

(19)



österreichisches
patentamt

(10)

AT 507 298 A4 2010-04-15

(12)

Österreichische Patentanmeldung

(21) Anmeldenummer: **A 842/2009**

(22) Anmeldetag: **29.05.2009**

(43) Veröffentlicht am: **15.04.2010**

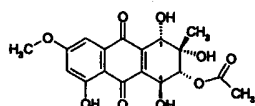
(51) Int. Cl.⁸: **C07C 50/18** (2006.01),
C07C 46/10 (2006.01),
A61K 31/122 (2006.01)

(73) Patentinhaber:

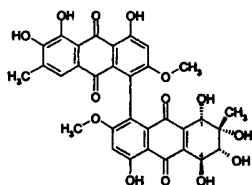
SEALIFE PHARMA GMBH
A-3430 TULLN (AT)

(54) NEUE ANTHRACHINON-DERIVATE

(57) Die Erfindung betrifft zwei neue Substanzen, nämlich (1 S,2S,3R,4S)-3-Acetoxy-1,2,4,5-tetrahydroxy-7-methoxy-2-methyl-1,2,3,4-tetrahydroanthracen-9,10-dion (Altersolanol M)



und 8-(4,5,6-Trihydroxy-7-methyl-2-methoxy-9,10-dioxo-9H,10H-anthracen-1-yl)-(1 S,2S,3R,4S)-1,2,3,4,5-pentahydroxy-7-methoxy-2-methyl-1,2,3,4-tetrahydro-9H,10H-anthracen-9,10-dion (Atropisomere Altersporriol I und J)



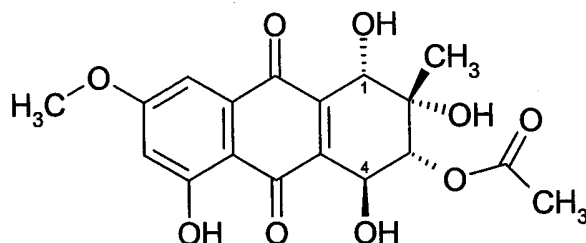
deren Verwendung als Antiinfektiva sowie ein Herstellungsverfahren dafür.

AT 507 298 A4 2010-04-15

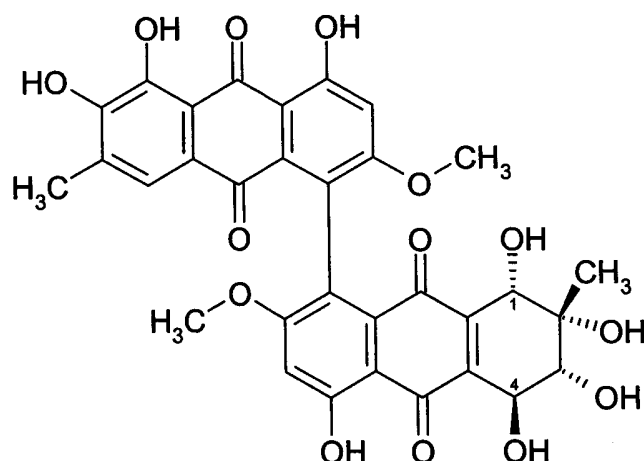
005511

ZUSAMMENFASSUNG

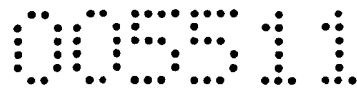
Die Erfindung betrifft zwei neue Substanzen, nämlich (1S,2S,3R,4S)-3-Acetoxy-1,2,4,5-tetrahydroxy-7-methoxy-2-methyl-1,2,3,4-tetrahydroanthracen-9,10-dion (Altersolanol M)



und 8-(4,5,6-Trihydroxy-7-methyl-2-methoxy-9,10-dioxo-9H,10H-anthracen-1-yl)-(1S,2S,3R,4S)-1,2,3,4,5-pentahydroxy-7-methoxy-2-methyl-1,2,3,4-tetrahydro-9H,10H-anthracen-9,10-dion (Atropisomere Alterporriol I und J)



deren Verwendung als Antiinfektiva sowie ein Herstellungsverfahren dafür.



Die vorliegende Erfindung betrifft neue Anthrachinon-Derivate, ein Verfahren zu deren Herstellung sowie deren Verwendung als Antiinfektiva, vor allem gegen mehrfach wirkstoffresistente Erreger.

STAND DER TECHNIK

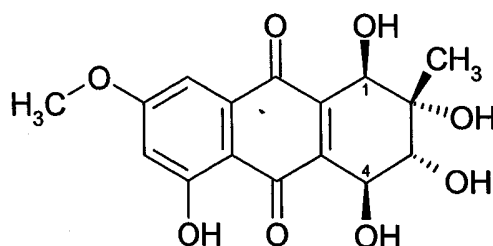
Durch den höchst erfolgreichem Einsatz antimikrobieller Arzneimittel wurde in den späten 1960er- und frühen 1970er-Jahren angenommen, dass Infektionskrankheiten fortan keine Gefahr mehr darstellen würden. Dies sollte sich als schwerer Irrtum herausstellen, zumal die Mikroben 40 Jahre danach eine größere Bedrohung als jemals zuvor darstellen, weswegen ein dringender Bedarf an neuen antimikrobiellen Wirkstoffen besteht. Heutzutage sind Infektionskrankheiten die dritthäufigste Todesursache in den USA und die zweithäufigste weltweit. Für die meisten dieser Fälle sind unwirksame antimikrobielle Arzneimittel verantwortlich, und die Resistenz mancher Bakterien und Pilze gegen diese Wirkstoffe stellt in unserer Gesellschaft ein ernstes Problem dar. Statistischen Daten aus den USA zufolge wird der Großteil der im Krankenhaus erlittenen Infektionen (den sog. nosokomialen Infektionen) von wenigen Bakterienspezies hervorgerufen, nämlich von *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Enterobacter sp.*, die nach ihren Anfangsbuchstaben als "ESKAPE"-Pathogene bezeichnet werden (Boucher et al., "IDSA Report on Development Pipeline", CID 2009:48, Infectious Disease Society of America, 1. Januar 2009). Mit diesem Begriff soll freilich gleichzeitig ausgedrückt werden, dass sich diese resistenten Erreger der Wirkung antibakterieller Arzneimittel entziehen (engl.: *to escape*), zumal Antibiotikaresistenz auf molekularer Ebene nichts anderes bedeutet als, dass ein Mikroorganismus die Fähigkeit erlangt hat, sich der wachstumshemmenden oder bakteriziden Wirkung einer antimikrobiellen Substanz zu widersetzen. Das heißt, die Substanz wird klinisch unwirksam. So bedeutet etwa "methicillinresistenter *Staphylococcus aureus*" (auch als MRSA abgekürzt, wiewohl dieselbe Abkürzung auch in allgemeinerer Weise für "multiresistenten *Staphylococcus aureus*" gebraucht wird), dass die Verwendung von β -Lactamen in der Therapie von *S. aureus* unwirksam ist, während beispielsweise Glykopeptide zumeist Wirkung zeigen. Es ist daher unbedingt erforderlich die Wirkung von neuen Antiinfektiva gegen multiresistente Stämmen zu testen,

