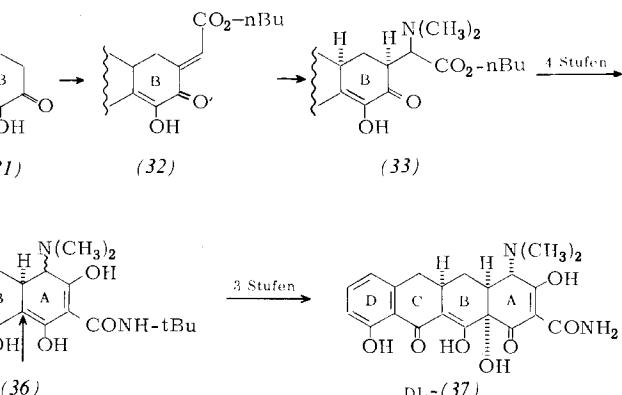
Die stereospezifische Einführung der Hydroxygruppe an C^{12a} (siehe Pfeil) durch Autoxidation, die Umkehr der 4-Dimethylaminogruppe von der β - in die natürliche α -Konfiguration über Ca-Komplexe und die Abspaltung der Schutzgruppen waren schwierige und verlustreiche Stufen, die chromatographische Trennungen und eine Craig-Verteilung erforderlich machten.

DL-6-Desmethyl-6-desoxytetracyclin (37) konnte nur in mg-Mengen erhalten werden. Die Gesamtausbeute der über 22 Stufen verlaufenden Synthese betrug ca. 10⁻³ %, d. h. aus einem Kilogramm Ausgangsmaterial (29) erhielt man ca. 10 mg Endprodukt (37). Die biologische Prüfung ergab, daß das synthetische Tetracyclin (37) nur 50 % der Aktivität des aus natürlichem Material gewonnenen, optisch aktiven 6-Desmethyl-6-desoxytetracyclins besaß. Offenbar ist nur der Antipode mit natürlicher Konfiguration der Asymmetriezentren wirksam.

6.3.3. Totalsynthese von DL-6-Desmethyl-6-desoxychlortetracyclin nach Muxfeldt

Nach langjährigen, intensiven Vorarbeiten entwickelten Muxfeldt und seine Schule eine überaus elegante Methode, mit der man sowohl natürliche Tetracycline, z. B. das komplizierte Terramycin mit sechs Asymmetriezentren, als auch neuartige Tetracycline herstellen kann.

Das Prinzip dieser Synthese soll am Beispiel von DL-6-Desmethyl-6-desoxychlortetracyclin (45) demonstriert wer-

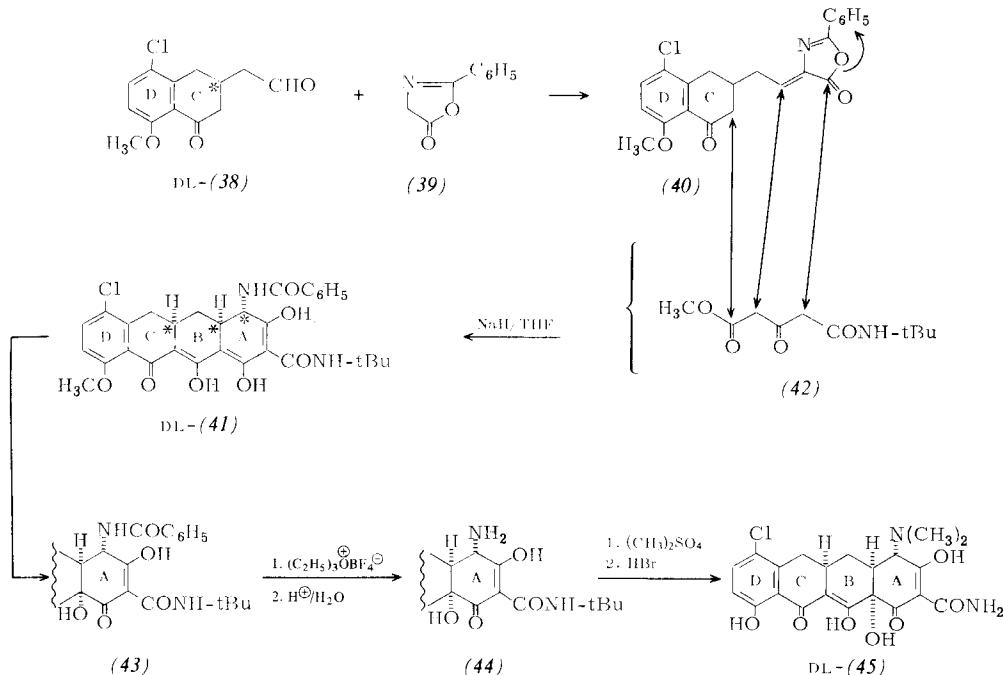


den^[93, 94], das aus den relativ einfachen, getrennt dargestellten Teilstücken (38), (39) und (42) aufgebaut wird. (38) und (39) kondensieren zur Zwischenstufe (40), die mit dem Glutaramat (42) unter doppeltem Ringschluß den Tetracyclus (41) ergibt. Diese elegante Kondensationsreaktion, bei der in einem Schritt drei neue CC-Bindungen geknüpft werden (durch Pfeile angedeutet), ist das Herzstück der Synthese. Die Verknüpfung verläuft stereounspezifisch, d. h. es entstehen in unterschiedlichen Mengen die acht möglichen Stereoisomeren, deren Anzahl durch Epimerisierung der 4-Benzoylaminogruppe in Pyridin auf vier (=zwei Antipodenpaare) verringert wird^[95]. Nach der Umlagerung besitzen die Wasserstoffatome an C^4 und

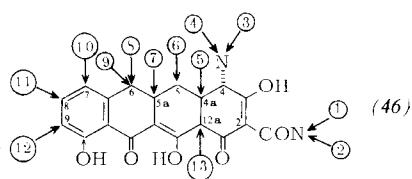
C^{4a} in allen vier Isomeren *trans*-Konfiguration. Das gewünschte Antipodenpaar (41) wird durch fraktionierende Kristallisation oder Chromatographie abgetrennt. Die Einführung der 12a-Hydroxygruppe zu (43) gelingt glatt durch Autoxidation in DMF in Gegenwart von Natriumhydrid. Nach Debenzoylierung, Methylierung der Aminogruppe und Abspaltung der Schutzgruppen mit Bromwasserstoff erhält man (45) in Form des Hydrobromids.

tracycline der Normal-, 5a-*epi*- und 6-*epi*-Reihe. Ausgehend von den Aldehyden (38) und (47) wurden die Di-N-desmethyltetracycline (49), (50), (52) und (53) und durch Alkylierung die Derivate (45), (51) und (54) erhalten. Während Tetracycline leicht epimerisieren, sind diese vier Nortetracycline mit natürlicher α -Konfiguration der 4-Aminogruppe stabil.

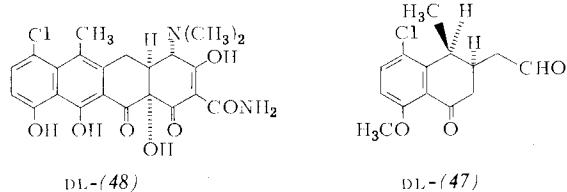
Durch Umsetzung des *N*-methylierten Bausteins (55) mit dem Aldehyd (38) und dem Azlacton (39) gelang die Synthese



Diese Synthese kann durch Verwendung verschieden substituierter Bausteine sehr variabel gestaltet werden. Im Prinzip lassen sich alle Stellen des Moleküls, die in der allgemeinen Formel (46) durch Pfeile gekennzeichnet sind, abwandeln,



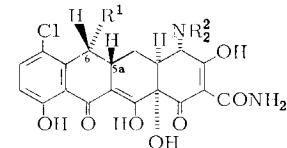
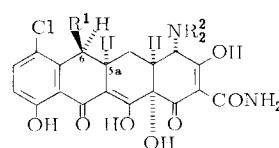
so daß es möglich ist, „maßgeschneiderte“ Tetracycline aufzubauen. Beispiele sind Terramycin (2), das am höchsten substituierte und chemisch reaktivste Mitglied der Tetracyclinfamilie, das *Muxfeldt* et al.^[96] 1968 in racemischer Form synthetisierten, sowie **DL-Anhydroaureomycin** (48)^[97]. Da dieses



durch Photooxidation und anschließende Reduktion wieder Aureomycin ergibt^[86, 87], kann die Synthese von (48) auch als Totalsynthese von **DL-Aureomycin** angesehen werden.

Zur weiteren Klärung von Struktur-Wirkungs-Beziehungen synthetisierte eine Arbeitsgruppe der Hoechst AG^[98] neue Te-

eines Tetracyclins (56), das an der 2-Carboxamidgruppe methyliert ist^[99]. Tetracycline mit verengtem Ring B, z. B. (59), erhält man durch Verwendung des Aldehyds (57), dem in der Seitenkette ein Kohlenstoff fehlt^[100].



