

**PCT**WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁵ : A61K 31/165, C07C 235/32		A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 92/11004 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 9. Juli 1992 (09.07.92)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP91/02503 (22) Internationales Anmeldedatum: 23. Dezember 1991 (23.12.91) (30) Prioritätsdaten: P 40 41 688.7 24. Dezember 1990 (24.12.90) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): DEUTSCHES PRIMATENZENTRUM GMBH [DE/DE]; Kellnerweg 4, D-3400 Göttingen (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US) : HUNSMANN, Gerhard [DE/DE]; JURKIWICZ, Elke [DE/DE]; Kellnerweg 4, D-3400 Göttingen (DE). REICHENBACH, Hans [DE/ DE]; FORCHE, Edgar [DE/DE]; GERTH, Klaus [DE/ DE]; IRSCHIK, Herbert [DE/DE]; KUNZE, Brigitte [DE/DE]; SASSE, Florenz [DE/DE]; HÖFLE, Gerhard [DE/DE]; BEDORF, Norbert [DE/DE]; JANSEN, Rolf [DE/DE]; STEINMETZ, Heinrich [DE/DE]; TRO- WITZSCH-KIENAST, Wolfram [DE/DE]; Maschero- der Weg 1, D-3300 Braunschweig (DE).		(74) Anwälte: BOETERS, Hans, D. usw. ; Bereiteranger 15, D- 8000 München 90 (DE). (81) Bestimmungsstaaten: AT (europäisches Patent), BE (euro- päisches Patent), CH (europäisches Patent), DE (euro- päisches Patent), DK (europäisches Patent), ES (euro- päisches Patent), FR (europäisches Patent), GB (euro- päisches Patent), GR (europäisches Patent), IT (europäi- sches Patent), JP, LU (europäisches Patent), MC (euro- päisches Patent), NL (europäisches Patent), SE (europäi- sches Patent), US. Veröffentlicht Mit internationalem Recherchenbericht.	
(54) Title: FENALAMIDES AS THERAPEUTIC AGENTS AGAINST VIRAL DISEASES (54) Bezeichnung: FENALAMIDEN ALS THERAPEUTISCHE MITTEL ZUR BEKÄMPFUNG VON VIRUSERKRAN- KUNGEN			
(I)			
(57) Abstract The invention concerns agents containing fenalamides of general formula (I) for fighting viral diseases. In formula (I) the broken line between the C10 and C11 atoms can be a (further) C-C bond or an -O- bridge and the C-8 atom can carry a methyl group.			
(57) Zusammenfassung Die Erfindung betrifft Mittel mit Fenalamiden der folgenden allgemeinen Formel (I) zur Bekämpfung von Viruserkrankungen, wobei die gestrichelte Linie zwischen dem C10- und dem C11-Atom eine (weitere) C-C-Bindung oder eine -O-Brücke sein kann und wobei das C8-Atom eine Methylgruppe tragen kann.			

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

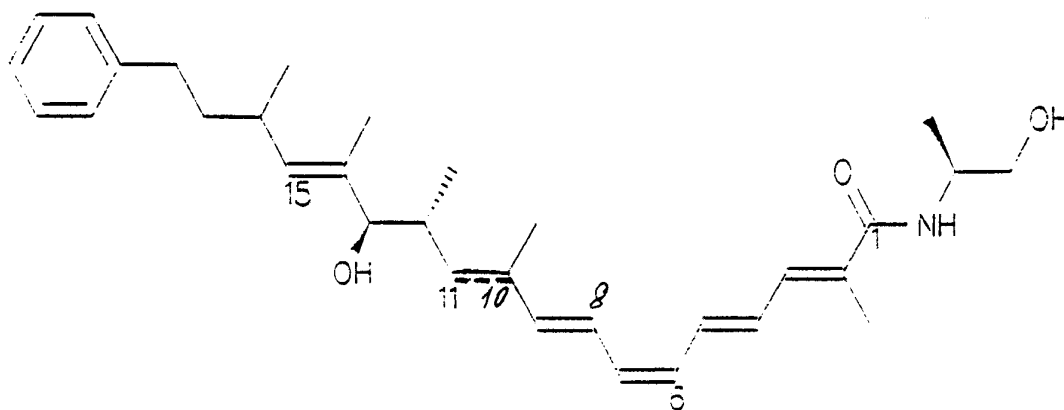
Code, die zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	ES	Spanien	ML	Mali
AU	Australien	FI	Finnland	MN	Mongolei
BB	Barbados	FR	Frankreich	MR	Mauritanien
BE	Belgien	GA	Gabon	MW	Malawi
BF	Burkina Faso	GB	Vereinigtes Königreich	NL	Niederlande
BG	Bulgarien	GN	Guinea	NO	Norwegen
BJ	Benin	GR	Griechenland	PL	Polen
BR	Brasilien	HU	Ungarn	RO	Rumänien
CA	Kanada	IT	Italien	SD	Sudan
CF	Zentrale Afrikanische Republik	JP	Japan	SE	Schweden
CG	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SN	Senegal
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SU ⁺	Soviet Union
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	TD	Tschad
CM	Kamerun	LK	Sri Lanka	TC	Togo
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	US	Vereinigte Staaten von Amerika
DE	Deutschland	MC	Monaco		
DK	Dänemark	MG	Madagaskar		