da Wirksamkeit gegen dafür empfindliche Spezies oder Stämme nicht zwangsläufig auch Wirksamkeit gegen multiresistente Bakterien bedeutet, wie auch beispielsweise ein gegen grampositive Bakterien wirksames Mittel nicht notwendigerweise gegen gramnegative Bakterien wirkt oder umgekehrt (siehe u.a. Boucher et al., s.o.).

Neben Bakterien und Pilzen fehlen gegenwärtig aber auch wirksame Strategien gegen respiratorische Viren. Zumeist werden lediglich die Symptome geheilt, ohne das Virus selbst zu bekämpfen. Eine Lösung für die Zukunft könnten vor allem Wirkstoffkombinationen sein.

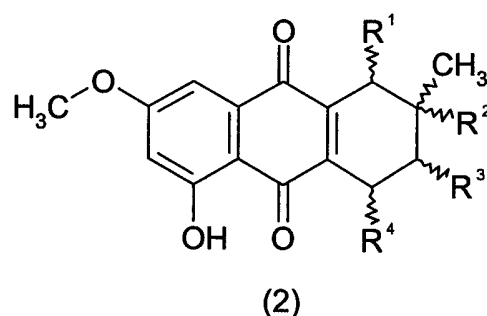
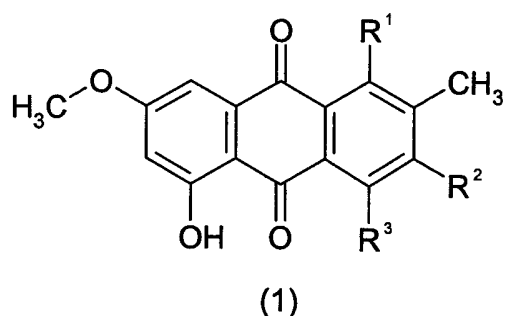
In der Vergangenheit wurden in endophytischen Pilzen zahlreiche Substanzen zur Bekämpfung der Vermehrung von Mikroorganismen gefunden. Diese Substanzen zeigen in einer Reihe von Fällen sehr gute antibakterielle, antifungale und antivirale Aktivität und könnten für zahlreiche Anwendungen eingesetzt werden (G. A. Strobel, Crit. Rev. Biotechnol. 22, 315-333 (2002)). Aufgrund der Tatsache, dass diesbezügliche Forschung überwiegend akademisch war und nicht direkt die Entwicklung neuer Wirkstoffe zum Ziel hatte, sind heute kaum entsprechende Arzneimittel auf dem Markt. Insbesondere das Screenen gegen resistente Mikroben wurde in der Vergangenheit vernachlässigt, so dass nur einige wenige Substanzen gegen arzneimittelresistente Mikroben getestet wurden. Noch schlimmer ist die Lage bei respiratorischen Viren, gegen die bisher nahezu keine Substanzen gescreent wurden.

Bereits im Jahre 1969 beschrieb A. Stoessl, Can. J. Chem. 47, 767 (1969), die Isolierung eines neuen metabolischen Pigments aus *Alternaria solani*, einem Schimmelpilz, der die sog. Dürrfleckenkrankheit bei Kartoffeln hervorruft. Dieses Pigment wurde Altersolanol A genannt und seine Struktur wie folgt identifiziert:



Der chemische Name dieses Anthrachinons lautet demnach 7-Methoxy-2-methyl-(1*R*,2*S*,3*R*,4*S*)-1,2,3,4-tetrahydro-1,2,3,4,5-pentahydroxyanthracen-9,10-dion.

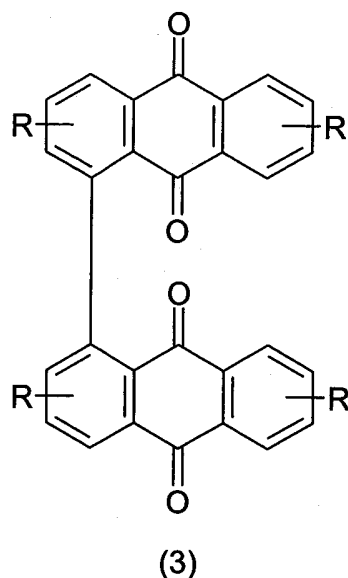
In weiterer Folge wurde dieses Pigment sowie mehrere Isomere und Derivate davon auch in weiteren *Alternaria*-Spezies (z.B. *Alternaria porri*) und in manchen anderen Pilzgattungen nachgewiesen (siehe beispielsweise R. Suemitsu et al., Agric. Biol. Chem. 45(10), 2363-2364 (1981)). Die Mehrzahl der Isomere und Derivate entspricht den folgenden allgemeinen Formeln (1) oder (2):



wobei R^1 bis R^4 jeweils H oder OH sein können, was im Falle von OH in Formel (2) jeweils ein chirales Kohlenstoffatom ergibt, das sowohl in *R*- als auch in *S*-Konfiguration vorliegen kann.