DL-(50), R¹ = CH₃, R² = H

DL-(53), R¹ = R² = H

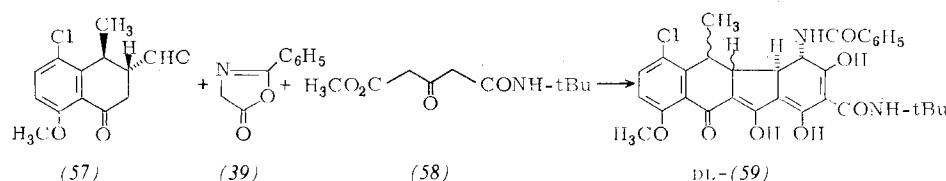
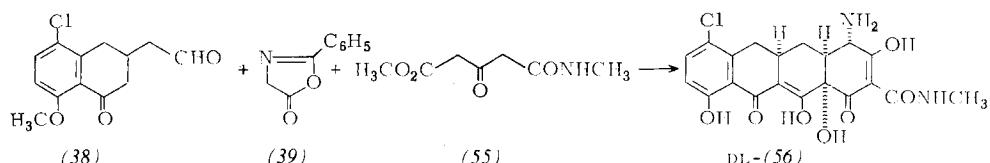
DL-(45), R¹ = H, R² = CH₃

DL-(54), R¹ = H, R² = C₂H₅

DL-(51), R¹ = R² = C₂H₅

Die synthetischen Tetracycline (45), (49) bis (54) und (56) sind wesentlich lipophiler als natürliche Vertreter. Sie zeigten im Reihenverdünnungstest mit Ausnahme von (54) das gleiche Wirkungsspektrum wie Tetracyclin und darüber hinaus eine hohe Wirksamkeit gegenüber einigen hochresistenten Bakterienstämmen. Die Wirksamkeit ging bei Serumzusatz (*in vitro*) zurück und war im Tierversuch enttäuschend^[101]. Die Ursache dafür scheint eine starke, unspezifische Bindung dieser Stoffe an Serumproteine und Gewebebestandteile zu sein, so daß die Konzentration an freiem, chemotherapeutisch wirksamem Tetracyclin für eine Bakteriostase im Organismus nicht ausreicht.

Muxfeldt et al. gaben bei ihren Totalsynthesen die Gesamt-ausbeuten nicht vollständig an. In den an Hoechst^[98–100]



untersuchten Reihen liegen sie in der Größenordnung von 0.05–0.10 % und damit um etwa zwei Größenordnungen besser als bei der Woodward/Pfizer-Synthese. Aus einem Kilogramm Ausgangsmaterial erhält man etwa 1 g Endprodukt. Es gelingt, Tetracyclen in 10- bis 100-g-Mengen im Laboratorium herzustellen. Besonders vorteilhaft bei der Synthese nach *Muxfeldt* ist die leichte Reinigung der Zwischenstufen und die Trennung der Isomeren, die häufig durch fraktionierende Kristallisation gelingt.

7. Komplexbildung

Tetracycline zeigen eine große Tendenz zur Bildung reversibler Komplexe mit Kationen und Anionen sowie niedermolekularen Stoffen^[17, 19, 23, 102 – 113]. Diese Eigenschaft ist für das Verständnis ihrer antibiotischen Wirksamkeit, Pharmakokinetik und Nebenwirkungen von Bedeutung. Tabelle 2 zeigt eine Auswahl von Komplexbildnern.

Tabelle 2. Komplexbildner für Tetracycline.

Metall-Kationen:	Fe^{3+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Be^{2+} , Al^{3+} , Zr^{4+} , $^{99}\text{Tc}^{4+}$
Anionen:	Phosphat, Citrat, Salicylat, <i>p</i> -Hydroxybenzoat, Saccharin-Anion
Neutralstoffe:	Coffein, Harnstoff, Thioharnstoff, Polyvinylpyrrolidon
Biopolymere:	Serumalbumin, Lipoproteine, Globuline, RNA

7.1. Metall-Kationen

Die Komplexbildung hängt von der Natur und Ladung des Kations und dem pH-Wert der Lösung ab. Unterhalb von $\text{pH}=3$ komplexieren Tetracycline nicht. Im pH-Bereich zwischen 3 und 7.5 bindet das Phenol-Diketon-System der Ringe BCD ein Kation. Wird die 4-Dimethylaminogruppe bei steigendem pH-Wert deprotoniert, so kann ein weiteres Kation von dieser Gruppe und der dazu *cis*-ständigen 12a-Hydroxygruppe gemeinsam gebunden werden. 4-*epi*-Tetracycline, deren 4- und 12a-Substituenten *trans*-ständig sind, bilden nur 1:1-Komplexe, ebenso die biologisch inaktiven iso-Tetracycline wie (12). Oxytetracycline besitzen in 5-Stellung einen zusätzlichen Liganden zur Komplexbindung. Mg^{2+} -Ionen bilden oberhalb $\text{pH}=7$ ein Chelat zwischen der 5- und 12a-Hydroxygruppe. Die Rückepimerisierung von 4-*epi*-Tetracyclinen nach *Noseworthy*^[112] verläuft in alkalischer Lösung über Ca-Komplexe.

Die meisten Metallkomplexe fluoreszieren stärker als die Tetracycline selbst. Diesen Effekt nutzt man zur analytischen

Bestimmung dieser Antibiotika in Arzneimitteln und biologischem Material aus^[20, 113]. Mit Be-Komplexen in einem Ammoniumpuffer ($\text{pH}=7$) lassen sich noch 10^{-9} g Tetracyclin erfassen^[114]. Caswell et al.^[115, 116] zeigten, daß die Fluoreszenz von Ca^{2+} - und Mg^{2+} -Chlortetracyclin eine Funktion der Polarität des umgebenden Milieus ist und zum Nachweis dieser Ionen in Zellmembranen benutzt werden kann. Eine komplexometrische Tetracyclinbestimmung mit Nickel-Ionen beschreiben Stahlavská et al.^[117].

Die gleichzeitige Gabe von Tetracyclinen und Nahrungs- oder Arzneimitteln, die Metallverbindungen enthalten, kann zu Störungen führen^[33]. So wird der Serumspiegel bei gleichzeitiger Verabreichung von Tetracyclinen und Eisen(II)-sulfat um 50–90 % herabgesetzt^[118, 119]. Milch, die reich an Ca- und Mg-Ionen ist, verringert den Serumspiegel von Tetracyclin, Methacyclin und Oxytetracyclin^[120]. Eine Verminderung der Eigenbakterizidie des Serums durch Tetracycline, besonders Doxycyclin, führt man auf eine Komplexbildung von Magnesium- und Calcium-Ionen im Blut zurück^[121].

Lange bekannt ist die Einlagerung von Tetracyclinen als Calciumphosphat-Komplexe in Gewebe, die reich an Ca^{2+} -Ionen sind, z.B. die wachsenden Knochen und die Zahnanlage des ungeborenen Kindes sowie auch noch in der Phase des schnellen Knochenwachstums und der ersten Dentition. Knochen und Zähne können dadurch geschädigt werden^[33]. Bei Kindern bis zu acht Jahren und bei Schwangeren wird deshalb die Gabe dieser Antibiotika nicht mehr empfohlen.

7.2. Anionen und Neutralstoffe

Anionen wie Phosphat, Citrat, Salicylat, *p*-Hydroxybenzoat und das Saccharin-Anion sowie Naturstoffe vom Typ des Coffeins, *N*-Methylpyrrolidons, Harnstoffs und Thioharnstoffs bilden schwache Komplexe mit Tetracyclinen und erhöhen dessen Löslichkeit^[122].

Polyvinylpyrrolidon^[123], das auch als Plasmaexpander angewendet wird, dient in Zubereitungen von Oxytetracyclin (Vendarcin)^[124] und Doxycyclin (Vibravenös)^[125] als Lösungsmittel. Es erhöht die Stabilität der Lösungen und soll die Gewebeverträglichkeit der Präparate bei parenteraler Applikation verbessern.

7.3. Biopolymere

Die reversible Bindung der Tetracycline an makromolekulare Strukturen im Blut und Gewebe ist von Bedeutung für die Pharmakokinetik und die Wirksamkeit dieser Stoffe im

Körper. Gleichgewichte dieser Art sind mit Ausnahme der Plasmaproteinbindung, für die man mehrere Bestimmungsmethoden (Dialyse, Ultrafiltration, Ultrazentrifugation, Sephadexgelfiltration, Elektrophorese) ausgearbeitet hat, schwer quantitativ zu erfassen^[126].

Tetracycline binden sowohl an Albumin, das Hauptprotein des Serums, als auch an Globuline und Lipoproteine^[127–131]. Die Proteinbindung ist reversibel, pH- und temperaturabhängig und eine Funktion der Serumkonzentration^[128, 129, 132, 133]. Die Serumproteine von Mensch und Tier unterscheiden sich in ihrer Affinität für bestimmte Tetracycline^[127].

Die Serumbindung ist hydrophober Natur, d.h. sie wird durch unpolare lipophile Gruppen, z.B. Alkylgruppen und Halogenatome, verstärkt und durch polare Gruppen, z.B. Hydroxy- oder Aminogruppen, geschwächt^[128, 129, 134]. Sie nimmt mit steigender Ca^{2+} - und Mg^{2+} -Konzentration zu, ist aber von der Natur des Tetracyclin-Derivates abhängig. Die größte prozentuale Zunahme der Komplexierung wurde bei Doxycyclin, die kleinste bei Oxytetracyclin gefunden; dazwischen liegen Methacyclin und Minocyclin^[132].

Die reversible Bindung von Tetracyclinen an Ribonucleinsäure folgt den beim Serumalbumin gefundenen Gesetzmäßigkeiten und ist auch hinsichtlich der Bindungsstärke vergleichbar^[129].

Der Einfluß der Serumbindung auf die chemotherapeutische Wirksamkeit von Antibiotika ist noch unklar^[135–140]. Pauschale Angaben über Blutspiegelhöhe und Serumbindung besagen wenig über die Heilwirkung eines Präparates. Nach heutiger Lehrmeinung übt nur das ungebundene Antibiotikum in der unmittelbaren Umgebung des Bakteriums im infizierten Bereich eine antibakterielle Wirkung aus. Je höher die Konzentration an freiem Wirkstoff dort ist, desto größer ist auch die Bakteriostase.