+ Die Bestimmung der "SU" hat Wirkung in der Russischen Föderation. Es ist noch nicht bekannt, ob solche Bestimmungen in anderen Staaten der ehemaligen Sowjetunion Wirkung haben.

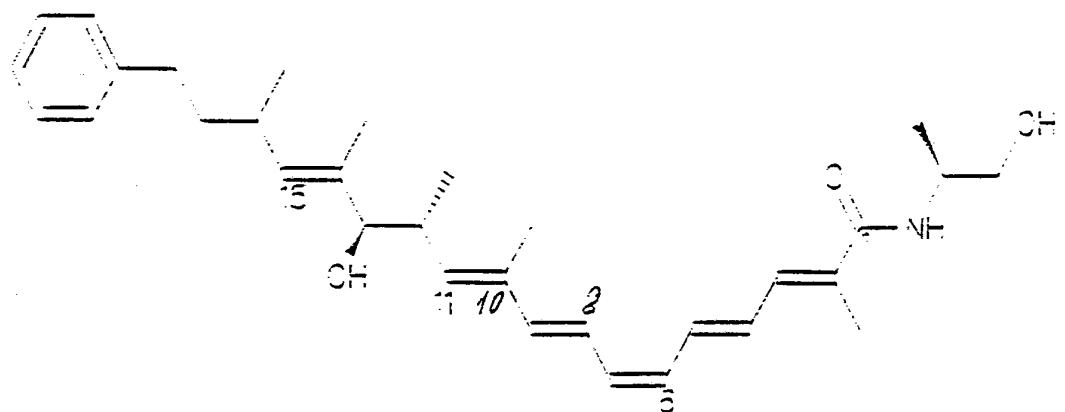
FENALAMIDEN ALS THERAPEUTISCHE MITTEL ZUR BEKÄMPFUNG VON VIRUSERKRANKUNGEN

Die Erfindung betrifft therapeutische Mittel zur Bekämpfung von Viruserkrankungen, bestehend aus Fenalamiden der folgenden allgemeinen Formel oder enthaltend Fenalamide der folgenden allgemeinen Formel, gegebenenfalls neben üblichen Trägern und/oder Verdünnungsmitteln:

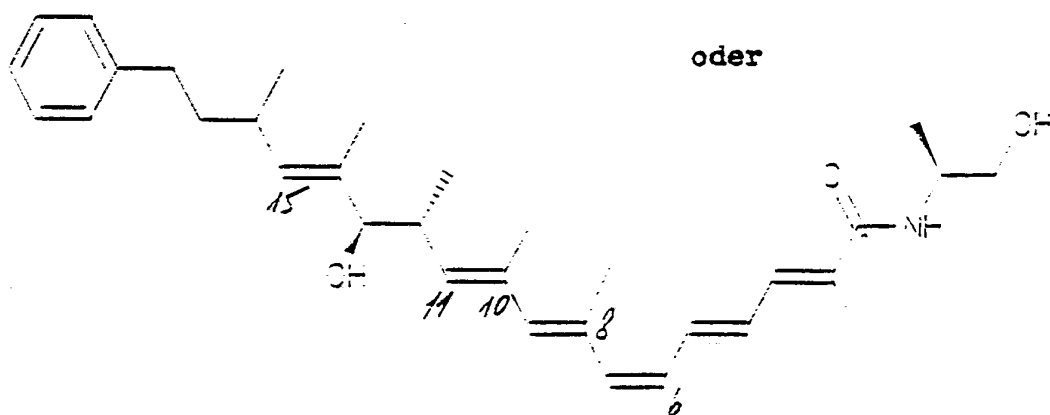


wobei die gestrichelte Linie zwischen dem C10- und dem C11-Atom eine (weitere) C-C-Bindung oder eine -O-Brücke sein kann und wobei das C8-Atom eine Methylgruppe tragen kann.