In weiterer Folge wurden auch Dimere, d.h. Bisanthrachinone, als Metaboliten entdeckt, und das erstmals in *Alternaria porri*, einem weiteren Vertreter der Gattung der *Alternariae*, der u.a. die Purpurfleckenkrankheit bei Zwiebelgemüse hervorruft, weswegen diese Dimere Alterporriole genannt wurden. Sie entsprechen beispielsweise der folgenden Formel (3):

005511



wobei ähnlich vielfältige Substitutions- und Hydrierungsmuster an den aromatischen Ringen möglich sind wie für die "monomeren" Altersolanole. Aufgrund eingeschränkter Freiheit der Rotation um die Achse der chemischen Bindung zwischen den Anthrachinon-Kernen liegen zahlreiche Alterporriol-Derivate in Form zweier Atropisomere vor.

Für manche als Altersolanole bzw. Alterporriole bezeichnete Verbindungen existieren Berichte über ihre Wirksamkeit gegen bestimmte Mikroorganismen, während andere als nicht antiinfektiv beschrieben wurden. So wurden etwa von Aly et al., *Phytochemistry* 69, 1716-1725 (2009), bioaktive Metaboliten endophytischer Pilze der Gattung *Ampelomyces* sowie deren antiinfektive Wirkung untersucht. Dabei wurde unter anderem festgestellt, dass Altersolanol J, die Alterporriole D und E (Atropisomere), sowie die mit Altersolanolen eng verwandte Verbindung Ampelanol keine Aktivität gegen Bakterien und Pilze zeigen, während Altersolanol A die wirksamste der getesteten Substanzen war. Weiters offenbaren beispielsweise Okamura et al., *Phytochemistry* 42(1), 77-80 (1996), keinerlei Wirkung von Tetrahydroaltersolanol B gegen grampositive Bakterien und die gramnegative Spezies *Pseudomonas aeruginosa*. Und Yagi et al., *Phytochemistry* 34(4), 1005-1009 (1993), berichten über die antimikrobielle Aktivität der Altersolanole A, B, C und E, während die Altersolanole D, E und F in demselben Test völlig unwirksam waren. In der US-Patentanmeldung Nr.

2007/258913 werden die atropisomeren Altersolanole D und E hingegen, wenn auch nur ganz allgemein, als geeignete Verbindungen zur Verhinderung der Bildung eines Biofilms in der Mundhöhle offenbart, ohne allerdings konkrete Daten bezüglich ihrer Wirksamkeit anzugeben.

Somit ist es jedenfalls unmöglich vorherzusagen, ob ein bestimmtes Altersolanol- bzw. Alterporriol-Isomer oder -Derivat antiinfektive Wirkung zeigt oder nicht, geschweige denn gegen welche Gattungen oder gar Spezies von Mikroorganismen.

Das Ziel der Erfindung war vor diesem Hintergrund die Identifikation, Isolierung und Herstellung neuer Substanzen zur Verwendung als antiinfektive Wirkstoffe in pharmazeutischen Zusammensetzungen, vor allem von Verbindungen, die Aktivität gegen mehrfach wirkstoffresistente ("multiple drug resistant", MDR-) Erreger zeigen.

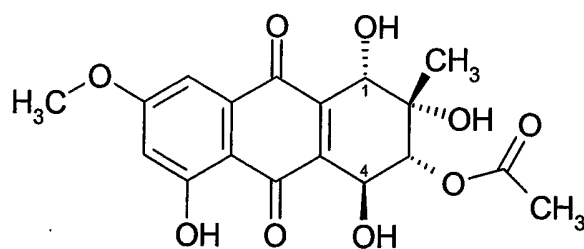
Die Erfinder konnten nun im Verlauf ihrer Forschungen mehrere Substanzen – zum Teil mit bisher unveröffentlichter Struktur, d.h. neue chemische Verbindungen – identifizieren, die gute Aktivität gegen Mikroorganismen, aber auch gegen respiratorische Viren, insbesondere auch gegen MDR-Erreger, zeigen. Während in der parallelen, gleichzeitig eingereichten österreichischen Patentanmeldung mit der Anmeldenummer A/09 die Verwendung mehrerer Verbindungen mit bekannter Struktur, aber bislang unbekannter Wirksamkeit verfolgt werden, bezieht sich die vorliegende Erfindung auf die Bereitstellung zweier neuer Verbindungen, nämlich jeweils eines Altersolanol- und eines Alterporriol-Derivats.

OFFENBARUNG DER ERFINDUNG

Konkret haben die Erfinder die folgenden neuen chemischen Verbindungen hergestellt, isoliert und charakterisiert:

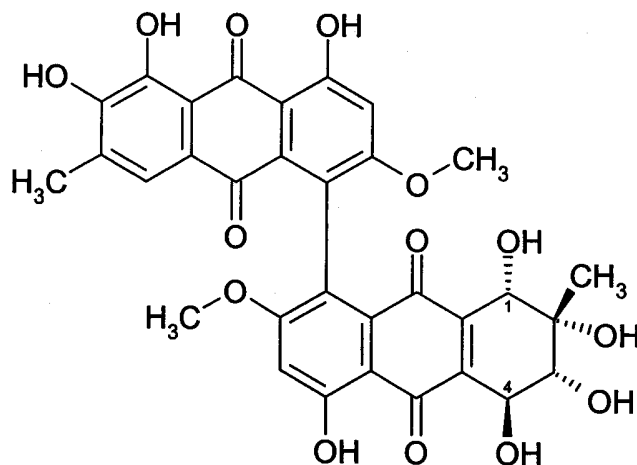
(1S,2S,3R,4S)-3-Acetoxy-1,2,4,5-tetrahydroxy-7-methoxy-2-methyl-1,2,3,4-tetrahydroanthracen-9,10-dion der Formel (4), das von den Erfindern als Altersolanol M bezeichnet wurde:

005511



(4)

sowie 8-(4,5,6-Trihydroxy-7-methyl-2-methoxy-9,10-dioxo-9H,10H-anthracen-1-yl)-(1S,2S,3R,4S)-1,2,3,4,5-pentahydroxy-7-methoxy-2-methyl-1,2,3,4-tetrahydro-9H,10H-anthracen-9,10-dion der Formel (5), das in Form zweier Atropisomere existiert, die von den Erfindern als Alterporriole I und J bezeichnet wurden:



(5)

Da beide Verbindungen (4) und (5) in Screening-Versuchen ausgezeichnete antimikrobielle und antivirale Wirkung zeigen, besteht ein zweiter Aspekt der Erfindung in der Verwendung dieser neuen Verbindungen als Antiinfektiva, vorzugsweise gegen grampositive und gramnegative Bakterien, Pilze und respiratorische Viren, und insbesondere als Antiinfektiva gegen mehrfach wirkstoffresistente ("multiple drug resistant", MDR-) Erreger.

Speziell werden die Verbindungen vorzugsweise gegen mehrfach wirkstoffresistente Stämme von methicillinresistentem *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Staphylococcus*

epidermis, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus faecalis* bzw. *faecium*, *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Aspergillus* sp. sowie gegen respiratorische Viren aus der Gruppe der humanen Rhinoviren und der respiratorischen Synzytial-Viren eingesetzt, was durch die späteren Ausführungsbeispiele im Detail belegt wird.

Die vorliegende Erfindung betrifft schließlich auch ein Verfahren zur Herstellung der Verbindungen der Formeln (4) und (5), das darin besteht, einen die Verbindung oder einen Vorläufer davon produzierenden Mikroorganismus unter Wachstumsbedingungen zu fermentieren und die jeweilige Verbindung, gegebenenfalls nach Zerstörung der Zellen des Mikroorganismus zur Erhöhung der Ausbeute, aus der Kultur zu gewinnen. In einem solchen Fermentationsverfahren wird als Mikroorganismus vorzugsweise ein reiner Stamm von *Stemphylium globuliferum* eingesetzt, da die Erfinder mit dieser Spezies die besten Ausbeuten erzielen konnten. Alternativ dazu können jedoch auch beliebige andere Mikroorganismen, die in der Lage sind, die neuen Verbindungen – oder auch Vorstufen davon – zu produzieren, z.B. *Alternaria* sp., zur Fermentation eingesetzt werden. Werden durch die Fermentation Vorstufen erhalten, können diese nach beliebigen, dem einschlägigen Fachmann auf dem Gebiet der organischen Synthese wohlbekannten Verfahren in die gewünschten neuen Verbindungen der Formeln (4) und (5) übergeführt werden, wobei gegebenenfalls auch Verfahrensschritte unter Enzymkatalyse eingesetzt werden können, um höhere Enantioselektivität zu gewährleisten.

Beispielsweise kann etwa *Alternaria* sp. kultiviert werden, um aus der Fermentationsbrühe Altersolanol A – oder auch ein anderes Mitglied der Altersolanol-Familie – zu erhalten, das durch Acetylierung der OH-Gruppe an C3 (gegebenenfalls unter Schützen der übrigen OH-Gruppen mit herkömmlichen Schutzgruppen) in Altersolanol M oder ein Stereoisomer davon übergeführt werden kann. Ein weiterer Syntheseweg besteht in der Abspaltung der OH-Gruppe an C3 oder C4 zusammen mit dem benachbarten Wasserstoffatom, d.h. Dehydratisierung, um eine Doppelbindung zwischen C3 und C4 und zwei prochirale Zentren an diesen Positionen zu erhalten. Anschließend kann diese Doppelbindung enzymatisch rehydratisiert werden, was bei

geeigneter Wahl der Stereospezifität des Enzyms (z.B. Hydratase, Peroxygenase) das gewünschte Altersolanol M ergibt. Die Alterporriole I und J können beispielsweise auch durch chemische (z.B. enzymatische) Anbindung des entsprechenden Anthrachinon-Substituenten an Position 8 von Altersolanol M erhalten werden, das gegebenenfalls davor geeignet derivatisiert wurde, wonach die Acetylgruppe von der OH-Gruppe an Position 3 hydrolytisch abgespalten wird.

Geeignete Enzyme für die Syntheseschritte zur Umsetzung von Vorläufern der gewünschten Verbindung können in manchen Fällen ebenfalls aus dem zur Fermentation eingesetzten oder auch aus einem anderen Mikroorganismus isoliert werden. Letzterer Fall kann sinnvoll sein, wenn beispielsweise ein Mikroorganismus zwar das gewünschte Produkt produziert, aber z.B. in so geringen Mengen oder so stark verunreinigt, dass es wirtschaftlicher ist, durch Kultivierung eines anderen Stamms (oder sogar einer anderen Spezies oder Gattung) einen Vorläufer des Produkts zu erhalten und diesen mittels enzymatischer Synthese zur Zielverbindung umzusetzen.