8. Struktur-Wirkungs-Beziehungen

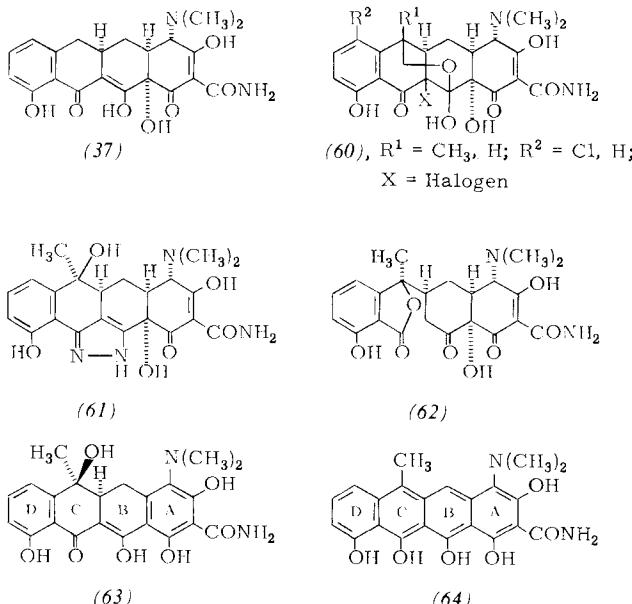
Nach der Synthese eines Tetracyclins wird seine biologische Wirksamkeit untersucht. Als erstes prüft man die antibakterielle in-vitro-Wirksamkeit eines neuen Präparates mit Hilfe des Reihenverdünnungstests, Plattendiffusionstests, Strichtests oder turbidimetrischen Tests^[141]. Die minimalen Hemmkonzentrationen (MHK in $\mu\text{g}/\text{ml}$), die man durch solche Tests gewinnt, sind allein noch keine Grundlage für eine kritische Bewertung^[142]. Ihr Aussagewert ist vorwiegend ausschließend, d.h. es läßt sich rasch entscheiden, welche Strukturveränderungen des Moleküls zu einem teilweisen oder völligen Wirkungsverlust führen.

Findet man Verbindungen mit günstigen MHK-Werten, die sich mit denjenigen einer Standardsubstanz (z.B. Tetracyclin) vergleichen lassen oder die besser sind, dann muß man die Wirksamkeit dieser Verbindungen auf ein repräsentatives Kollektiv klinisch relevanter Erreger unter standardisierten Bedingungen (z.B. genormte Einsaat der Keime, einheitliches Nährmedium) prüfen. Quantitative Aktivitätsangaben aus verschiedenen Laboratorien sind wegen der starken Abhängigkeit von Versuchparametern nur bedingt vergleichbar. In den folgenden Ausführungen über Struktur-Wirkungs-Beziehungen werden deshalb die Werte nur qualitativ verglichen (ausführliche Zusammenstellung von MHK-Werten siehe^[26, 27, 143–148]).

In-vitro-Werte reichen zur Bewertung von Tetracyclinen nicht aus, da diese in therapeutischen Konzentrationen nur bakteriostatisch wirken und ein Heileffekt erst aus dem Zusammenwirken von Bakteriostase und zellulären sowie humoralen Abwehrmechanismen des Körpers resultiert. Zur Gesamtbeurteilung gehören neben Angaben zur bakteriologischen Resistenz pharmakologische Parameter über Resorption, Blut- und Gewebespiegel, Diffusionsfähigkeit, Serumbindung, Elimination, Metabolismus, Nebenwirkungen und Toxizität. Die Erarbeitung dieser Daten erfordert sehr aufwendige Tierexperimente und Messungen an isolierten Organen, die verständlicherweise nur mit wenigen, hochwirksamen Vertretern ausgeführt wurden. Das endgültige Urteil über den Wert eines Antibiotikums kann nur der Arzt nach einer langen, sorgfältigen und vorurteilsfreien Prüfung an Patienten fällen.

8.1. Grundlegende strukturelle Voraussetzungen für die Wirksamkeit

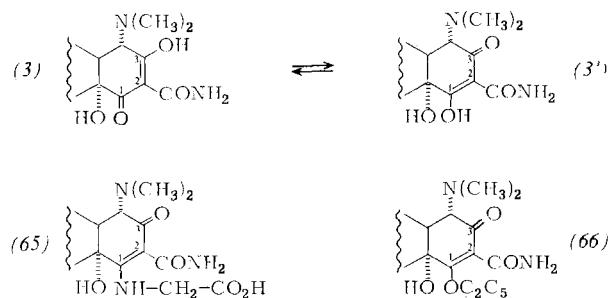
Das strukturell einfachste Tetracyclin mit voller biologischer Wirksamkeit ist das partialsynthetische 6-Desmethyl-6-desoxytetracyclin (37)^[149]. Die lineare Anordnung der vier Ringe und die beiden chromophoren Keto-Enol-Systeme im Ring A und in den Ringen BCD sind eine wesentliche Voraussetzung für antibiotische Wirksamkeit. Alle partial- und totalsynthetischen Derivate mit weniger als vier Ringen sind wirkungslos. 12a-Desoxotetracyclin^[150] und 11a-Halogen-tetracycline (60)^[151] mit verlängertem oder verkürztem Chromophor besitzen verminderte Wirksamkeit, Pyrazoltetracyclin (61)^[152] ist unwirksam.



Die Aufspaltung eines Ringes zum iso-Tetracyclin (62)^[144], die Aromatisierung zusätzlicher Ringe, z.B. zum 5a,6-Anhydrotetracyclin (10)^[153], 4a,12a-Anhydrotetracyclin (63)^[154] und 4-Dimethylamino-6-methyl-1,3,10,11,12-pentahydroxynaphthalen-2-carbonsäureamid (64)^[155] führen zu einem starken Wirkungsabfall in vitro und zum völligen Wirkungsverlust in vivo.

8.2. Abwandlungen in 1,3-Stellung

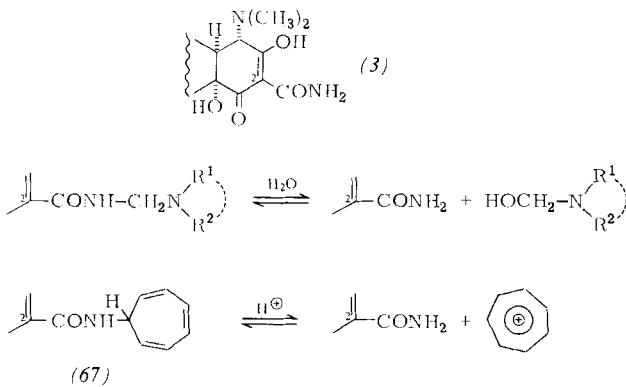
Das Keto-Enol-System zwischen den Kohlenstoffatomen 1 und 3 [Formel (3) und (3')] ist stark delokalisiert und extrem reaktionsträge. Eine Alkylierung zu (66) gelingt mit Triäthyloxoniumtetrafluoroborat unter Basenkatalyse^[156].



Durch diese Verätherung geht die Wirkung verloren. Der Austausch der 1-Äthoxygruppe gegen den Glycinrest führt zu Verbindung (65), die mäßige Bakteriostase zeigt. Gegenüber Rickettsien vom Typ *Aegyptianella pullorum* ist sie aber ebenso wirksam wie Chlortetracyclin (1)^[157].

8.3. Abwandlungen in 2-Stellung

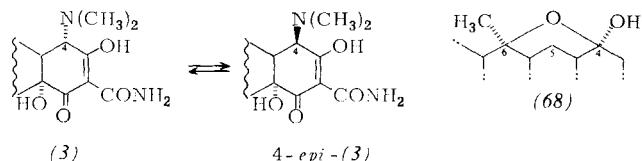
Der Ersatz der 2-Carboxamidgruppe durch eine Aldehyd-^[158], Aldimin-^[159] oder Acetylgruppe^[160] führt zu Lücken im Wirkungsspektrum. Tetracyclinnitrile^[161] sind wirkungslos. Der Austausch eines Amidwasserstoffs gegen eine Methylgruppe beeinflusst die in-vitro-Wirkung nicht^[99]; größere Reste, z. B. tert.-Butyl^[47] und Cycloheptyl^[162], wirken sich nachteilig aus.



Die Aminoalkylierung der Amidgruppe nach Mannich^[50, 51] führt zu Präparaten wie (5), die im physiologischen Bereich gut wasserlöslich sind, langsam hydrolysieren und praktisch die gleichen Wirkungsspektren wie die zugrundeliegenden Tetracycline besitzen. *N*-Cycloheptatrienyltetracycline (67)^[163] verhalten sich ähnlich wie Tetracyclin-Mannichbasen.

8.4. Abwandlungen in 4-Stellung

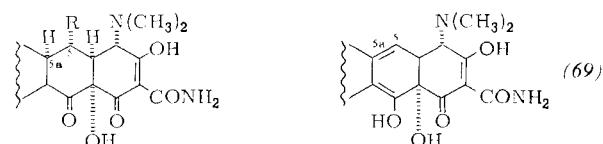
Die α -Konfiguration der 4-Dimethylaminogruppe ist wesentlich für hohe antibiotische Wirksamkeit. 4-*epi*-Tetracycline hemmen in vitro schwach, in vivo nicht mehr^[144]. Ersetzt man die α -Dimethylaminogruppe durch eine primäre Aminogruppe, so ändert sich die in-vitro-Wirksamkeit nicht^[98, 99],



eine Methylamino-^[100] und Diäthylaminogruppe^[98] führen zum Wirkungsabfall. Entfernung der Aminofunktion^[164] oder Aufhebung ihres basischen Charakters durch Quaternierung^[164], Acylierung^[100], Umwandlung in ein Oxim, Hydrazon^[49] oder Tetracycloxid (68)^[48] vermindert die Aktivität oder hebt sie auf.