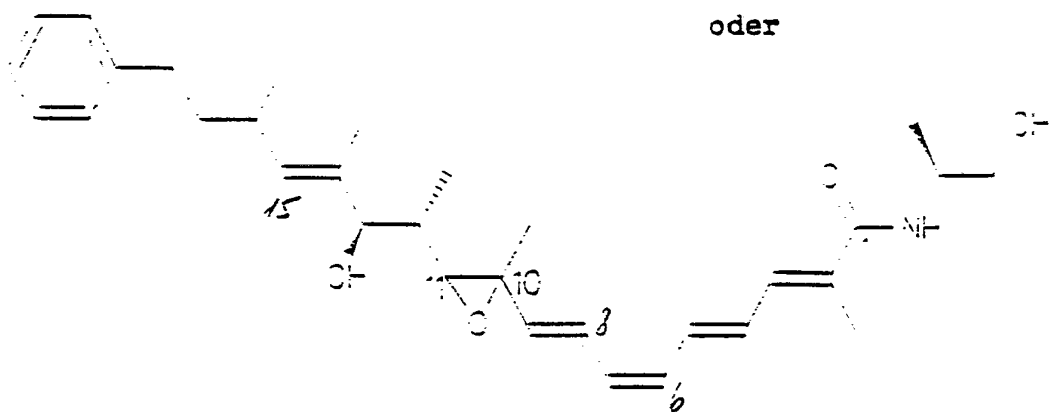
Ferner betrifft die Erfindung therapeutische Mittel zur Bekämpfung von Viruserkrankungen, bestehend aus Fenalamiden der folgenden allgemeinen Formeln oder enthaltend Fenalamide der folgenden allgemeinen Formeln, gegebenenfalls neben üblichen Trägern und/oder Verdünnungsmitteln:



oder



oder



Ferner betrifft die Erfindung ein therapeutisches Mittel zur Bekämpfung von Viruserkrankungen, bestehend aus Fenalamid (A) mit einem oder mehreren der folgenden Parameter oder enthaltend Fenalamid (A) mit einem oder mehreren der folgenden Parameter, gegebenenfalls neben einem üblichen Träger oder Verdünnungsmittel:

HPLC (Säule: Nucleosil-C₁₈, 5 μ , 12.5 cm x 4 mm; Laufmittel: Methanol:Wasser = 85/15; Durchfluß: 1.5 ml/min; Detektion: Diodenarray-System HP 1040A) : Retentionszeit R_t = 6.5 min. -

UV (Methanol): $\lambda_{\max}$ ($\lg \epsilon$) = 356 nm (4.77)

$[\alpha]_D^{25} = -189^\circ$ ($c = 1$, in Methanol)

¹H-NMR (600 MHz, CD₃OD): δ = 7.24 [t, $J = 7.7$ Hz, 2H, meta-Protonen am Aromaten], 7.16 [d, $J = 7.2$ Hz, 2H, ortho-Protonen am Aromaten], 7.14 [t, $J = 7.3$ Hz, 1H, para-Proton am Aromat], 7.07 [dd, $J = 11.0$ und 14.5 Hz, 1H, 5-H], 7.02 [d, $J = 11.4$ Hz, 1H, 3-H], 7.73 [dd, $J = 10.6$ und 15.1 Hz, 1H, 8-H], 6.59 [dd, $J = 11.4$ und 14.5 Hz, 1H, 4-H], 6.40 [d, $J = 15.1$ Hz, 1H, 9-H], 6.14 [m, 2H, 6- und 7-H (durch 2D-H-COSY-Spektren ermittelt)], 5.63 [d, $J = 9.7$ Hz, 1H, 11-H], 5.27 [d, $J = 9.6$ Hz, 1H, 15-H], 4.09 [dq, $J = 5.7$ und 12.4 Hz, 1H, 1'-H], 3.85 [d, $J = 6.7$ Hz, 1H, 13-H], 5.72 [dq, $J = 5.8$ und 11.0 Hz, 2H, 2'-H₂], 2.83 [m, 1H, 12-H], 2.64 [m, 1H, 18H_a], 2.52 [m, 1H, 18H_b], 2.45 [m, 1H, 16-H], 2.02 [d, $J = 0.8$ Hz, 3H, 2-CH₃], 1.89 [d, $J = 1.0$ Hz, 3H, 10-CH₃], 1.68 [m, 1H, 17-H_a], 1.62 [d, $J = 1.2$ Hz, 3H, 14-CH₃], 1.54 [m, 1H, 17-H_b], 1.23 [d, $J = 6.8$ Hz, 3H, 1'-CH₃], 1.00 [d, $J = 1.0$ Hz, 3H, 16-CH₃], 0.97 [d, $J = 6.9$ Hz, 3H, 12-CH₃]. -