Die Gewinnung der jeweiligen Verbindung (4) oder (5) erfolgt gemäß vorliegender Erfindung jedoch vorzugsweise durch Extraktion und anschließende Isolierung aus einem Rohextrakt einer Kultur, z.B. mittels fraktionierter Kristallisation oder Chromatographieverfahren, noch bevorzugter präparativer HPLC, was bisher erneut die besten Ausbeuten bei gleichzeitig höchster Reinheit ergeben hat. Freilich sind speziell bei Ansätzen in größerem Maßstab auch andere Isolierungsverfahren, wie z.B. direkte fraktionierte Kristallisation des Rohextrakts oder auch Absorptionsmethoden, denkbar. Der Fachmann kann jedoch ohne übermäßiges Experimentieren das für den jeweiligen Kultivierungs- (bzw. Synthese- oder Partialsynthese-) Schritt geeignete Isolierungsverfahren ermitteln.

BEISPIELE

Die Erfindung wird nachstehend unter Bezugnahme auf konkrete Ausführungsbeispiele näher beschrieben, die jedoch den Schutzzumfang nicht einschränken sollen.

Die neuen Verbindungen der Erfindung wurden durch Kultivierung von *Stemphylium globuliferum* und anschließende Extraktion erhalten.

Isolierung des Mikroorganismus

Frische, gesunde Stängel von *Mentha pulegium* (Polei-Minze) wurden zur Isolierung des endophytischen Pilzes verwendet. Die Oberfläche der Stängel wurde mit 70%-igem Ethanol 1 min lang sterilisiert und danach mit sterilem Wasser abgespült, um den Alkohol zu entfernen. Zur Unterscheidung etwaiger verbliebener epiphytischer Pilze von endophytischen Pilzen wurde ein Abdruck der Stängeloberfläche auf Bio-malzagat angefertigt. Kleine Gewebeproben aus dem Inneren wurden aseptisch aufgeschnitten und auf Agarplatten gepresst, die zur Unterdrückung von bakteriellem Wachstum ein Antibiotikum enthielten. Die Zusammensetzung des Isoliermediums war folgende: 15 g/l Malzextrakt, 15 g/l Agar und 0,2 g/l Chloramphenicol in destilliertem Wasser, pH 7,4-7,8). Aus den Kulturen wurde durch wiederholtes Überimpfen auf Malzagatplatten ein reiner Pilzstamm erhalten.

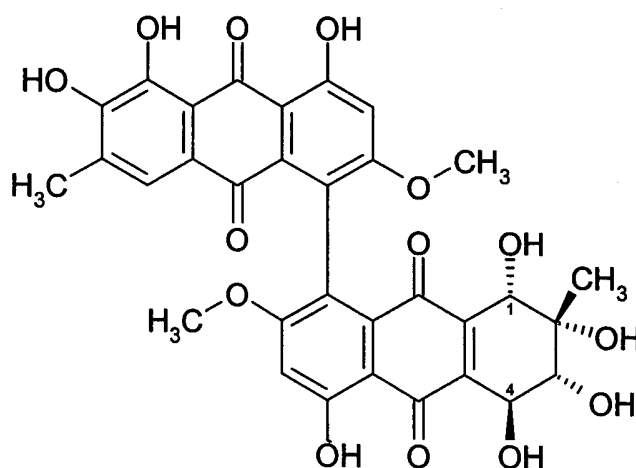
Die Pilzkultur wurde nach einer molekularbiologischen Vorschrift mittels DNA-Amplifikation und Sequenzierung der ITS-Region als *Stemphylium globuliferum* identifiziert. Die Sequenzdaten wurden bei GenBank unter der Zugriffsnummer EU859960 hinterlegt.

Kultivierung

Zur Kultivierung von *Stemphylium globuliferum* wurden zwei 1-Liter-Erlenmeyer-Kolben, die jeweils 100 g Reis und 100 ml destilliertes Wasser enthielten, autoklaviert, um ein gequollenes, festes Reismedium zu erhalten. Ein kleiner Teil des obigen Isoliermediums, das den reinen Pilzstamm enthielt, wurde unter sterilen Bedingungen auf das feste Reismedium aufgebracht, und der Pilz wurde bei Raumtemperatur (22 °C) 40 d lang kultiviert.

Extraktion und Isolierung

Nach 40 d wurde die Kultur zweimal mit 300 ml Ethylacetat (EtOAc) extrahiert. Der EtOAc-Extrakt wurde mit Wasser ausgeschüttelt. Die wässrige Phase wurde bis zur Trockene eingedampft, und der Rückstand wurde zunächst Säulenchromatographie über eine Sephadex LH-20-Säule mit 100%igem Methanol (MeOH) als Laufmittel unter Detektion mittels Dünnschichtchromatographie (DC) auf Kieselgel F245 (Merck, Darmstadt, Deutschland) unter Verwendung von EtOAc/MeOH/H₂O (77:13:10) als Laufmittel unterzogen. Die die gewünschten Verbindungen enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt und semipräparativer HPLC (Merck, Hitachi L-7100) unter Verwendung einer Eurosphere 100-10 C18-Säule (300 x 8 mm, L x i.d.) und eines linearen Wasser-Methanol-Gradienten unterzogen. Auf diese Weise wurden die neuen Verbindungen der Erfindung, d.h. (1S,2S,3R,4S)-3-Acetoxy-1,2,4,5-tetrahydroxy-7-methoxy-2-methyl-1,2,3,4-tetrahydroanthracen-9,10-dion (Altersolanol M) und 8-(4,5,6-Trihydroxy-7-methyl-2-methoxy-9,10-dioxo-9H,10H-anthracen-1-yl)-(1S,2S,3R,4S)-1,2,3,4,5-pentahydroxy-7-methoxy-2-methyl-1,2,3,4-tetrahydro-9H,10H-anthracen-9,10-dion (Atropisomere Alterporriol I und J) in reiner Form erhalten, wobei die Atropisomere Alterporriol I und J jedoch nicht getrennt werden konnten.