8.5. Abwandlungen in 5- und 5a-Stellung

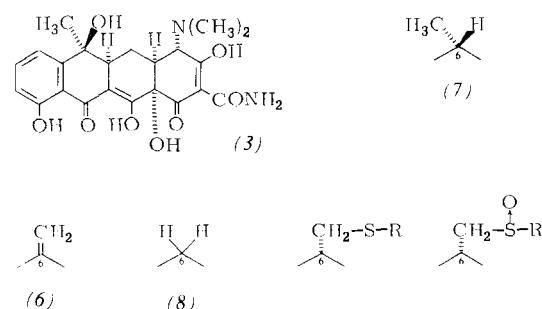
Die 5- und 5a-Stellung scheinen für die Tetracyclinaktivität nicht sehr kritisch zu sein. Eine 5-Hydroxygruppe wie im Terramycin beeinflußt die Stärke der bakteriostatischen Wirkung nicht^[26], sondern nur Stabilität, Resorption und Pharmakokinetik. Die Acylierung der 5-Hydroxygruppe bringt keine



Vorteile. Von 5,5a-Didehydrotetracyclinen (69) wurden wirksame und unwirksame Vertreter beschrieben. Nach Martell et al.^[116,5] soll 5,5a-Didehydrotetracyclin inaktiv, 5,5a-Didehydro-6-*epi*-aureomycin in vitro und in vivo hochwirksam sein. Alle totalsynthetischen 5a-*epi*-Tetracycline^[98] zeigten in vitro hohe Aktivität, enttäuschten aber im Tierversuch^[101].

8.6. Abwandlungen in 6-Stellung

Den größten Erfolg bei der Entwicklung neuer hochwirksamer Tetracycline brachte die Veränderung der 6-Stellung^[144]. Weder die 6-Methyl- noch die Hydroxygruppe sind für antibakterielle Wirksamkeit wesentlich. Die Elimination der 6-Hydroxygruppe führte zu lipophileren, säurestabilen Tetracyclinen wie Doxycyclin (7) und Methacyclin (6), die beide aus Terramycin hergestellt werden. 6-*epi*-Doxycyclin mit β-ständiger Methylgruppe an C⁶ ist weniger wirksam^[166]. Unter den



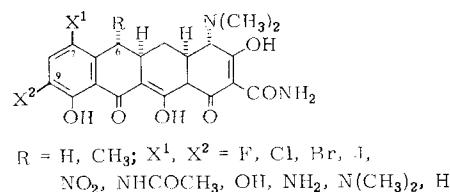
6-Desmethyltetracyclinen ist 6-Desmethylchlortetracyclin (4) das wirksamste Antibiotikum, dessen Hydrierung zum etwas weniger wirksamen 6-Desoxy-6-desmethyltetracyclin (37)^{44}, dem Ausgangsmaterial von Minocyclin (8), führt. Größere lipophile Reste (Phenyl, Benzyl) in 6-Stellung, die man durch radikalische Addition von Thiolen an die 6-Methylengruppe

erhält^[162], vermindern die bakteriostatische Wirksamkeit, die bei Oxidation des Thioäthers zum Sulfoxid wieder ansteigt^[144].

8.7. Abwandlungen in 7- und 9-Stellung

Durch elektrophile Substitution der säurestabilen 6-Desoxytetracycline in 7- und/oder 9-Stellung lassen sich zahlreiche mono- und disubstituierte Derivate gewinnen^[25, 144].

Auffallend ist, daß sowohl Substituenten, die starke Elektronendonoren sind, als auch solche mit starker Acceptorwirkung die Wirksamkeit der Tetracycline steigern. Substitution in 7-Stellung ist günstiger als in 9-Stellung. Eine Nitro- oder Dimethylaminogruppe in 7-Stellung verbessert die Wirkung am stärksten. So trägt Minocyclin in 7-Stellung eine Dimethylaminogruppe und ist gegen tetracyclin-empfindliche Stämme zwei- bis achtmal wirksamer als Tetracyclin^[25, 144].



Cammarata und Yau^[167] versuchten die Hemmwirkung einiger 7- und 9-substituierter Tetracycline mit physikochemischen Parametern zu korrelieren. Für 7-substituierte 6-Desoxytetracycline leiteten sie folgende Gleichung ab:

$$\log K = 0.64 \sigma^2 + 1.87$$

K ist die Hemmkonstante für *E.-coli*-Keime, die man durch kinetische Messung des Wachstums in Gegenwart von 20 µg/ml des jeweiligen Tetracyclinderivates ermittelt. σ bedeutet die Hammett-Konstante des Substituenten in 7-Stellung. An dieser Beziehung ist ungewöhnlich, daß σ im Quadrat auftritt, d. h. Substituenten mit negativen wie positiven σ -Werten steigern die Wirksamkeit. – Eine ähnliche Gleichung gilt für 9-substituierte 6-Desoxytetracycline.

Weitere Regressionsverfahren zur Ermittlung quantitativer Struktur-Wirkungs-Beziehungen in der Tetracyclinreihe siehe [148, 168 – 170].

8.8. Abwandlungen in 11a- und 12a-Stellung

Es wurde bereits darauf hingewiesen, daß eine Veränderung des 11,12- β -Diketonsystems (BCD-Chromophor) zu einer Wirkungsverschlechterung führt. Dies gilt auch für die in-vitro-Aktivität 11a-halogenierter Tetracycline. Einige dieser Verbindungen, die chemisch oder biologisch leicht zu den Ausgangstetracyclinen reduziert werden, zeigen durch diese Reaktivierung eine gewisse Wirksamkeit in vitro und in vivo^[144].

Die 12a-Hydroxygruppe läßt sich mit Säureanhydriden verestern. Nur der Formylester^[154], der in Wasser rasch hydrolysiert, besitzt noch eine dem Tetracyclin vergleichbare Aktivität, alle höheren Ester^[171] sind schwächer wirksam.

8.9. Ergebnisse der Struktur-Wirkungs-Untersuchungen

Faßt man die Ergebnisse der Struktur-Wirkungs-Untersuchungen zusammen, so ergibt sich folgendes Bild:

Das Grundgerüst des Tetracyclinemoleküls mit den chromophoren Keto/Enol-Systemen in den Ringen A sowie BCD und mit der basischen Funktion im Ring A ist eine wesentliche Voraussetzung für die antibiotische Wirksamkeit. Die Konfiguration an den Asymmetriezentren C⁴, C^{4a} und C^{12a} ist essentiell, während sie an C⁵, C^{5a} und C⁶ variiert werden kann. Der Amidwasserstoff läßt sich durch eine Methylgruppe substituieren. Größere Reste wirken sich negativ aus, mit Ausnahme solcher, die in Wasser spontan abspalten. Die Dimethylaminogruppe kann ohne Verlust der in-vitro-Wirksamkeit durch eine primäre Aminogruppe ersetzt werden; alle anderen Veränderungen führen zu einer Verschlechterung der bakteriostatischen Wirkung. Der hydrophobe Teil des Moleküls von C⁵ bis C⁹ ist in vielfältiger Weise abwandelbar. Besonders Modifikationen an C⁶ und C⁷ ergeben Produkte mit größerer chemischer Stabilität, gesteigerter antibiotischer Wirksamkeit und günstigerer Pharmakokinetik.

9. Die Resistenz von Bakterien gegenüber Tetracyclinen

Mit der häufigen Verwendung von Tetracyclinen erhöhte sich auch die Zahl resistenter Bakterienstämme^[172 – 176]. Ausmaß und Verbreitung der Resistenz sind regional verschieden und auch nicht für jeden Erregertyp gleich, doch zeigen sämtliche Untersuchungen, daß das Ansteigen der Resistenz mit der zunehmenden Verwendung von Tetracyclinen parallel geht. Die Situation ist besonders ungünstig, weil zwischen den einzelnen Tetracyclinen eine weitgehende Kreuzresistenz besteht.

9.1. Typen der Resistenz

Der Begriff Resistenz steht in enger Relation zu den therapeutischen und pharmakologischen Eigenschaften eines Antibiotikums. Die medizinische Interpretation dieses Begriffes orientiert sich an der Verträglichkeit und therapeutisch erreichbaren Konzentration der Tetracycline im Serum und Gewebe. Mikroorganismen, die bei einer Konzentration von 3 µg/ml nicht gehemmt werden, gelten als tetracyclinresistent.

Man unterscheidet drei Typen der Resistenz^[177 – 179]:

1. Die primäre oder natürliche Resistenz, die gleichbedeutend mit der natürlichen Unempfindlichkeit eines Stammes gegenüber einem Wirkstoff ist und sich als Lücke im Wirkungsspektrum darstellt.

2. Die erworbene chromosomale Resistenz, die in einer Bakterienpopulation durch spontane Genmutation im Bakterienchromosom verursacht wird. Diese Resistenz ist nur gegen das selektierende Antibiotikum gerichtet.

3. Die übertragbare Resistenz, die durch chromosomal oder extrachromosomal DNA-Elemente (R-Faktoren, Plasmide, Episomen) von Keim zu Keim übertragen wird. In der Regel trägt ein solches DNA-Element mehrere Resistenzgene, so daß die Trägerbakterien gegen chemisch unterschiedliche, nicht kreuzresistente Antibiotika gleichzeitig resistent werden. Die höchste beobachtete Mehrfachresistenz richtete sich gegen sechs Antibiotika, nämlich Tetracyclin, Streptomycin, Chloramphenicol, Kanamycin, Neomycin und Ampicillin und dazu noch gegen Sulfonamide^[179].

Im letzten Jahrzehnt setzte sich die Erkenntnis durch, daß die übertragbare Resistenz bei bakteriellen Erregern aus menschlichem und tierischem Material vorherrschend und

gefährlich ist. Sie hat wesentlich zur Entwicklung tetracyclinresistenter Stämme, vor allem bei Staphylokokken, Streptokokken und den Keimen aus der Familie der Enterobakterien, beigetragen^[173, 180–183]. Alle Bemühungen, ein Tetracyclin zu entwickeln, das der zunehmenden Resistenz auf breiter Front begegnet, sind erfolglos geblieben. Auch Minocyclin, das bei einer Reihe von Keimen günstigere Hemmwerte besitzt und die Resistenz von Staphylokokken zum Teil durchbricht^[169, 184, 185], ist keine echte Alternative.