EI-MS: m/z (%) = 491 (3) [M]⁺, 473 (6) [M-H₂O]⁺, 455 (2) [M-2 x H₂O], 289 (100) [C₁₈H₂₇NO₂], 271 (30) [$m/z = 289-H_2O$]. -

Hochauflösung: gefunden 491.3381, für C₃₂H₄₅NO₃ ber. 491.3399

Ferner betrifft die Erfindung ein therapeutisches Mittel zur Bekämpfung von Viruserkrankungen, bestehend aus Fenalamid (B) mit einem oder mehreren der folgenden Parameter oder enthaltend Fenalamid (B) mit einem oder mehreren der folgenden Parameter, gegebenenfalls neben einem üblichen Träger oder Verdünnungsmittel:

HPLC (Säule: Nucleosil-C₁₈, 5µ, 12.5 cm x 4 mm; Laufmittel: Methanol:Wasser = 85/15; Durchfluß: 1.5 ml/min; Detektion: Diodenarray-System HP 1040A) : Retentionszeit R_t = 9.6 min. -

UV (Methanol): $\lambda_{\max}$ (lg ϵ) = 346 nm (4.70)

¹H-NMR (600 MHz, [D₆]Aceton): δ = 7.24 [t, J = 7.6 Hz, 2H, meta-Protonen am Aromat], 7.16 [d, J = 6.9 Hz, 2H, ortho-Protonen am Aromat], 7.14 [t, J = 7.3 Hz, 1H, para-Proton am Aromat], 6.95 [d, J = 11.4 Hz, 1H, 3-H], 6.60 [dd, J = 11.4 und 14.6 Hz, 1H, 4-H], 6.55 [dd, J = 14.6 und 10.0 Hz, 1H, 5-H], 6.42 [dd, J = 15.3 und 10.0 Hz, 1H, 6-H], 6.41 [d, J = 15.3 Hz, 1H, 7-H], 6.02 [s, 1H, 9-H], 5.47 [d, J = 9.6 Hz, 1H, 11-H], 5.52 [d, J = 9.6 Hz, 1H, 15-H], 4.03 [m, 1H, 1'-H], 3.82 [d, J = 6.0 Hz, 1H, 13-H], 3.61 [m, 2H, 2'-H₂], 2.74 [m, 1H, 12-H], 2.61 [ddd, J = 5.5, 10.5 und 14.0 Hz, 1H, 18H_a], 2.50 [ddd, J = 6.5, 10.0 und 14.0 Hz, 1H, 18H_b], 2.44 [m, 1H, 16-H], 2.04 [d, J = 1.0 Hz, 3H, 2-CH₃], 1.96 [d, J = 1.1 Hz, 3H, 8-CH₃], 1.83 [d, J = 1.0 Hz, 3H, 10-CH₃], 1.62 [d, J = 1.1 Hz, 3H, 14-CH₃], 1.60 [m, 1H, 17-H_a], 1.51 [m, 1H, 17-H_b], 1.16 [d, J = 6.8 Hz, 3H, 1'-CH₃], 0.96 [d, J = 6.5 Hz, 3H, 16-CH₃], 0.95 [d, 6.8 Hz, 3H, 12-CH₃].-

EI-MS (Die Ionen im Molpeak-Bereich sind nur sehr schwach. Im Gesamtspektrum ist m/z = 91 Basis-Ion. Das Ion m/z 487 beträgt hiervon ca. 5 %, die angegebenen Prozentzahlen beziehen sich nur auf den genannten Massenbereich): m/z (%) = 505 (17) [M]⁺, 487 (100) [M-H₂O]⁺, 469 (74) [M-2 x H₂O], 454 (48) [M-2 x H₂O-CH₃].-
Hochauflösung: gef. 505.3550 für C₃₃H₄₇NO₃ ber. 505.3555

Ferner betrifft die Erfindung ein therapeutisches Mittel zur Bekämpfung von Viruserkrankungen, bestehend aus Fenalamid (C) mit einem oder mehreren der folgenden Parameter oder enthaltend Fenalamid (C) mit einem oder mehreren der folgenden Parameter, gegebenenfalls neben einem üblichen Träger oder Verdünnungsmittel:

HPLC (Säule: Nucleosil-C₁₈, 5 μ , 12.5 cm x 4 mm; Laufmittel: Methanol:Wasser = 85/15; Durchfluß: 1.5 ml/min; Detektion: Diodenarray-System HP 1040A) : Retentionszeit R_t = 3.8 min. -

