

# Synthese von Tetracyclinderivaten durch Isoxazolchemie\*\*

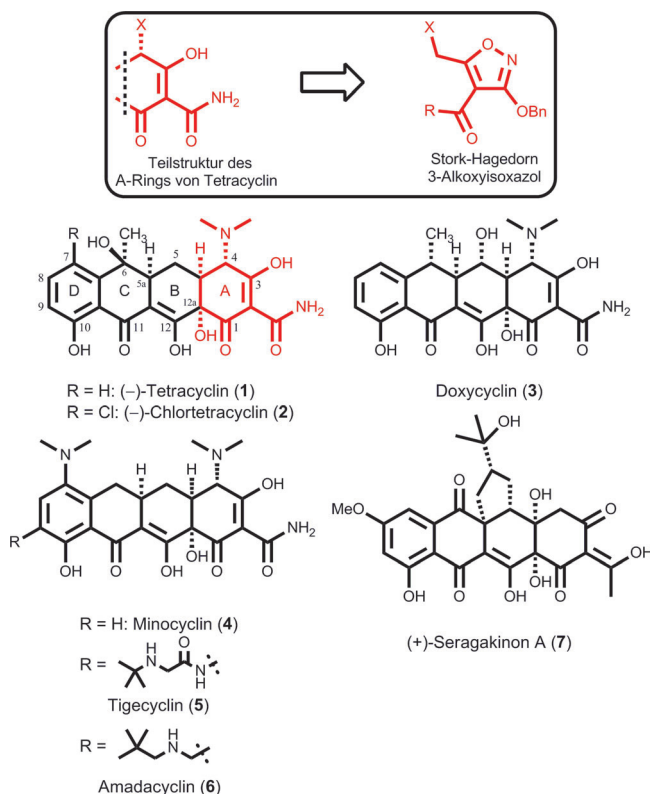
Brian Heasley\*

Antimikrobielle Wirkstoffe · Bakterienresistenz · Isoxazol · Seragakinon A · Tetracycline

Die Tetracycline (Abbildung 1) sind natürlich vorkommende (**1**, **2**, **7**) und semisynthetische (**3–6**) antimikrobielle Wirkstoffe.<sup>[1–3]</sup> Ihre bakteriostatische Wirkung<sup>[1,2,4]</sup> beruht auf der Inhibierung der bakteriellen Proteintranslation durch reversible Bindung an die prokaryotische ribosomale 30S-Untereinheit. Dieses Ereignis blockiert die Wechselwirkung des Ribosoms mit Aminoacyl-tRNA, wodurch die Proteinsynthese zum Erliegen kommt. Tetracyclin-Antibiotika sind wirksam gegen ein breites Spektrum von Mikroorganismen, darunter Gram-positive und Gram-negative Bakterien sowie eukaryotische einzellige Parasiten.<sup>[1,2]</sup>

Das Kohlenstoffgerüst des Tetracyclinpolyketids<sup>[5]</sup> besteht aus vier linear anellierten carbocyclischen Ringen (A–D), die bis zu sechs aufeinanderfolgende Stereozentren und eine dichte Anordnung von säure- und baseempfindlichen Funktionalitäten beherbergen.<sup>[3]</sup> Der D-Ring ist phenolisch und elektronenreich. Der A-Ring weist polare Funktionalitäten auf, einschließlich einer Dimethylaminogruppe und eines pharmakophoren<sup>[6]</sup>  $\beta$ -Ketocarboxamids (vinyloge Carbaminsäure). Die  $\beta$ -Diketonketoenol-Systeme (Abbildung 1, C11–C12 und C1–C3) chelatisieren divalente Kationen wie Magnesium.<sup>[1,2]</sup> Diese Fähigkeit zur Chelatbildung beeinflusst die Bindungs- und pharmakokinetischen Eigenschaften und erleichtert die Diffusion des Moleküls durch biologische Membranen, um so Zugang zum zytosolischen Ribosom zu erlangen.