9.2. Tetracycline in der Tierernährung

Tetracycline, besonders Chlor- und Oxytetracyclin, werden außer zur Therapie auch zur Wachstumsförderung angewendet und in sogenannten nutritiven Dosen an gesunde Tiere verfüttert. Dadurch kommt eine Vielzahl von Bakterien des tierischen Intestinaltraktes ständig mit diesen Antibiotika in Berührung, und die Darmflora verschiebt sich zugunsten resisterter Keime^[186, 187]. In welchem Ausmaß dadurch die Bildung und Ausbreitung resisterter Keime beim Menschen gefördert wird, ist nicht exakt bekannt. Die bis 1971 erlaubte breite Verwendung von Tetracyclinen wurde durch neuere gesetzliche Bestimmungen der EWG^[188] stark eingeschränkt.

9.3. Ursachen der Tetracyclinresistenz

Mehrere Arbeitskreise konnten zeigen, daß die Resistenz gegenüber Tetracyclinen auf einer verminderten Permeabilität der Bakterienzellwand beruht (Zusammenfassungen siehe [189–192]).

Bakterienzellen besitzen im Gegensatz zu Säugerzellen die Fähigkeit, Tetracycline entgegen einem Konzentrationsgradienten anzureichern. Der Unterschied zwischen der intrazellulären und extrazellulären Konzentration bei *E.-coli*-Keimen kann bei bakteriostatischer Konzentration des Antibiotikums auf das 20- bis 30fache, bei bakterizider Konzentration bis auf das 50fache steigen. Diese Anreicherung, ein wesentlicher Faktor für die selektive chemotherapeutische Wirksamkeit der Tetracycline, ist energieabhängig und wird durch Entkoppeler der oxidativen Phosphorylierung gehemmt^[190, 193]. Zweiwertige Ionen, besonders Magnesium-Ionen, scheinen ebenfalls dabei eine Rolle zu spielen, da die Fähigkeit der Membranen, Tetracycline zu absorbieren, durch Vorbehandlung mit dem Komplexbildner EDTA verlorengeht. Die molekularen Komponenten, welche den selektiven Transport bewirken, sind fest mit der Zellmembran verbunden. Ein osmotischer Schock bei *E.-coli*-Keimen beeinflußt die Aufnahme nicht.

Reynard et al.^[194] testeten eine große Zahl von *E.-coli*-Stämmen aus Kliniken und fanden, daß resistente Stämme weniger Tetracyclin aufnehmen als empfindliche. Sompolinsky^[195] fand den gleichen Effekt bei Staphylokokken. Kuck und Forbes^[184] bestätigten diese Befunde für Tetracyclin, fanden aber keinen Unterschied für das lipophilere Minocyclin.

Ribosomen von empfindlichen und resistenten *E.-coli*-Keimen zeigen im zellfreien System die gleiche Empfindlichkeit gegenüber Tetracyclinen^[191]. Craven^[196] isolierte einen hochresistenten *E.-coli*-Stamm, dessen proteinsynthetisierendes System gegen Tetracyclin resistent war. Eine enzymatische Inaktivierung von Tetracyclinen in der resistenten Bakterienzelle ist nicht bekannt.

10. Wirkungsweise von Tetracyclinen

Tetracycline hemmen zahlreiche lebenswichtige enzymatische Reaktionen in Bakterien- und Säugerzellen, z. B. die oxidative Phosphorylierung und den Elektronentransport^[191, 197]. Die Hemmkonzentrationen liegen häufig wesentlich höher als sie zu einer Bakteriostase notwendig sind. Solche Reaktionen scheiden zur Erklärung der antibiotischen Wirksamkeit von Tetracyclinen aus, können aber zur Deutung von toxischen Nebenreaktionen, die durch Anreicherung in bestimmten Organen oder Überdosierung verursacht werden, von Bedeutung sein.

10.1. Hemmung der Proteinbiosynthese

Die empfindlichste biochemische Reaktion, die durch Tetracycline gehemmt wird, ist die Proteinbiosynthese^[198, 199]. Der genaue molekulare Ablauf der Hemmreaktion ist unbekannt, aber man weiß, welche Phasen der Proteinbiosynthese beeinflußt werden.

Der Prozeß der Proteinbiosynthese spielt sich an den Ribosomen im Cytoplasma der Zelle ab und ähnelt einem Fließbandverfahren^[199, 200]. In vielen aufeinander folgenden Reaktionsschritten wird die Basenreihenfolge einer m-RNA in die Aminosäurenreihenfolge eines Proteins übersetzt. Diesen Vorgang nennt man Translation und unterteilt ihn in den Kettenstart (Initiation), die Kettenverlängerung (Elongation) und den Kettenschluß (Termination).

Bei der Kettenverlängerung wird jeweils eine Aminosäure, die an eine spezifische t-RNA gebunden ist, in eine Amidbindung in der wachsenden Polypeptidkette überführt. Als erster Schritt dieser zweiten Phase muß die zu inkorporierende Aminosäure als Aminoacyl-t-RNA an das Ribosom gebunden werden. An dieser Stelle interferieren die Tetracycline, indem sie die Bindung dieser Aminoacyl-t-RNA an die spezifische Acceptorstelle des Ribosoms hemmen^[191, 199]. Andere Schritte werden ebenfalls durch Tetracycline beeinflußt^[192].

10.2. Hemmung der zellfreien Proteinbiosynthese

Wenn die biologische Wirkung der Tetracycline auf einer Hemmung der Proteinbiosynthese beruht, dann sollte diese Hemmung auch in einem System zu beobachten sein, in welchem Nirenberg und Matthaei^[201] die zellfreie Proteinbiosynthese nachwiesen.

Man benötigt dazu intakte gereinigte Ribosomen und einen durch hochtouriges Zentrifugieren gewonnenen Überstand eines Zellextraktes, der alle t-RNA-Arten und die zugehörigen Enzyme enthält. Als Matrize benutzt man synthetische Polynucleotide; gemessen wird die Hemmung des Einbaus markierter Aminosäuren. Enthält ein solches System Polyuridylsäure als Matrize, dann wird von Tetracyclinen die durch dieses Polynucleotid codierte Bildung von Polyphenylalanin gehemmt. Diese Inhibition läßt sich gut mit der Aktivität von Tetracyclinen korrelieren^[191, 199b, 202].

Summ^[203, 204] verglich die Hemmung, die mehrere Tetracyclin-Derivate auf die zellfreie Proteinbiosynthese am *E.-coli*-System ausüben, mit der Hemmung in intakten Zellen im Reihenverdünnungstest. Demnach sind antibiotisch hochwirksame Tetracycline (Beispiele 1 bis 7 in Tabelle 3) starke Inhibitoren der Proteinbiosynthese. Durch Änderung der Lipophilie

kann der bakteriostatische Grundcharakter der Tetracycline nicht umgestimmt werden.

Biologisch inaktive Tetracycline, z. B. Tetracyclinnitril, sind schlechte Inhibitoren der Proteinbiosynthese. Es gibt aber auch Ausnahmen: Tetracyclinmethojodid, das im Reihenverdünnungstest praktisch unwirksam ist, hemmt im zellfreien System nur viermal schwächer als Tetracyclin (3). Wahrscheinlich verhindert der salzartige Charakter des Moleküls die Permeation und den Transport zum Wirkort. Anhydrotetracyclin (10) und 12a-Desoxytetracyclin hemmen im zellfreien System schlechter als man nach dem Reihenverdünnungstest erwarten sollte, was darauf hindeutet, daß diese Moleküle weitere Stellen in Bakterien angreifen oder durch metabolische Schritte in der Zelle aktiviert werden.

Hemmversuche im zellfreien System sind für die Erforschung von Struktur-Wirkungs-Beziehungen sehr wertvoll, weil sie uns einen Parameter für die Wirksamkeit am biologisch aktiven Zentrum liefern und störende Einflüsse durch Permeation und/oder Metabolismus ausgeschaltet sind.

Tetracycline hemmen auch die Proteinbiosynthese in Säuerzellen, aber erst in höheren Konzentrationen.

Tabelle 3. Vergleich der Hemmung der zellfreien Poly-U-abhängigen Polypheylalanin-Synthese im Enzymsystem aus *E. coli* und aus Rattenleber durch Tetracycline (TC) [203, 204]. DI₅₀ ist die Konzentration des Antibiotikums, die zu einer 50proz. Hemmung der Polypheylalanin-Synthese führt.

Präparat (siehe Tabelle 1)	Zellfreies Enzymsystem aus		
	<i>E. coli</i>	Leber	DI ₅₀ (Leber)
	DI ₅₀ [μmol/l]	DI ₅₀ [μmol/l]	DI ₅₀ (<i>coli</i>)
1 Minocyclin (8)	6.22	620	100
2 Pyrrolidinomethyl-TC (5)	6.84	233	34.0
3 Chlor-TC (1)	7.55	103	13.6
4 Desmethylchlor-TC (4)	9.68	39.9	41.1
5 Doxycyclin (7)	9.76	287	29.4
6 Tetracyclin (3)	9.77	168	17.2
7 Oxy-TC (2)	12.1	437	36.1
8 TC-Methojodid	39.2	345	8.8
9 4-Desdimethylamino-TC	410	968	2.4
10 Anhydro-TC (10)	493	590	1.2
11 12a-Desoxy-TC	126	470	3.7
12 TC-Nitril	887	1785	2.0

Tabelle 3 zeigt die durch Tetracycline verursachte unterschiedliche Hemmung der Proteinbiosynthese in zellfreien Systemen aus *E. coli* und aus Rattenleber. Man erkennt, daß die Proteinbiosynthese im *E. coli*-System durch die wirksamen, gut verträglichen Tetracycline wesentlich stärker gehemmt wird als im Leber-System. Anhydrotetracyclin (10), ein Abbauprodukt des Tetracyclins, hemmt in beiden Systemen fast gleich und ist deshalb auch toxischer. Der Quotient aus den Hemmwerten in beiden Systemen ist ein Maß für die Selektivität der Tetracycline. Man wünscht, daß bei bakteriostatischer Konzentration des Antibiotikums die Proteinbiosynthese der Wirtszelle nicht oder nur wenig beeinflußt wird. Das Verhältnis beider Werte ist zwar kein quantitatives Maß für die Toxizität oder den chemotherapeutischen Index des Wirkstoffs, weil diese Werte entscheidend auch von der Pharmakokinetik und dem Metabolismus abhängen, aber ein guter Anhaltspunkt.