UV (Methanol): $\lambda_{\max}$ ($\lg \epsilon$) = 328 nm (4.63). -

¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD): δ = 7.28 [t, J = 7.1 Hz, 2H, meta-Protonen am Aromat], 7.20 [d, J = 6.9 Hz, 2H, ortho-Protonen am Aromat], 7.18 [t, J = 7.1 Hz, 1H, para-Proton am Aromat], 6.96 [d, J = 11.0 Hz, 1H, 3-H], 6.60 [m, höherer Ordnung, 2H, 4- und 5-H], 6.64 [m, höherer Ordnung, 3H, 6-, 7- und 8-H], 5.35 [d, J = 9.6 Hz, 1H, 15-H], 4.08 [m, 1H, 1'-H], 3.92 [d, J = 10.4 Hz, 1H, 13-H], 3.62 [d, J = 9.8 Hz, 1H, 11-H], 3.57 [dq, J = 5.6 und 11.6 Hz, 2H, 2'-H₂], 2.65 [m, 3H, 12-, 18-H_a und 18 H_b], 2.51 [m, 2H, 18 H_b und 16-H], 2.01 [s, 3H, 2-CH₃], 1.69 [s, 3H, 14-CH₃], 1.61 [m, 1H, 17-H_a], 1.42 [s, 3H, 10-CH₃], 1.33 [m, 1H, 17-H_b], 1.23 [d, J = 7.2 Hz, 3H, 1'-CH₃], 1.02 [d, J = 6.8 Hz, 3H, 16-CH₃], 0.99 [d, J = 7.3 Hz, 3H, 12-CH₃]. -

EI-MS (Basis-Ion ist auch hier m/z = 91. Das Ion m/z 489 beträgt ca. 5 % des Basis-Ions): m/z (%) = 507 (84) [M]⁺, 489 (100) [M-H₂O]⁺, 474 (30) [M-H₂O-CH₃], 446 (69), 432 (76). -

Hochauflösung: gef. 507.3335, für C₃₂H₄₅NO₄ ber. 507.3348. -

Eine spezielle Ausführungsform betrifft ein derartiges therapeutisches Mittel zur Bekämpfung von Erkrankungen durch Retroviren, insbesondere zur Bekämpfung von HIV.

Fenalamide, insbesondere der vorstehend angeführten Fenalamide, insbesondere Fenalamide A, B und/oder C, lassen sich dadurch gewinnen, daß man

- *Myxococcus stipitatus* DSM 6259 in einem Medium mit einem Gehalt an Kohlenstoffquellen, Stickstoffquellen und Mineral-salzen in Gegenwart eines Adsorberharzes kultiviert,
- das Adsorberharz abtrennt und mit Methanol extrahiert,
- das Eluat zu einem Rohextrakt einengt,
- gegebenenfalls den Rohextrakt in Essigsäureethylester/Wasser aufnimmt, einer Gegenstromzentrifugation unterwirft, die Wasser-phase verwirft und die Esterphase zu einem Rohextrakt einengt,
- den Rohextrakt der letzten oder der vorletzten Stufe einer Flüssigchromatographie (HPLC) an einer Umkehrphase (RP-18) mit Methanol/Wasser chromatographiert,
- Fraktionen enthaltend Wirkstoff mit antiviraler Aktivität gewinnt und die Fraktionen einengt, beispielsweise eine Fraktion mit einem Gehalt an Fenalamid A und/oder eine Fraktion mit Fenalamid B und/oder eine Fraktion mit Fenalamid C gewinnt, wobei diese Fraktionen in der angegebenen Reihenfolge anfallen, die Fraktion(en) einengt und
- gegebenenfalls die Flüssigchromatographie mit Fraktionierung und Einengung wiederholt.

Zur Herstellung von Cis-Trans-Isomeren der Fenalamide A, B und/oder C bzw. von Fenalamiden einer oder mehrerer der allgemeinen Formeln kann man Fenalamid A, B und/oder C einer Behandlung mit UV-Licht unterwerfen und die erhaltenen Isomeren chromatographisch auftrennen und gegebenenfalls isolieren.

Nachstehend wird die Erfindung anhand experimenteller Daten näher erläutert.

A. Produktionsbedingungen

A.1. Produktionsstamm

Das Bakterium *Myxococcus stipitatus* gehört zur Ordnung der Myxobacterales, Unterordnung Cystobacterineae, Familie Myxococcaceae. Der Produktionsstamm *Myxococcus stipitatus* Mx s40 wurde im September 1988 an der GBF aus einer Bodenprobe aus dem Jacobsburg State Park bei Wind Gap, Pennsylvania, USA, isoliert. Hinterlegung bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen (DSMZ) unter der Nr. DSM 6259.