Ein jährlicher Verbrauch von rund 5000 Tonnen ist Beleg für die immense Bedeutung dieser Klasse von Antibiotika in klinischen, veterinären und landwirtschaftlichen Anwendungen.<sup>[2,3]</sup> Eine Schattenseite dieses Erfolgs ist jedoch die Entwicklung bakterieller Resistenzen durch den genetischen Erwerb von *tet*-Genen, deren Proteinprodukte die Ribosomen in der Zelle vor Tetracyclinen schützen können. Die Efflux- und Ribosom-basierte Resistenz gegen Tetracycline der ersten und zweiten Generation wird hauptsächlich drei



**Abbildung 1.** Beispiele für natürliche Tetracyclin-Antibiotika (**1**, **2**, **7**) sowie semisynthetische Tetracycline der zweiten Generation (**3**, **4**) und dritten Generation (**5**, **6**). Kasten: Wie durch Stork und Hagedorn 1978 erstmals beschrieben wurde,<sup>[7a]</sup> dient ein 3-Benzyloxyisoxazol als eine geschützte Form des dicht funktionalisierten A-Rings von Tetracyclin.

verschiedenartigen Mechanismen zugeschrieben:<sup>[1,2]</sup> 1) der Expression von Tetracyclin-Effluxproteinen, 2) der Expression von ribosomalen Schutzproteinen und 3) der enzymatischen Inaktivierung von Tetracyclin durch chemische Modifikation.

Die *tet*-Effluxgene, die sowohl in Gram-positiven als auch Gram-negativen Spezies gefunden werden, kodieren für membranassoziierte Proteine, die Tetracyclin aus der Zelle transportieren und dadurch die intrazelluläre Wirkstoffkonzentration verringern und das Ribosom schützen. Die Effluxproteine transportieren Tetracyclin-Kation-Komplexe durch Protonenaustausch in einem Konzentrationsgradienten

[\*] Dr. B. Heasley  
Scynexis, Inc.  
P. O. Box 12878, Research Triangle Park, NC 27709-2878 (USA)  
Fax: (+1) 919-544-8697  
E-Mail: brian.heasley@scynexis.com  
Homepage: <http://www.scynexis.com>

[\*\*] Ich danke Alan Long, Hyoung Ik Lee und Bharathi Pandi für aufschlussreiche Diskussionen. Graphiken: Michael J. Malaska. Hintergrundfoto: Public Health Image Library ID no. 9994 (CDC/Janice Haney Carr).

und weisen Sequenzhomologie zu anderen Effluxproteinen auf, die an Multiwirkstoffresistenzen beteiligt sind. Die meisten der Effluxproteine verleihen Resistenz gegen die Stammverbindung **1**, nicht aber gegen nachfolgende Generationen semisynthetischer Tetracycline.

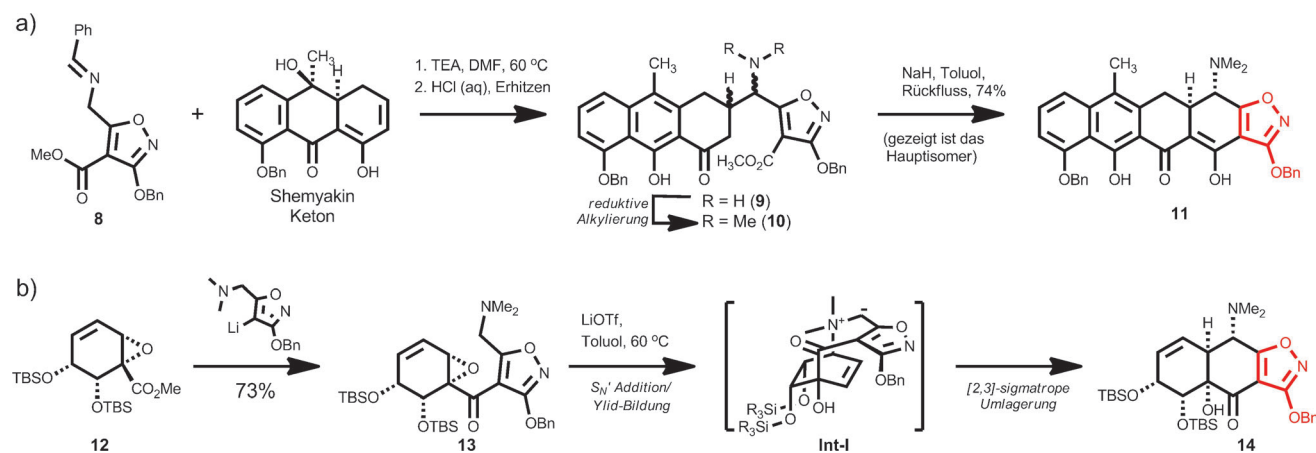
Ribosomale Schutzproteine erzeugen ein breiteres Spektrum an Resistenzen im Vergleich zu Efflux-basierten Mechanismen. Schutzproteine binden an das Ribosom und induzieren eine negative allosterische Modulation des Tetracyclinbindungszentrums, die die Bindungsaffinität des Ribosoms für Tetracyclin herabsetzt. Diese Bindungswechselwirkung greift allerdings nicht in die Proteinsynthese ein.