11. Zusammenfassung und Schluß

Nur wenige Moleküle sind in ihren chemischen, physikalischen und biologischen Eigenschaften so gründlich untersucht worden wie die Tetracycline. Diese Anstrengungen waren nicht

vergeblich. Es wurden Tetracycline mit höherer Löslichkeit und Stabilität, rascher und vollständiger Resorption, stärkerer Wirksamkeit und günstigerer Pharmakokinetik entwickelt. Die Beschäftigung mit dieser Stoffklasse regte zu vielen praktischen und theoretischen Arbeiten an, die von allgemeiner Bedeutung für die Weiterentwicklung der Naturwissenschaften und Medizin sind.

Nicht alle gesteckten Ziele wurden erreicht. Durch chemische Veränderungen ließ sich der bakteriostatische Grundcharakter des Tetracyclins nicht verändern. Das Wirkungsspektrum konnte nicht entscheidend erweitert werden. Die wachsende Zahl tetracyclineresistenter Stämme, die durch die häufige, oft unkritische Anwendung dieser Antibiotika gefördert wurde, bereitet heute Sorgen und führt zu zurückhaltenderer Anwendung. Trotz wesentlicher Fortschritte in der Chemotherapie der Infektionskrankheiten bleibt die Aufgabe bestehen, ständig nach neuen Wirkstoffen zu suchen und sie nach strengen Maßstäben auszuwählen und zu bewerten, bevor sie zur Anwendung kommen.

Eingegangen am 26. Februar 1975 [A 78]

- [1] L. H. Conover, *Advan. Chem. Ser.* 108, 33 (1971).
- [2] S. A. Waksman: *Microbial Antagonisms and Antibiotic Substances*. The Commonwealth Fund, New York 1945.
- [3] B. M. Duggar, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 51, 177 (1948).
- [4] A. C. Finlay, G. L. Hobby, S. Y. Pan, P. P. Regna, J. B. Routien, D. B. Seeley, G. M. Shull, B. A. Sabin, I. A. Solomons, J. W. Vinson u. J. H. Kane, *Science* 111, 85 (1950).
- [5] F. A. Hochstein, C. R. Stephens, L. H. Conover, P. P. Regna, R. Pasterneak, P. N. Gordon, F. J. Pilgrim, K. J. Brunings u. R. B. Woodward, *J. Amer. Chem. Soc.* 75, 5455 (1953); 74, 3706 (1952).
- [6] J. H. Boothe, J. Morton, J. P. Petisi, R. G. Wilkinson u. J. H. Williams, *J. Amer. Chem. Soc.* 75, 4621 (1953).
- [7] L. H. Conover, W. T. Mordand, A. R. English, C. R. Stephens u. F. J. Pilgrim, *J. Amer. Chem. Soc.* 75, 4623 (1953).
- [8] P. P. Minieri, M. C. Firman, A. G. Mistretta, A. Abbey, C. E. Bricker, N. E. Rigler u. H. Sokol, *Antibiotics Annual 1953–1954*, 81. Med. Encyclop. Inc., New York.
- [9] J. R. D. McCormick, N. O. Sjolander, U. Hirsch, E. R. Jensen u. A. P. Doerschuk, *J. Amer. Chem. Soc.* 79, 4561 (1957).
- [10] S. Hirokawa, Y. Okaya, F. M. Lovell u. R. Pepinsky, *Acta Crystallogr.* 72, 811 (1959); Z. Kristallogr., Kristallgeometrie, Kristallphys. Kristallchem. 112, 439 (1959).
- [11] Y. Takeuchi u. M. J. Buerger, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 46, 1366 (1960).
- [12] J. Donohue, J. D. Dunitz, K. N. Trueblood u. M. S. Webster, *J. Amer. Chem. Soc.* 85, 851 (1963).
- [13] H. Cid-Dresdner, Z. Kristallogr., Kristallgeometrie, Kristallphys. Kristallchem. 121, 170 (1965).
- [14] R. E. Hughes, H. Muxfeldt u. R. B. von Dreele, *J. Amer. Chem. Soc.* 93, 1037 (1971).
- [15] M. Schach von Wittenau, R. K. Blackwood, L. H. Conover, R. H. Glauert u. R. B. Woodward, *J. Amer. Chem. Soc.* 87, 134 (1965).
- [16] M. Schach von Wittenau u. R. K. Blackwood, *J. Org. Chem.* 31, 613 (1966).
- [17] L. A. Mitscher, B. Slater-Eng u. T. D. Sokoloski, *Antimicrob. Ag. Chemother.* 1972, 66, und dort zit. Lit.
- [18] C. R. Stephens, K. Murai, K. J. Brunings u. R. B. Woodward, *J. Amer. Chem. Soc.* 78, 4155 (1956).
- [19] L. A. Mitscher, A. C. Bonacci u. T. D. Sokoloski, *Tetrahedron Lett.* 1968, 5361.
- [20] D. W. Hughes u. W. L. Wilson, *Can. J. Pharm. Sci.* 8, 67 (1973); und dort zit. Lit.
- [21] H. Muxfeldt u. R. Bangert, *Fortschr. Chem. Org. Naturst.* 21, 80 (1963).
- [22] H. Muxfeldt, *Angew. Chem.* 74, 443, 825 (1962); *Angew. Chem. internat. Edit.* 1, 372 (1962).
- [23] D. L. J. Clive, *Quart. Rev. Chem. Soc.* 22, 435 (1968).
- [24] T. Money u. A. I. Scott, *Progr. Org. Chem.* 7, 1 (1968).
- [25] R. K. Blackwood in: *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*, 2. Aufl., Vol. 18, Wiley, New York 1969.
- [26] G. C. Barrett, *J. Pharm. Sci.* 52, 309 (1963).
- [27] J. J. Hlavka u. J. H. Boothe, *Fortschr. Arzneimittelforsch.* 17, 211 (1973).
- [28] G. Ehrhart u. H. Ruschig: *Arzneimittel*. 2. Aufl. Verlag Chemie, Weinheim 1972, Bd. 4, S. 368.
- [29] E. G. Remmers, G. M. Sieger u. A. P. Doerschuk, *J. Pharm. Sci.* 52, 752 (1963).