Analytik**Alterporriol I und J**

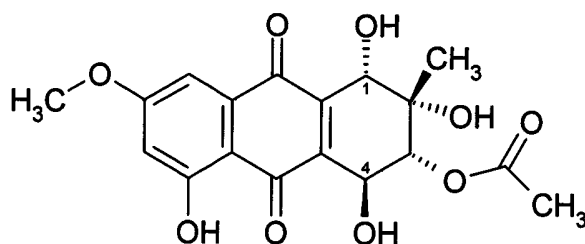
Aus dem HRESI-MS-Spektrum von Alterporriol I und J ergibt sich das Molekülion bei m/z 635,1406 $[M+1]^+$, woraus die Summenformel $C_{32}H_{26}O_{14}$ und 20 % Unsattheit folgen. Die Daten der 1H - und ^{13}C -NMR-Spektren sowie des ESI/MS-Spektrums (m/z 634,9 $[M+H]^+$) ähneln jenen der bekannten artverwandten Anthrachinone Altersolanol A und 6-O-Methylalaternin. Die Art der Bindung zwischen den beiden Anthrachinon-Einheiten ergibt sich aus Interpretation der COSY- und HMBC-Spektren und Vergleich mit NMR-Daten der Verbindungen Altersolanol A und 6-O-Methylalaternin. Das in nachstehender Tabelle 1 angegebene 1H -NMR-Spektrum zeigt Signale von zwei tertiären Methylgruppen bei δ 1,110 (CH_3 -3') und 1,114 (CH_3 -3*), zwei aromatischen Methylgruppen bei δ 2,17 (CH_3 -3) und δ 2,16 (CH_3 -3*), und vier Methoxygruppen, die teilweise überlappen und bei δ 3,68, 3,70 und 3,71 (aus dem Integral abgeleitet) schwingen. Zusätzlich sind überlappende Singulets bei δ 4,04 (H -4'/ H -4*), überlappende Dubletts bei δ 4,45 (H -1'/ H -1*) und überlappende Dubletts bei δ 3,54 (H -2'/ H -2*) zu beobachten. Der aromatische Bereich zeigt fünf Protonenresonanzen bei δ 7,40, 6,94, 6,93, 6,91 und 6,90. Weiters sind im 1H -NMR von Alterporriol keine *meta*-koppelnden Protonen zu erkennen. Das COSY-Spektrum zeigt jedoch klar Fernkorrelationen zwischen CH_3 -3 und H -4, was belegt, dass die 6-O-Methylalaternin-Gruppierung entweder bei C-5 oder C-7 an die Altersolanol A-Gruppierung gebunden ist. Die Interpretation des ebenfalls in Tabelle 1 angeführten HMBC-Spektrums ergibt, dass das bei δ 6,93 / δ 6,94 beobachtete aromatische Proton (H -7/ H -7*) eine starke Korrelation mit zwei sauerstofftragenden Kohlenstoffatomen bei δ 165,1 und 165,6 (C-6 und C-8) aufweist. Das bei δ 6,90 / δ 6,91 schwingende aromatische Proton (H -7'/ H -7'*) korreliert mit zwei sauerstofftragenden Kohlenstoffatomen bei δ 164,2 und 164,3 (C-6' und C-8'), was C-5 als Verbindungsstelle zwischen den beiden Monomeren anzeigt.

Weiters zeigt die Interpretation des HMBC-Spektrums in Tabelle 1, dass H -4 mit C-10 (δ 180,4), C-9a (δ 129,0) und C-2 (δ 150,9) korreliert, während H -7/7* mit C-5 (δ 123,0) und C-8a (δ 109,3) korreliert. Darüber hinaus wurden starke Korrelationen für H -7' mit den Kohlenstoffatomen C-6', C-8' (δ 164,2, 164,3), C-5' (δ 123,1), C-8a' (δ 109,7) und der Ketogruppe an C-9' (δ 188,8) festgestellt, letztere aufgrund von W-Kopplung.

Zur Bestimmung der relativen Konfiguration von Alterporriol I und J im aliphatischen Ring wurde eine ROESY-Messung durchgeführt. Das Signal von $\text{CH}_3\text{-3'}$ zeigt hierbei starke Korrelationen mit H-2' , H-4' , OH-2' und OH-4' , was anzeigt, dass $\text{CH}_3\text{-3'}$ äquatorial vorliegt. Weiters korreliert Proton H-4' mit Proton H-2' , wobei Letzteres in diaxialer Beziehung mit H-1' steht (was aus den Kopplungskonstanten abgeleitet werden kann). Auf diese Weise wurden die Verbindungen Alterporriol I und Alterporriol J als neue Naturprodukte identifiziert.

Tabelle 1: ^1H -NMR- und ^{13}C -NMR-Daten von Alterporriol I und J

Atome	^1H	^{13}C	HMBC
1		160,1	
2		150,9	
3		130,8	
4	7,30 (s)	122,5	2, 10, 3-Me, 9a
4a		128,9	
5		123,0	
6		165,1*	
7	6,93 (s) / 6,94 (s)	103,8	5, 6, 8, 8a
8		165,6*	
8a		109,3	
9		190,3	
9a		129,0	
10		180,45	
10a		130,82	
1'	4,45 (d: 7,25)	68,5	2', 4'a, 9'a
2'	3,54 (d: 7,25)	73,7	1', 4'
3'		72,8	
4'	4,04 (s)	68,3	2', 3', 10', 4'a, 9'a, 3-Me
4'a		142,52	
5'		123,1	
6'		164,2#	
7'	6,90 (s) / 6,91 (s)	103,8	5', 6', 8', 8'a, 9'
8'		164,3#	
8'a		109,7	
9'		188,8	
9'a		143,5	
10'		183,9	
10'a		123,5	
3-Me	2,164 / 2,175	16,4 / 16,1	1, 2, 3, 4
3'-Me	1,110 / 1,114	22,24	2', 3', 4'
6-OMe	3,68 / 3,70	56,9 / 56,8	6
6'-Ome	3,71	56,7	6'
OH (1 & 8')	13,05 & 13,66		
OH	4,84		
	5,00		
	5,46		