Der am wenigsten verbreitete Resistenzmechanismus bei pathogenen und Umweltbakterien ist die enzymatische Inaktivierung. TetX, eine 44 kDa große Flavin-abhängige Monooxygenase, ist das einzige bisher beschriebene Enzym, das Resistenz gegen Tetracycline verleiht. Es wirkt durch irreversible Hydroxylierung an C11a in der Gegenwart von NADPH und O<sub>2</sub>.<sup>[3]</sup> Das hydroxylierte Produkt ist unfähig, den Mg<sup>2+</sup>-Komplex zu bilden, was den Wirkstoff inaktiv macht.

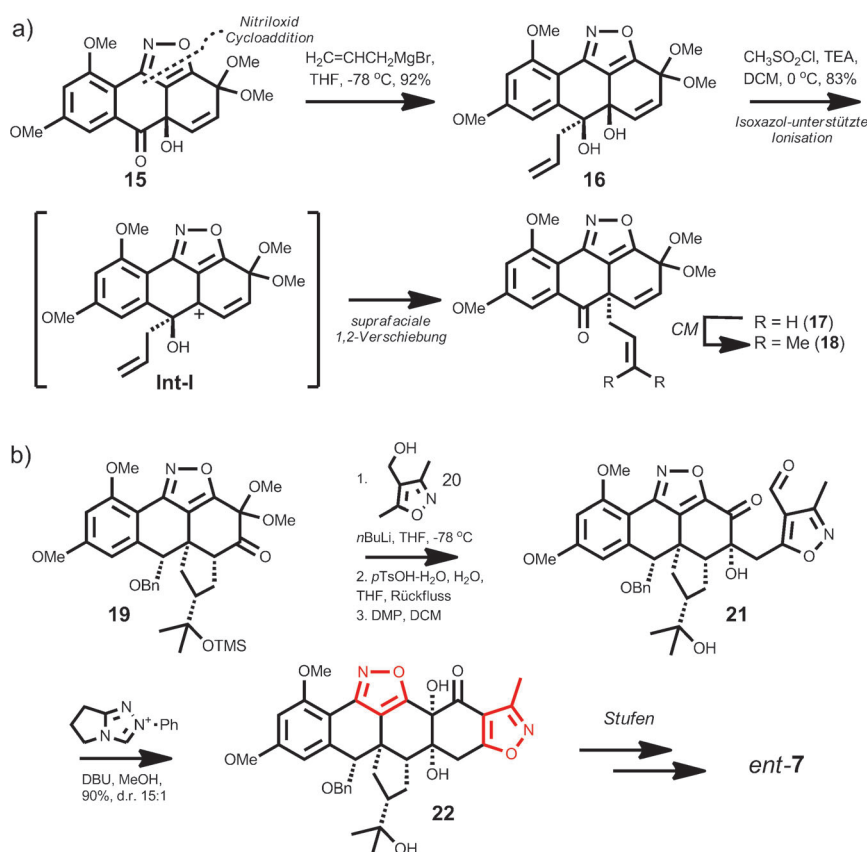
Die unaufhörliche genetische Adaption bei Pathogenen hat eine systematische Suche nach neuen Tetracyclin-Analoga ausgelöst, die gegen Organismen aktiv sind, die gegen ältere Verbindungen dieser Klasse Resistenzen entwickelt haben. Durch chemische Modifikation des Tetracyclingerüsts haben Medizinalchemiker in den letzten 40 Jahren versucht, Wirksamkeiten zu erhöhen und Resistenzen zu umgehen.<sup>[8]</sup> Ein wichtiger Ansatzpunkt war dabei die Gegenwart der stark aktivierenden C10-Phenolgruppe, die die chemoselektive Funktionalisierung des D-Rings erleichtert.<sup>[8a-c]</sup> Diese Strategie lieferte semisynthetische Tetracycline (**3–6**) mit verbesserter Aktivität gegen resistente Organismen. In jüngerer Zeit sind neue Synthesemethoden aufgetaucht, die Zugang zu einer breiten Spanne von Tetracyclin-Analoga bieten, die durch klassische Semisynthesen nicht erhältlich sind. Viele dieser Fortschritte in der Synthese beruhen auf der Verwendung eines Isoxazolmotivs als Gerüst für 1,3-Dicarbonylfunktionalitäten wie das  $\beta$ -Ketoamid-System des A-Rings von Tetracyclin.