- [30] D. A. Hussar, P. J. Niebergall, E. T. Sugita u. J. T. Doluisio, *J. Pharm. Pharmacol.* 20, 539 (1968).
- [31] C. T. Agostini u. Ch. R. Kowarski, *Pharm. Acta Helv.* 47, 560 (1972).
- [32] V. Naggar, N. A. Daabis u. M. M. Motawi, *Pharmazie* 29, 129 (1974).
- [33] E. Reuter, *Med. Klin. (München)* 67, 1256 (1972).
- [34] A. M. Walter u. L. Heilmeyer: *Antibiotika-Fibel*. 3. Aufl. Thieme, Stuttgart 1969, S. 16.
- [35] Med. Lett. Drugs Therap. 14, Nr. 2, Issue 340, 7, 11 (1972).
- [36] J. R. D. McCormick in Z. Vanek u. Z. Hostalek: *Biogenesis of Antibiotic Substances*. Academic Press, New York 1965, S. 73.
- [37] L. A. Mitscher, *J. Pharm. Sci.* 57, 1633 (1968).
- [38] C. H. Hassall u. G. J. Thomas, *Chem. Commun.* 1970, 1053.
- [39] E. Brandl in R. Brunner u. G. Machek: *Die Antibiotica*. Bd. 1, 2. Teil. Verlag H. Carl, Nürnberg 1962, S. 375.
- [40] H. Ippen, *Arch. Klin. Exp. Dermatol.* 212, 519 (1961).
- [41] T. J. Oliver, J. F. Prokop, R. R. Bower u. R. H. Otto, *Antimicrob. Ag. Chemother.* 1962, 583.
- [42] A. C. Sinclair, J. R. Schenk, G. G. Post, E. V. Cardinal, S. Burokas u. H. H. Fricke, *Antimicrob. Ag. Chemother.* 1962, 592.
- [43] L. A. Mitscher, W. M. Rosenbrook, Jr., W. W. Andres, R. S. Egan, J. Schenk u. J. V. Inarkar, *Antimicrob. Ag. Chemother.* 1970, 38.
- [44] J. R. D. McCormick, E. R. Jensen, P. A. Miller u. A. P. Doerschuk, *J. Amer. Chem. Soc.* 82, 3381 (1960).
- [45] C. R. Stephens, K. Murai, H. H. Rennhard, L. H. Conover u. K. J. Brunings, *J. Amer. Chem. Soc.* 80, 5324 (1958).
- [46] M. Schach von Wittenau, J. J. Beereboom, R. K. Blackwood u. C. R. Stephens, *J. Amer. Chem. Soc.* 84, 2645 (1962).
- [47] C. R. Stephens, J. J. Beereboom, H. H. Rennhard, P. N. Gordon, K. Murai, R. K. Blackwood u. M. Schach von Wittenau, *J. Amer. Chem. Soc.* 85, 2643 (1963).
- [48] R. C. Esse, J. A. Lowery, C. R. Tamorría u. G. M. Sieger, *J. Amer. Chem. Soc.* 86, 3874 (1964).
- [49] R. K. Blackwood u. C. R. Stephens, *Can. J. Chem.* 43, 1382 (1965).
- [50] F. Lindner, W. Siedel u. A. Söder, DBP 1044806 (1959) u. 1063598 (1960); s. auch München. Med. Wochenschr. 100, 661 (1958).
- [51] W. J. Gottstein, W. F. Minor u. L. C. Cheney, *J. Amer. Chem. Soc.* 81, 1198 (1959).
- [52] H. Hartung, F. Cavagna, W. Martin u. W. Dürckheimer, *Arch. Pharm.* 307, 651 (1974).
- [53] R. Fussgänger, München. Med. Wochenschr. 100, 663 (1958).
- [54] L. Ther, J. Hergott u. G. Vogel, *Arzneim.-Forsch.* 9, 63 (1959).
- [55] R. Bucher u. T. Wegmann, *Schweiz. Med. Wochenschr.* 95, 1621 (1965).
- [56] G. Stoetter, München. Med. Wochenschr. 114, 836 (1972).
- [57] B. Schölkens, K. Gerhards u. E. Lindner, *Arzneim.-Forsch.* 24, 312 (1974).
- [58] H. Hartung u. W. Dürckheimer, unveröffentlichte Versuche.
- [59] A. Brunzell, *Acta Chem. Scand.* 16, 245 (1962).
- [60] W. Diemair u. W. Rödder, *Z. Lebensm.-Unters. Forsch.* 111, 365 (1960).
- [61] D. W. Hughes, W. L. Wilson, A. G. Butterfield u. N. J. Pound, *J. Pharm. Pharmacol.* 26, 79 (1974).
- [62] R. K. Blackwood, J. J. Beereboom, H. H. Rennhard, M. Schach von Wittenau u. C. R. Stephens, *J. Amer. Chem. Soc.* 85, 3943 (1963).
- [63] Siehe [34], dort S. 260ff.
- [64] H. Knothe, *Deut. Med. Wochenschr.* 95, 2500 (1970).
- [65] J. Meyer-Rohn, *Med. Welt* 1968, 837.
- [66] J. Fabre, J. S. Pitton, C. Virieux, F. L. Laurencet, J. P. Bernhardt u. J. C. Godel, Schweiz. Med. Wochenschr. 97, 915 (1967).
- [67] M. Schach von Wittenau, *Chemotherapy*, Suppl. zu Bd. 13, 41 (1968).
- [68] M. Schach von Wittenau u. I. M. Twomey, *Chemotherapy* 16, 217 (1971).
- [69] M. J. Martell u. J. H. Boothe, *J. Med. Chem.* 10, 44 (1967); s. auch R. F. R. Church, R. E. Schaub u. M. J. Weiss, *J. Org. Chem.* 36, 723 (1971).
- [70] E. Lauschner, München. Med. Wochenschr. 115, 2156 (1973).
- [71] E. Lauschner u. G. Stütgen: *Minocyclin-Symposium*, Bad Reichenhall 1971. G. Thieme, Stuttgart 1972.
- [72] H. Macdonald, R. G. Kelly, E. S. Allen, J. F. Noble u. L. A. Kanegis, *Clin. Pharmacol. Ther.* 14, 852 (1973).
- [73] R. B. Woodward in A. Todd: *Perspectives in Organic Chemistry*. Interscience, New York 1956, S. 160.
- [74] J. H. Boothe, A. S. Kende, T. L. Fields u. R. G. Wilkinson, *J. Amer. Chem. Soc.* 81, 1006 (1959).
- [75] T. L. Fields, A. S. Kende u. J. H. Boothe, *J. Amer. Chem. Soc.* 82, 1250 (1960).
- [76] T. L. Fields, A. S. Kende u. J. H. Boothe, *J. Amer. Chem. Soc.* 83, 4612 (1961).
- [77] A. S. Kende, T. L. Fields, J. H. Boothe u. S. Kushner, *J. Amer. Chem. Soc.* 83, 439 (1961).
- [78] H. Muxfeldt u. A. Kreutzer, *Chem. Ber.* 94, 881 (1961).
- [79] H. Muxfeldt, W. Rogalski u. K. Striegler, *Angew. Chem.* 72, 170 (1960).
- [80] H. Muxfeldt, *Angew. Chem.* 74, 825 (1962).
- [81] I. G. Bolesov, M. N. Kolosov u. M. M. Shemyakin, *Izv. Akad. Nauk SSSR, Ser. Khim.* 1965, 1039.
- [82] M. N. Kolosov, V. V. Onoprienko u. M. M. Shemyakin, *Zh. Obshch. Khim.* 35, 659 (1965).
- [83] A. I. Gurevich, M. G. Karapetyan, M. N. Kolosov, V. G. Korobko u. M. M. Shemyakin, *Zh. Obshch. Khim.* 35, 668 (1965).
- [84] A. I. Gurevich, M. G. Karapetyan, M. N. Kolosov, V. G. Korobko, V. V. Onoprienko, S. A. Popravko u. M. M. Shemyakin, *Tetrahedron Lett.* 1967, 131.
- [85] A. I. Gurevich, M. N. Kolosov, V. G. Korobko u. S. A. Popravko, *Zh. Obshch. Khim.* 38, 57 (1968).
- [86] A. I. Scott u. C. Y. Bedford, *J. Amer. Chem. Soc.* 84, 2271 (1962).
- [87] M. Schach von Wittenau, *J. Org. Chem.* 29, 2746 (1964).
- [88] H. Muxfeldt, persönliche Mitteilung.
- [89] D. H. R. Barton, *Chem. Brit.* 1970, 301; *Proc. Roy. Soc. A* 319, 145 (1970); D. H. R. Barton et al., *J. Chem. Soc. C* 1971, 2164, 2166, 2175, 2184, 2204, 2215, 2225, 2231, 2241.
- [90] L. H. Conover, K. Butler, J. D. Johnston, J. J. Korst u. R. B. Woodward, *J. Amer. Chem. Soc.* 84, 3222 (1962).
- [91] R. B. Woodward, *Pure Appl. Chem.* 6, 561 (1963).
- [92] J. J. Korst, J. D. Johnston, K. Butler, E. J. Bianco, L. H. Conover u. R. B. Woodward, *J. Amer. Chem. Soc.* 90, 439 (1968).
- [93] H. Muxfeldt u. W. Rogalski, *J. Amer. Chem. Soc.* 87, 934 (1965).
- [94] H. Muxfeldt, *Antimicrob. Ag. Chemother.* 1965, 977.
- [95] J. Michael, Dissertation, University of Wisconsin, Madison, Wisc. 1968.
- [96] H. Muxfeldt, G. Hardtmann, F. Kathawala, E. Vedejs u. J. B. Mooberry, *J. Amer. Chem. Soc.* 90, 6534 (1968).
- [97] H. Muxfeldt, H. Döpp, J. E. Kaufman, J. Schneider, P. E. Hansen, A. Sasaki u. T. Geiser, *Angew. Chem.* 85, 508 (1973); *Angew. Chem. internat. Edit.* 12, 497 (1973).
- [98] W. Martin, H. Hartung, H. Urbach u. W. Dürckheimer, *Tetrahedron Lett.* 1973, 3513.
- [99] H. Urbach, H. Hartung, W. Martin u. W. Dürckheimer, *Tetrahedron Lett.* 1973, 4907.
- [100] W. Dürckheimer, unveröffentlichte Versuche.
- [101] E. Schrinner, unveröffentlichte Versuche.
- [102] C. J. Jarowski, Vortr. 6. Pan Am. Congr. Pharm. Biochem., Mexico City 1963.
- [103] D. A. Hussar, *J. Pharm. Pharmacol.* 20, 539 (1968).
- [104] E. G. Remmers, N. C. Barringer, G. M. Sieger, N. Anagnostakos, J. Corbett u. P. A. Doerschuk, *J. Pharm. Sci.* 54, 49 (1965); dort Hinweise auf ältere Lit.
- [105] W. A. Baker u. P. M. Brown, *J. Amer. Chem. Soc.* 88, 1314 (1966).
- [106] J. T. Doluisio u. A. N. Martin, *J. Med. Chem.* 6, 16 (1963).
- [107] K. Taguchi, *Chem. Pharm. Bull.* 8, 205, 212, 217 (1960).
- [108] A. Albert, *Nature* 172, 201 (1953).
- [109] A. Albert u. C. W. Rees, *Nature* 177, 434 (1956).
- [110] L. A. Mitscher, A. C. Bonacci u. T. D. Sokoloski, *Antimicrob. Ag. Chemother.* 1968, 78.
- [111] L. A. Mitscher, A. C. Bonacci, B. Slater-Eng, A. K. Hacker u. T. D. Sokoloski, *Antimicrob. Ag. Chemother.* 1969, 111.
- [112] M. Noseworthy, US-Pat. 3009956 (1961), Chas. Pfizer and Co.
- [113] J.-C. Mani u. G. Foltran, *Bull. Soc. Chim. Fr.* 1971, 4141.
- [114] T. V. Alykowa, *Antibiotiki* 17, 353 (1972).
- [115] A. H. Caswell, *J. Membr. Biol.* 7, 345 (1972).
- [116] A. H. Caswell u. J. D. Hutchison, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 43, 625 (1971).
- [117] A. Stahlawska, M. S. Tawakkol, V. Slansky u. M. Frslinkowa, *Pharmazie* 27, 456 (1972).
- [118] P. J. Neuvonen, G. Gothoni, R. Hackmann u. K. Björksten, *Brit. Med. J.* 1970 (Bd. 4), 532.
- [119] *Brit. Med. J.* 1970 (Bd. 4), 509.
- [120] M. J. Mattila, P. J. Neuvonen, G. Gothoni u. C. R. Hackman, *Proc. Eur. Soc. Study Drug Toxicity* 13, 128 (1972).
- [121] A. Forsgren u. H. Gnarpe, *Nature New Biol.* 244, 82 (1973).
- [122] E. H. Gans u. T. Higuchi, *J. Amer. Pharm. Assoc.* 46, 458 (1957).
- [123] W. Wessel, M. Schoog u. E. Winkler, *Arzneimittelforsch.* 21, 1468 (1971).
- [124] J. Wierus u. H. E. Schornagel, *Cancer Chemotherapy* 16, 85 (1971).
- [125] DOS 1767891 (1968), Pfizer GmbH.
- [126] J. Kriegelstein, *Arzneimittelforsch.* 23, 1527 (1973).
- [127] M. Schach von Wittenau u. R. Yearly, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 140, 258 (1963).
- [128] W. Scholtan, *Arzneimittelforsch.* 13, 347 (1963).
- [129] W. Scholtan, *Arzneimittelforsch.* 18, 505 (1968).
- [130] G. Powis, *J. Pharm. Pharmacol.* 26, 113 (1974).
- [131] R. L. Searcy, J. A. Forman, H. D. Myers u. L. M. Berquist, *Antimicrob. Ag. Chemother.* 1963, 471.
- [132] E. Genazzani, L. J. Bononi, G. Pagnini u. F. DiCarlo: *Progress in Antimicrobial and Anticancer Chemotherapy*. Proc. 6. Int. Congr. Chemother., Tokyo 1970, Vol. I, S. 245, dort weitere Lit.
- [133] T. Perenyi, S. Szoke u. E. K. Nowak, *Acta Pharm. Hung.* 42, 220 (1972).
- [134] J. K. H. Ma, H. W. Jun u. L. A. Luzzi, *J. Pharm. Sci.* 62, 1261 (1973).
- [135] G. N. Rolinson, *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* 1972, Suppl. 5, S. 2.