A.2. Stammkultur

Die Stammkultur erfolgt auf Agarplatten, bevorzugt auf Hefe-Agar (VY/2-agar). Dieses Medium enthält 0.5% Bäckerhefe, 0.1% $\text{CaCl}_2 \times \text{H}_2\text{O}$, 0,1 $\mu\text{g/l}$ Vitamin B12 und 1.2% Agar. Der pH-Wert wird auf 7.2 eingestellt. Die Platten werden bei 30° bebrütet.

A.3. Morphologische Beschreibung

Die vegetativen Stäbchen sind schlank und haben leicht verjüngte Enden. Sie sind etwa 0.7 μm dick und 2 bis 5 μm lang. Die

Myxosporen sind oval, stark lichtbrechend, etwa 1.1 bis 1.3 x 1.3 bis 1.5 µm groß. Bedingt durch die Gleitbewegung der Bakterien breiten sich die Kolonien rasch über die Kulturplatte aus. Die Schwarmkolonie auf Hefegar ist dünn, filmartig, rötlich braun. Wie an dem um die Kolonien entstehenden Klärhof zu erkennen, werden die Hefezellen im Medium abgebaut. In älteren Kulturen (1 bis 2 Wochen bei 30 °C) werden oft weißliche bis bläulich bräunliche Fruchtkörper gebildet. Diese bestehen aus einem weichschleimigen Kopf von etwa 100 bis 200 µm Durchmesser, der oft einem mehr oder weniger langen Stiel von 30 bis 50 µm Durchmesser aufsitzt. Nach mehreren Überimpfungen läßt die Tendenz, Fruchtkörper zu bilden, allmählich nach. Bei Bestrahlung mit ultravioletem Licht mit einer Wellenlänge von 366 nm zeigt eine einige Tage alte Schwarmkolonie eine gelbe Fluoreszenz.

A.4. Leistungen

Der Stamm Mx s40 produziert Substanzen, nämlich Fenalamide, die die Vermehrung von HIV (Human Immunodeficiency Virus) hemmen (vgl. unten). Die antiviralen Substanzen können sowohl aus den Zellen wie auch aus dem Kulturüberstand isoliert werden.

A.5. Produktion der Fenalamide

Die Substanzen werden während der logarithmischen bis hin zur stationären Phase produziert. Eine typische Fermentation verläuft wie folgt: Ein Fermentor mit 700 l Arbeitsvolumen wird mit 630 l Kulturmedium gefüllt (Zusammensetzung: 0.6 % Pepton aus Casein,

(tryptisch verdaut) 0.05 % $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 0.2 % $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, pH 7.2 mit H_2SO_4 eingestellt). Zur Bindung der in das Medium freigesetzten antiviralen Substanzen wird dem Medium 1 bis 2 % (V/V) eines Adsorberharzes z.B. XAD-1180 zugesetzt. Beimpft wird mit 70 l einer im gleichen Medium in einem entsprechend kleineren Fermentor erzeugten, einen Tag alten Vorkultur. Fermentiert wird bei 30 ° mit einer Rührgeschwindigkeit von 150 Upm und einer Belüftung von 0.2 V/Vm. Anfängliche Schaumbildung wird durch die Zugabe von 70 ml Silikon Antischaum z. B. Tegosipon verhindert. Der pH-Wert wird durch geregelte Zugabe von 5 %iger H_2SO_4 bei 7.2 gehalten. Die Fermentation wird nach drei Tagen beendet.

B. Gewinnung und Charakterisierung

Aufarbeitung eines 700 l-Fermenters des Stammes Mx s40

Die Fermentation wird in Gegenwart von 8 l Adsorber-Harz XAD-1180 durchgeführt. Gegen Ende der Fermentation wird das Harz vom Medium und den Zellen durch ein Sieb abgetrennt. Das Harz wird in einer Säule mit 3 Bettvolumen Methanol eluiert. Nach Einengen am Rotationsverdampfer werden hieraus 234 g Rohextrakt erhalten. Der Rohextrakt wird in 20 l Essigsäureethylester und 20 l Wasser gelöst und in einer Gegenstromzentrifugation verteilt. Die Wasserphase wird verworfen, die Essigesterphase getrocknet und im Wasserstrahlvakuum eingeengt. Ausbeute Essigesterphase: 38 g.