Altersolanol M

Altersolanol M wurde in Form von rotbraunen Kristallen isoliert. Das HRESI-MS-Spektrum zeigt einen Hauptpeak bei m/z 379 ($[M+H]^+$), was 42 Masseneinheiten (d.h. eine Acetylgruppe) mehr als bei Altersolanol A sind, woraus die Summenformel $C_{18}H_{18}O_9$ folgt. Das 1H -NMR-Spektrum enthält drei austauschbare alkoholische Hydroxylgruppen, zwei Dubletts bei δ 5,34 und 5,98 sowie ein Singulett bei 4,86, die 1-OH, 4-OH bzw. 3-OH zugeordnet werden können. Außerdem sind zwei Singulett bei δ 1,13 und 2,11 (aus dem Integral abgeleitet) zu beobachten, die zwei Methylgruppen entsprechen. Die *meta*-koppelnden Protonen schwingen bei δ 6,85 (H-7) und δ 7,04 (H-5), während die aromatische Methoxygruppe bei δ 3,91 liegt. Im COSY-Spektrum, korreliert das Hochfeld-Dublett (4-OH) mit dem aliphatischen Niedrigfeld-Proton H-4, außerdem erscheint das Proton H-1 bei δ 4,64, was mit der Hydroxylgruppe (1-OH) am Kohlenstoffatomen C1 und mit dem Proton H-2 korreliert. Das gesamte aliphatische Spinsystem drückt auf H-1, H-2 und H-4, was zusammen mit den entsprechenden Hydroxylfunktionalitäten klar zeigt, dass die Acetylgruppe an Position C2 liegt. Weiters stützen im HMBC-Spektrum die den Protonen, d.h. H-1, H-2 und H-4 zuzuschreibenden Korrelationen (mit 3, 4, 4a, 10, Me-3) sowie die Korrelationen der aromatischen Protonen vollkommen die oben angegebene Struktur von Altersolanol M. Die relative Stereochemie von Altersolanol M wurde aus den im 1H -NMR-Spektrum beobachteten Kopplungskonstanten sowie aus den im ROESY-Spektrum detektierten Korrelationen abgeleitet. Der hohe Wert von J_{1-2} (7,52 Hz) zeigt, dass H-1 und H-2 in diaxialer Beziehung stehen, was sich im ROESY-Spektrum bestätigt. Zudem zeigt die Methylgruppe bei δ 1,13 Korrelationen mit H-4, 4-OH, 3-OH und H-2, die sich durch ihre äquatoriale Lage erklären lassen. Schließlich zeigt Proton H-2 eine deutliche Korrelation mit Proton H-4, was die relative Konfiguration des aliphatischen Rings anzeigt.

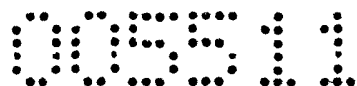
Tabelle 2: ^1H -NMR- und ^{13}C -NMR-Daten von Altersolanol M

Atome	^1H	^{13}C	HMBC
1	4,68 dd (6,23, 7,59)	65,92	1a
2	5,25 d (7,62)	76,75	1,11
3		72,22	
4	4,37 d (5,94)	68,61	4, 3, 4a, 10, 3-Me
4a		141,99	
5	7,04 d (2,49)	106,80	9a, 7, 6, 10
6		165,55	
7	6,85 d (2,52)	106,07	6, 5, 9a, 8
8		163,20	
8a		109,55	
9		187,78	
9a		143,84	
10		183,36	
10a		133,24	
11		170,20	
3-Me	1,13	21,76	4
11-Me	2,11	20,91	11
6-OMe	3,91	56,32	6
3-OH	4,86 s		4
1-OH	5,34 d (6,18)		
4-OH	5,98 d (5,97)		

Aktivitätsbestimmung

Die Aktivität der neuen Verbindungen wurden in zwei unterschiedlichen Screening-systemen getestet. Die antibakterielle und antifungale Aktivität wurde in einem MHK-Test untersucht. MHK steht für die "minimale Hemm-Konzentration" (engl.: MIC für "minimal inhibitory concentration") und bezeichnet die niedrigste Konzentration einer Substanz, bei der mit bloßem Auge keine Vermehrung von Mikroorganismen wahrgenommen werden kann. Bestimmt wird die MHK mit einem so genannten Titerverfahren, bei dem die Substanz ausverdünnt und anschließend der Erreger zugefügt wird.

In der Regel wird so die Konzentration eines Antibiotikums bestimmt, die das Wachstum eines Bakterienstammes gerade noch hemmt. Die MHK wird in Mikrogramm pro Milliliter ($\mu\text{g/ml}$) angegeben, und die Verdünnungen erfolgen in der Regel in log2-Schritten. Hierin wurde eine Ausgangskonzentration von 250 $\mu\text{g/ml}$ jeweils auf das Doppelte verdünnt, was folglich Testkonzentrationen von 250 $\mu\text{g/ml}$, 125 $\mu\text{g/ml}$, 62,5



$\mu\text{g/ml}$, 31,2 $\mu\text{g/ml}$, 15,6 $\mu\text{g/ml}$, 7,8 $\mu\text{g/ml}$ usw. ergab. Niedrigere Werte spiegeln demnach bessere Aktivität als Antiinfektivum wider.

Die Tests wurden nach den vom EUCAST (European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing) geforderten Standards und gemäß den AFST- ("Antifungal Susceptibility Testing") Vorschriften der European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) durchgeführt.

Das Screeningsystem für Viren ist ein Infektionssystem, bei dem Wirtszellen *in vitro* infiziert werden und die Testsubstanz vor oder nach der Infektion zugesetzt und ihre Aktivität bestimmt wird. Alle diese Tests wurden gemäß den betriebsinternen Standardvorschriften von SeaLife Pharma zum Arzneimittelscreening durchgeführt, wobei analoge Verdünnungsreihen wie im antibakteriellen/antifungalen Test eingesetzt wurden.