- [136] J. P. F. Whelan u. J. McFadzean in T. B. Binns: Absorption and Distribution of Drugs. Livingstone, Edinburgh 1964.
- [137] W. Scholtan u. J. Schmid, Arzneimittelforsch. 12, 748 (1962).
- [138] A. Albert: Selected Toxicity. 5. Aufl. Chapman and Hall, London 1973, S. 20.
- [139] E. Krüger-Thiemer in E. Freerksen: Jahresbericht Borstel. Springer, Berlin 1961, Bd. 5, S. 316.
- [140] J. Crofton, Brit. Med. J. 1969, Bd. 2, S. 211.
- [141] R. Reiner: Antibiotica. Thieme, Stuttgart 1974, S. 11.
- [142] Siehe [34], dort S. 2-28.
- [143] L. A. Mitscher, J. H. Martin, P. A. Miller, P. Shu u. N. Bohonos, J. Amer. Chem. Soc. 88, 3647 (1966).
- [144] R. K. Blackwood u. A. R. English, Advan. Appl. Microbiol. 13, 237 (1970).
- [145] J. H. Boothe, Antimicrob. Ag. Chemother. 1962, 213.
- [146] V. K. Plakunow, Dokl. Akad. Nauk SSSR 151, 1207 (1963).
- [147] M. M. Shemyakin u. M. N. Kolosov, Pure Appl. Chem. 6, 305 (1963).
- [148] G. H. Miller, S. A. Kahil u. A. N. Martin, J. Pharm. Sci. 60, 33 (1971).
- [149] J. R. D. McCormick u. E. R. Jensen, Belg. Pat. 565024 (1958), American Cyanamid Co.
- [150] A. Green, Belg. Pat. 572382 (1958), American Cyanamid Co.
- [151] R. E. Blackwood, H. H. Remnhard, J. J. Beereboom u. C. R. Stephens, Belg. Pat. 603760 (1961), Chas. Pfizer and Co.
- [152] U. Valcavi, G. Campanella u. N. Pacini, Gazz. Chim. Ital. 93, 916 (1963).
- [153] C. W. Waller, B. L. Hutchings, R. W. Broschard, A. A. Goldman, W. J. Stein, C. F. Wolf u. J. H. Williams, J. Amer. Chem. Soc. 74, 4981 (1952).
- [154] R. K. Blackwood, H. H. Remnhard u. C. R. Stephens, J. Amer. Chem. Soc. 82, 5194 (1960).
- [155] J. R. D. McCormick, US-Pat. 3345409 (1967), American Cyanamid Co.
- [156] W. Dürckheimer u. W. Martin, unveröffentlichte Versuche.
- [157] W. Raether u. E. Schrinner, unveröffentlichte Versuche.
- [158] J. J. Korst, DOS 2065149 (1972), Pfizer Inc.
- [159] J. J. Korst, DOS 2049941 (1972), Pfizer Inc.
- [160] M. W. Miller u. F. A. Hochstein, J. Org. Chem. 27, 2525 (1962).
- [161] C. R. Stephens, US-Pat. 3028409, Chas. Pfizer and Co.
- [162] H. Reinshagen u. E. Schütze, unveröffentlichte Versuche.
- [163] H. Reinshagen u. E. Schütze, Franz. Pat. 1559914 (1969), DOS 1618406 (1971), beide Hoechst AG.
- [164] J. H. Boothe, G. E. Bonvicino, C. W. Waller, J. P. Petisi, R. W. Wilkinson u. R. B. Broschard, J. Amer. Chem. Soc. 80, 1654 (1958).
- [165] M. J. Martell, A. S. Ross u. J. H. Boothe, J. Amer. Chem. Soc. 89, 6780 (1967).
- [166] J. Petisi, J. L. Spencer, J. J. Hlavka u. J. H. Boothe, J. Med. Pharm. Chem. 5, 538 (1962).
- [167] A. Cammarata u. S. J. Yau, J. Med. Chem. 13, 93 (1970).
- [168] S. M. Free, Jr. u. J. W. Wilson, J. Med. Chem. 7, 395 (1964).
- [169] A. Cammarata, S. J. Yau, J. H. Collett u. A. N. Martin, Mol. Pharmacol. 6, 61 (1970).
- [170] F. Peradejordi, A. N. Martin u. A. Cammarata, J. Pharm. Sci. 60, 576 (1971).
- [171] R. K. Blackwood u. C. R. Stephens, US-Pat. 3047617 (1962), Chas. Pfizer and Co.
- [172] P. Bischoff, München. Med. Wochenschr. 113, 353 (1971).
- [173] D. Fritsche u. A. Schulz-Stühner, Deut. Med. Wochenschr. 97, 1963 (1972).
- [174] G. B. Roemer u. K. Metz, Deut. Med. Wochenschr. 97, 1878 (1972).
- [175] W. Ritzerfeld, München. Med. Wochenschr. 115, 1641 (1973).
- [176] H. Bloch, Schweiz. Med. Wochenschr. 98, 611 (1968).
- [177] Siehe [34], dort S. 52 u. 260.
- [178] G. Lebek, Deut. Med. J. 23, 460 (1972).
- [179] E. Reinhard, Pharm. Unserer Zeit 1, 9, 67 (1972).
- [180] D. C. Hirsh, G. C. Burton u. D. C. Blenden, Antimicrob. Ag. Chemother. 4, 69 (1973).
- [181] G. M. Shub, B. A. Shenderow, V. V. Vorobiew u. V. I. Pylaev, Antibiotiki 17, 1025 (1972).
- [182] G. Pulverer, Deut. Med. Wochenschr. 97, 252 (1972).
- [183] K. V. Gopalakrishna u. P. I. Lerner, Amer. Rev. Resp. Dis. 108, 1007 (1973).
- [184] N. A. Kuck u. M. Forbes, Antimicrob. Ag. Chemother. 3, 662 (1973).
- [185] E. C. R. Reeve u. J. M. Robertson, J. Gen. Microbiol. 16, 73 (1972).
- [186] R. Stephan, Zentralbl. Bakteriol., Parasitenk., Infektionskr. Hyg., Abt. B. 156, 199 (1972).
- [187] E. Bulling u. R. Stephan, Zentralbl. Veterinärmed. B. 19, 268 (1972), u. frühere Mitt.
- [188] Richtlinie des Rates der Europäischen Gemeinschaften vom 17. 12. 1973 über Festlegung von Höchstgehalten an unerwünschten Stoffen und Erzeugnissen in Futtermitteln, Anhang 2.
- [189] R. Benveniste u. J. Davies, Annu. Rev. Biochem. 42, 471 (1973).
- [190] T. J. Franklin, CRC Crit. Rev. Microbiol. 1973, 263.
- [191] A. I. Laskin u. J. A. Last, Antibiot. Chemother. (Basel) 17, 1 (1971).
- [192] H. Kersten u. G. Tey in V. Kremer, L. Resival u. T. Watanabe: Bacterial Plasmids and Antibiotic Resistance. Springer, Berlin 1972.
- [193] A. M. Reynard u. L. F. Nellis, Biochem. Biophys. Res. Commun. 48, 1129 (1972).
- [194] A. M. Reynard, L. F. Nellis u. M. E. Beck, Appl. Microbiol. 21, 71 (1971).
- [195] D. Sompolinsky, Y. Zaidenzaig, R. Ziegler-Schlomowitz u. N. Abramova, J. Gen. Microbiol. 62, 351 (1970).
- [196] G. R. Craven, R. Gavin u. Th. Fanning, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 34, 129 (1969).
- [197] A. I. Laskin in D. Gottlieb u. P. D. Shaw: Antibiotics. Springer, Berlin 1967, Bd. 1, S. 331.
- [198] E. F. Gale u. J. P. Folkes, Biochem. J. 53, 483 (1953).
- [199] Zusammenfassungen: a) B. Weissblum u. J. Davies, Bacteriol. Rev. 32, 493 (1968); b) E. F. Gale: The Molecular Basis of Antibiotic Action, Wiley, New York 1972, S. 315; c) F. Lipmann, Triangel 10, 17 (1971).
- [200] Zusammenfassungen: a) H. Matthaei, G. Sander, D. Swan, T. Kreuzer, H. Caffier u. A. Parmeggiani, Naturwissenschaften 55, 281 (1968); b) G. Schreiber, Angew. Chem. 83, 645 (1971); Angew. Chem. internat. Edit. 10, 638 (1971); c) C. G. Kurland, Annu. Rev. Biochem. 41, 377 (1972); d) P. Knolle, Deut. Apoth.-Ztg. 113, Nr. 2, 39 (1973).
- [201] M. Nirenberg u. H. Matthaei, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 47, 1588 (1961).
- [202] A. I. Laskin u. W. May Chan, Biochem. Biophys. Res. Commun. 14, 137 (1964).
- [203] H. D. Summ u. O. Christ, Arzneimittelforsch. 17, 1186 (1967).
- [204] H. D. Summ, unveröffentlichte Versuche.