Vor 33 Jahren zeigten Stork und Hagedorn, dass 3-Hydroxyisoxazole als Bausteine für den polaren und dicht funktionalisierten A-Ring des Tetracyclins eingesetzt werden können (Abbildung 1, Kasten).<sup>[7a]</sup> Bedeutsam war, dass die Entschützung der vinylogenen Carbaminsäure in einer späten Synthesestufe unter milden hydrogenolytischen Bedingungen erreicht werden konnte. Der wahre Wert dieser Entdeckung wurde allerdings erst 2005 erkannt, als Myers und Mitarbeiter die bis dahin kürzeste Synthese von **3** bewerkstelligten<sup>[9]</sup> und dabei Storks Strategie zur Schützung des A-Rings von Tetracyclin in Form einer 3-Benzyloxyisoxazolgruppe nutzten. Storks ursprüngliche Synthese des Tetracyclinsystems im Jahr 1978 (Schema 1 a)<sup>[7a]</sup> umfasste die Michael-Addition der Isoxazol-Schiff-Base **8** an Shemyakin-Keton<sup>[10]</sup> unter milden Bedingungen mit anschließender Dehydratisierung des C-Rings und reduktiver Methylierung. Eine Claisen-Cyclisierung unter basischen Bedingungen lieferte dann **11** mit C4,4a-*trans*-Konfiguration. Das Isoxazol **11** konnte anschließend durch eine einzelne Hydrogenolyseoperation in ein ( $\pm$ )-12a-Desoxyanhydrotetracyclin überführt werden (fünf lineare Schritte ausgehend von **8**).

Um die Hydroxygruppe in einer frühen Stufe an einer Verknüpfungsstelle der A- und B-Ringe (C12a) anzufügen, verwendeten Myers et al. eine neue Synthesesequenz<sup>[9]</sup> (Schema 1 b), bei der die vinyloge Carbaminsäure nach Storks<sup>[7a]</sup> Schutzgruppenstrategie maskiert wurde. Ein Organolithiumisoxazolreagens wurde zunächst mit dem Epoxyester **12** kondensiert, um das Isoxazolketon **13** zu erhalten. Als nächstes folgten eine (vermutete) intramolekulare S<sub>N</sub>'-Epoxidöffnung und eine Ylid-Bildung (**13**  $\rightarrow$  Int-I). Eine 2,3-sigmatrope Umlagerung schließt dann den A-Ring mit exzellenter Stereoselektivität des aminierten C4-Zentrums. Das Isoxazol **14** wird in fünf zusätzlichen Syntheseschritten zum AB-Enon als Schlüsselintermediat umgewandelt (nicht gezeigt), das auch in einer alternativen Route durch *endo*-selektive intramolekulare Furan-Diels-Alder-Cycloaddition im 40-g-Maßstab hergestellt worden ist.<sup>[11]</sup> Die AB-Vorstufe wurde in einer Michael-Claisen-Cyclocondensation zur Bildung des C-Rings umgesetzt,<sup>[9,12]</sup> und nach hydrogenolytischer Entschützung des A-Rings<sup>[7a]</sup> wurden natürliche Tetra-



**Schema 1.** a) Entscheidende Schritte der Stork'schen Synthese<sup>[7a]</sup> von ( $\pm$ )-12a-Desoxyanhydrotetracyclin ausgehend von einem 3-Benzyloxyisoxazol (**8**). b) Myers' Synthese<sup>[9]</sup> eines Schlüsselintermediats (**14**) im Verlauf der Totalsynthese von Tetracyclinderivaten.