Der Rohextrakt wird auf einer präparativen HPLC-Anlage (Prep-bar Trennanlage, Fa. Merck, Darmstadt) auf einer 2-l-Säule Lichroprep RP-18 mit dem Laufmittel (A) Methanol:Wasser = 75:25 (zunächst 25 min isokratisch) danach mit einem linearen Gradienten (90 min) zum Laufmittel B (Methanol:Wasser = 85:15) chromatographiert. Der Fluß beträgt dabei 120 ml/min, detektiert wird bei $\lambda = 330$ nm.

Die Fenalamide enthaltenden Fraktionen werden zwischen den Retentionszeiten $R_t = 71.5-77.5$ min (C), zwischen $R_t = 101.5-115$ min (A) und zwischen 125.5 und 130.5 min (B) gesammelt. Nach Einengen werden von A 3.03 g, von B 225 mg und von C 125 mg erhalten, B ist noch mit größeren Mengen an Fettsäuren und deren Glyceriden verunreinigt. Nachtrennungen dieser Fraktionen zur Erfassung der spektroskopischen Daten der

Fenalamide erfolgten jeweils an einer Nucleosil C-18-Säule. 7 μ (25 cm x 12.5 mm) mit den gleichen Laufmitteln.

Beschreibung der Fenalamide

Fenalamid A

HPLC (Säule: Nucleosil-C18, 5 μ , 12.5 cm x 4 mm; Laufmittel: Methanol:Wasser = 85/15; Durchfluß: 1.5 ml/min; Detektion: Diodenarray-System HP 1040A) : Retentionszeit R_t = 6.5 min. -

UV (Methanol): $\lambda_{\max}$ ($\lg \epsilon$) = 356 nm (4.77)

$[\alpha]_D^{25}$ = - 189° (c = 1, in Methanol)

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CD_3OD): δ = 7.24 [t, J = 7.7 Hz, 2H, meta-Protonen am Aromaten], 7.16 [d, J = 7.2 Hz, 2H, ortho-Protonen am Aromaten], 7.14 [t, J = 7.3 Hz, 1H, para-Proton am Aromat], 7.07 [dd, J = 11.0 und 14.5 Hz, 1H, 5-H], 7.02 [d, J = 11.4 Hz, 1H, 3-H], 7.73 [dd, J = 10.6 und 15.1 Hz, 1H, 8-H], 6.59 [dd, J = 11.4 und 14.5 Hz, 1H, 4-H], 6.40 [d, J = 15.1 Hz, 1H, 9-H], 6.14 [m, 2H, 6- und 7-H (durch 2D-H-COSY-Spektren ermittelt)], 5.63 [d, J = 9.7 Hz, 1H, 11-H], 5.27 [d, J = 9.6 Hz, 1H, 15-H], 4.09 [dq, J = 5.7 und 12.4 Hz, 1H, 1'-H], 3.85 [d, J = 6.7 Hz, 1H, 13-H], 5.72 [dq, J = 5.8 und 11.0 Hz, 2H, 2'-H₂], 2.83 [m, 1H, 12-H], 2.64 [m, 1H, 18H_a], 2.52 [m, 1H, 18H_b], 2.45 [m, 1H, 16-H], 2.02 [d, J = 0.8 Hz, 3H, 2-CH₃], 1.89 [d, J = 1.0 Hz, 3H, 10-CH₃], 1.68 [m, 1H, 17-H_a], 1.62 [d, J = 1.2 Hz, 3H, 14-CH₃], 1.54 [m, 1H, 17-H_b], 1.23 [d, J = 6.8 Hz, 3H, 1'-CH₃], 1.00 [d, J = 1.0 Hz, 3H, 16-CH₃], 0.97 [d, JJ = 6.9 Hz, 3H, 12-CH₃]. -

EI-MS: m/z (%) = 491 (3) [M]⁺, 473 (6) [M-H₂O]⁺, 455 (2) [M-2 x H₂O], 289 (100) [C₁₈H₂₇NO₂], 271 (30) [m/z = 289-H₂O]. -