In der umseitigen Tabelle 3 sind die Testergebnisse bezüglich der antiinfektiven Wirkung gegen einige multiresistente Bakterien und Pilze (die allesamt freundlicherweise von Prof. Georgopoulos von der Medizinischen Universität Wien zur Verfügung gestellt worden waren) für Altersolanol M, Alterporriol I und J sowie einige bekannte und strukturell ähnliche Vergleichssubstanzen angeführt. Die Daten sind jeweils Mittelwerte von Mehrfachbestimmungen.

Es ist klar ersichtlich, dass die neuen Verbindungen der Erfindung ausgezeichnete Aktivität gegen vier Bakterienspezies, nämlich *Enterococcus faecalis* bzw. *faecium*, methicillinresistenten *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* und *Staphylococcus epidermis*, und darüber hinaus auch Wirkung gegen weitere Erreger zeigen, wobei Altersolanol M in dieser Testreihe ein breiteres Aktivitätsspektrum aufweist als Alterporriol I und J.

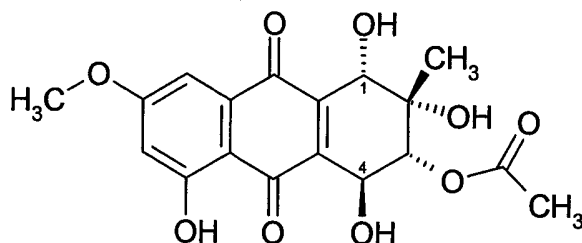
0055 11

Als Ergebnis der Aktivitätstest der neuen Verbindungen der Erfindung gegen drei verschiedene Spezies respiratorischer Viren, nämlich ein humanes Rhinovirus (hrv), ein respiratorisches Synzytial-Virus (rsv) und Paraflu, die von der ATCC erhalten worden waren, wurde festgestellt, dass beide (bzw. alle drei) Verbindungen bereits ab einer Konzentration von 0,1 μ g/ml für 100%igen Schutz der Zellen sorgten.

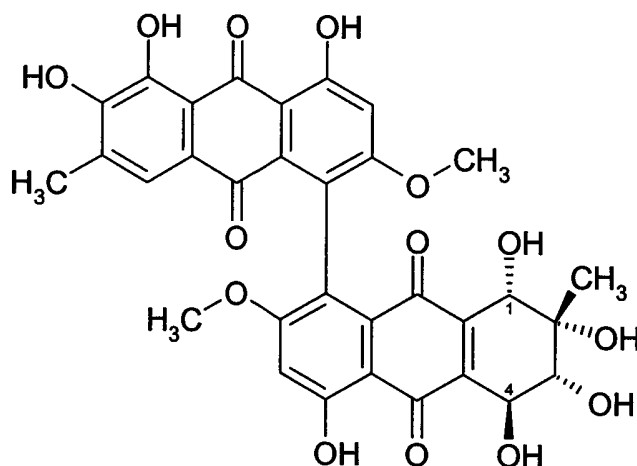
Somit wurde eindeutig belegt, dass gemäß vorliegender Erfindung neue Verbindungen bereitgestellt werden, die sehr gute Wirksamkeit sowohl gegen mehrfach arzneimittelresistente bakterielle und fungale Erreger als auch gegen respiratorische Viren zeigen und daher breite Anwendung als Antiinfektiva finden können.

PATENTANSPRÜCHE

1. (1S,2S,3R,4S)-3-Acetoxy-1,2,4,5-tetrahydroxy-7-methoxy-2-methyl-1,2,3,4-tetrahydroanthracen-9,10-dion (Altersolanol M):



2. 8-(4,5,6-Trihydroxy-7-methyl-2-methoxy-9,10-dioxo-9H,10H-anthracen-1-yl)-(1S,2S,3R,4S)-1,2,3,4,5-pentahydroxy-7-methoxy-2-methyl-1,2,3,4-tetrahydro-9H,10H-anthracen-9,10-dion (Atropisomere Alterporriol I und J):



3. Verwendung einer Verbindung nach Anspruch 1 oder 2 als Antiinfektivum.
4. Verwendung nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Verbindung gegen grampositive und gramnegative Bakterien, Pilze und respiratorische Viren eingesetzt wird.

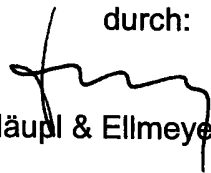
0055:11

5. Verwendung nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass die Verbindung als Antiinfektivum gegen mehrfach wirkstoffresistente ("multiple drug resistant", MDR-) Erreger eingesetzt wird.
6. Verwendung nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass die Verbindung gegen mehrfach wirkstoffresistente Stämme von methicillinresistentem *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Staphylococcus epidermis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus faecalis* bzw. *faecium*, *Escherichia coli*, *Klebsiella sp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Aspergillus sp.* sowie respiratorische Viren aus der Gruppe der humanen Rhinoviren und der respiratorischen Synzytial-Viren eingesetzt wird.
7. Verfahren zur Herstellung einer Verbindung nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass ein die Verbindung produzierender Mikroorganismus unter Wachstumsbedingungen fermentiert wird und die Verbindung, gegebenenfalls nach Zerstörung der Zellen des Mikroorganismus, aus der Kultur gewonnen wird.
8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass als Mikroorganismus *Stemphylium globuliferum* eingesetzt wird.
9. Verfahren nach Anspruch 7 oder 8, dadurch gekennzeichnet, dass die Verbindung durch Extraktion und anschließende Isolierung aus dem Rohextrakt gewonnen wird.

Wien, am 29. Mai 2009

SEALIFE PHARMA GMBH

durch:


Häupl & Ellmeyer KEG