**Scheme 2.** a) Isoxazol-gelenkte Pinakol-Umlagerung<sup>[14]</sup> zur stereospezifischen Einführung eines angulären Prenylsubstituenten an Seragakinon A (**7**).<sup>[15]</sup> b) Stereoselektive Benzoin-Kondensation (**21**→**22**) und Schützung zweier  $\beta$ -Diketon-Einheiten als Isoxazol (**22**, rot).

cycline sowie neue Tetracyclin-Analoga in hoch konvergenter Weise erhalten. Die Analyse von Myers und Mitarbeitern, dass der C-Ring des Tetracyclins eine geeignete retrosynthetische Schnittstelle ist, führte zu kurzen Synthesen von **1**,<sup>[13]</sup> 6-Desoxytetracyclinen (einschließlich **3**),<sup>[9]</sup> 6-Aryltetracyclinen,<sup>[12]</sup> Pentacyclinen<sup>[8c,9,12]</sup> und 8-Azatetracyclinen,<sup>[8d]</sup> um nur einige zu nennen.

Suzuki und Mitarbeiter berichteten kürzlich über die Totalsynthese des Naturstoffs (–)-Seragakinon A (**ent-7**),<sup>[16]</sup> einem antifungalen und antibakteriellen Polyketid<sup>[15]</sup> mit struktureller Ähnlichkeit zur Tetracyclinfamilie. Suzukis Synthesestrategie (Schema 2) nutzt die Isoxazolteilstruktur sowohl als geschütztes 1,3-Diketon-Äquivalent<sup>[7a]</sup> als auch als dirigierende Gruppe zum stereokontrollierten Aufbau eines quartären Kohlenstoffzentrums.<sup>[14]</sup> Zum Beispiel bewirkt die Behandlung des allylierten Derivats **16** mit Sulfen die Ionisation des tertiären Brückenkopfalkohols, wobei der elektronenreiche Isoxazolring das Kation stabilisiert (**Int-I**) und auf diese Weise die regioselektive Aktivierung des Pinakols (**16**) ermöglicht wird. Eine schnelle 1,2-Verschiebung ( $t < 10$  min) der Allylgruppe erzeugt das Keton **17**, das einen angulären Allylsubstituenten trägt, in Form eines einzigen Stereoisomers.<sup>[14,16]</sup> Eine zweite Isoxazoleinheit wird in einer späteren Synthesestufe durch nucleophile Addition des vom Isoxazol **20** abgeleiteten, lithiierten O,C-Dianions an das Keton **19** eingeführt (Schema 2b). Das dabei entstehende Alkoholintermediat wurde in zwei zusätzlichen Schritten in

den Ketoaldehyd **21** überführt. Eine stereokontrollierte Benzoin-Cyclisierung unter Einsatz von modifiziertem Rovis-Triazoliumsalz<sup>[17]</sup> liefert dann das cyclische Ketol **22** mit ausgezeichneter Diastereoselektivität. Eine Hydrierung führt zur reduktiven Spaltung der beiden Isoxazolringe unter Freisetzung der latenten 1,3-Diketonfunktionalität. Das entstehende Zwischenprodukt wurde anschließend in das (–)-Seragakinon A überführt.<sup>[16]</sup>

Noch im Jahr 2011<sup>[8d,e,16,18]</sup> „dienen Isoxazole dem Zweck der Speicherung des  $\beta$ -Ketoamidsystems des A-Rings von Tetracyclinen“, wie es Stork 1978 vorhersagte.<sup>[7a]</sup> Darüber hinaus erwiesen sich Isoxazole als außerordentlich gut geeignet, um regio- und stereoselektive 1,2-Wanderungen zu dirigieren, indem sie die Bildung eines benachbarten Carbeniumions erleichtern. Dieses Konzept erbrachte eine allgemeine Methode für den Aufbau von stereogenen Zentren in angulären Positionen,<sup>[14]</sup> was durch konventionelle Strategien nicht einfach zu bewerkstelligen ist. Diese wichtigen Technologien haben das Potenzial, neue Antibiotika hervorzubringen, die bestehende Bakterienresistenzen überwinden.

Eingegangen am 11. April 2011  
Online veröffentlicht am 29. Juni 2011

[1] I. Chopra, M. Roberts, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2001**, 65, 232–260.

- [2] B. Zakeri, G. D. Wright, *Biochem. Cell Biol.* **2008**, *86*, 124–136.
- [3] K. C. Nicolaou, J. S. Chen, D. J. Edmonds, E. A. Estrada, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 670–732; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 660–719.
- [4] Eine aktuelle Diskussion der Mechanismen, die die antimikrobiellen Eigenschaften von Tetracyclinverbindungen stören: M. O. Griffin, G. Ceballos, F. J. Villarreal, *Pharm. Res.* **2011**, *63*, 102–107.
- [5] C. Khosla, Y. Tang, *Science* **2005**, *308*, 367–368.
- [6] Zum Mechanismus der antibiotischen Wirkung von Tetracyclin auf die ribosomale 30S-Untereinheit: D. E. Brodersen, W. M. Clemons, Jr., A. P. Carter, R. J. Morgan-Warren, B. T. Wimberly, V. Ramakrishnan, *Cell* **2000**, *103*, 1143–1154.
- [7] a) G. Stork, A. A. Hagedorn III, *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, *100*, 3609–3611; b) G. Stork, J. J. La Clair, P. Spargo, R. P. Nargund, N. Totah, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 5304–5305.
- [8] a) P.-E. Sum, V. J. Lee, R. T. Testa, J. J. Hlavka, G. A. Ellestad, J. D. Bloom, Y. Gluzman, F. P. Tally, *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 184–188; b) P.-E. Sum, P. Petersen, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9*, 1459–1462; c) P.-E. Sum, A. T. Ross, P. J. Petersen, R. T. Testa, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 400–403; d) R. B. Clark, M. He, C. Fyfe, D. Lofland, W. J. O'Brien, L. Plamondon, J. A. Sutcliffe, X.-Y. Xiao, *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 1511–1528; e) C. Sun, D. K. Hunt, R. B. Clark, D. Lofland, W. J. O'Brien, L. Plamondon, X.-Y. Xiao, *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 3704–3731, zit. Lit.
- [9] M. G. Charest, C. D. Lerner, J. D. Brubaker, D. R. Siegel, A. G. Myers, *Science* **2005**, *308*, 395–398.
- [10] a) M. N. Kolosov, S. A. Popravko, M. M. Shemyakin, *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1963**, *668*, 86; b) B.-M. G. Gaveby, J. C. Huffmann, P. Magnus, *J. Org. Chem.* **1982**, *47*, 3779–3780.
- [11] J. D. Brubaker, A. G. Myers, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 3523–3525.
- [12] C. Sun, Q. Wang, J. D. Brubaker, P. M. Wright, C. D. Lerner, K. Noson, M. Charest, D. R. Siegel, Y.-M. Wang, A. G. Myers, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 17913–17927.
- [13] M. G. Charest, D. R. Siegel, A. G. Myers, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 8292–8293.
- [14] K. Suzuki, H. Takikawa, Y. Hachisu, J. W. Bode, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 3316–3318; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 3252–3254.
- [15] K. Komatsu, H. Shigemori, M. Shiro, J. Kobayashi, *Tetrahedron* **2000**, *56*, 8841–8844, zit. Lit.
- [16] A. Takada, Y. Hashimoto, H. Takikawa, K. Hikita, K. Suzuki, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 2345–2349; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 2297–2301.
- [17] M. S. Kerr, J. R. deAlaniz, T. Rovis, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 10298–10299.
- [18] Eine erst kürzlich vorgestellte Eintopfsynthese von 3-substituierten Isoxazol-4-carbaldehyden: J. A. Burkhard, B. H. Tchitchanov, E. M. Carreira, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 5491–5495; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 5379–5382.