Hochauflösung: gefunden 491.3381, für C₃₂H₄₅NO₃ ber. 491.3399

Fenalamid B

HPLC (Bedingungen wie für Fenalamid A): $R_t = 9.6$ min. -

UV (Methanol): $\lambda_{\max} (\lg \epsilon) = 346$ nm (4.70). -

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, $[\text{D}_6]\text{Aceton}$): $\delta = 7.24$ [t, $J = 7.6$ Hz, 2H, meta-Protonen am Aromat], 7.16 [d, $J = 6.9$ Hz, 2H, ortho-Protonen am Aromat], 7.14 [t, $J = 7.3$ Hz, 1H, para-Proton am Aromat], 6.95 [d, $J = 11.4$ Hz, 1H, 3-H], 6.60 [dd, $J = 11.4$ und 14,6 Hz, 1H, 4-H], 6.55 [dd, $J = 14.6$ und 10.0 Hz, 1H, 5-H], 6.42 [dd, $J = 15.3$ und 10.0 Hz, 1H, 6-H], 6.41 [d, $J = 15.3$ Hz, 1H, 7-H], 6.02 [s, 1H, 9-H], 5.47 [d, $J = 9.6$ Hz, 1H, 11-H], 5.52 [d, $J = 9.6$ Hz, 1H, 15-H], 4.03 [m, 1H, 1'-H], 3.82 [d, $J = 6.0$ Hz, 1H, 13-H], 3.61 [m, 2H, 2'-H₂], 2.74 [m, 1H, 12-H], 2.61 [ddd, $J = 5.5, 10.5$ und 14.0 Hz, 1H, 18H_a], 2.50 [ddd, $J = 6.5, 10.0$ und 14.0 Hz, 1H, 18H_b], 2.44 [m, 1H, 16-H], 2.04 [d, $J = 1.0$ Hz, 3H, 2-CH₃], 1.96 [d, $J = 1.1$ Hz, 3H, 8-CH₃], 1.83 [d, $J = 1.0$ Hz, 3H, 10-CH₃], 1.62 [d, $J = 1.1$ Hz, 3H, 14-CH₃], 1.60 [m, 1H, 17-H_a], 1.51 [m, 1H, 17-H_b], 1.16 [d, $J = 6.8$ Hz, 3H, 1'-CH₃], 0.96 [d, $J = 6.5$ Hz, 3H, 16-CH₃], 0.95 [d, 6.8 Hz, 3H, 12-CH₃].-

EI-MS (Die Ionen im Molpeak-Bereich sind nur sehr schwach. Im Gesamtspektrum ist $m/z = 91$ Basis-Ion. Das Ion $m/z 487$ beträgt hiervon ca. 5 %, die angegebenen Prozentzahlen beziehen sich nur auf den genannten Massenbereich): m/z (%) = 505 (17) $[\text{M}]^+$, 487 (100) $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}]^+$, 469 (74) $[\text{M}-2 \times \text{H}_2\text{O}]$, 454 (48) $[\text{M}-2 \times \text{H}_2\text{O}-\text{CH}_3]$.-

Hochauflösung: gef. 505.3550 für $\text{C}_{33}\text{H}_{47}\text{NO}_3$ ber. 505.3555

Fenalamid C

HPLC (Bedingungen wie für Fenalamid A): $R_t = 3.8$ min. -

UV (Methanol): $\lambda_{\max}$ ($\lg \epsilon$) = 328 nm (4.63). -

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CD_3OD): δ = 7.28 [t, J = 7.1 Hz, 2H, meta-Protonen am Aromat], 7.20 [d, J = 6.9 Hz, 2H, ortho-Protonen am Aromat], 7.18 [t, J = 7.1 Hz, 1H, para-Proton am Aromat], 6.96 [d, J = 11.0 Hz, 1H, 3-H], 6.60 [m, höherer Ordnung, 2H, 4- und 5-H], 6.64 [m, höherer Ordnung, 3H, 6-, 7- und 8-H], 5.35 [d, J = 9.6 Hz, 1H, 15-H], 4.08 [m, 1H, 1'-H], 3.92 [d, J = 10.4 Hz, 1H, 13-H], 3.62 [d, J = 9.8 Hz, 1H, 11-H], 3.57 [dq, J = 5.6 und 11.6 Hz, 2H, 2'-H₂], 2.65 [m, 3H, 12-, 18-H_a und 18 H_b], 2.51 [m, 2H, 18 H_b und 16-H], 2.01 [s, 3H, 2-CH₃], 1.69 [s, 3H, 14-CH₃], 1.61 [m, 1H, 17-H_a], 1.42 [s, 3H, 10-CH₃], 1.33 [m, 1H, 17-H_b], 1.23 [d, J = 7.2 Hz, 3H, 1'-CH₃], 1.02 [d, J = 6.8 Hz, 3H, 16-CH₃], 0.99 [d, J = 7.3 Hz, 3H, 12-CH₃]. -

EI-MS (Basis-Ion ist auch hier m/z = 91. Das Ion m/z 489 beträgt ca. 5 % des Basis-Ions): m/z (%) = 507 (84) [M]⁺, 489 (100) [M-H₂O]⁺, 474 (30) [M-H₂O-CH₃], 446 (69), 432 (76). -

Hochauflösung: gef. 507.3335, für $\text{C}_{32}\text{H}_{45}\text{NO}_4$ ber. 507.3348. -

Handelsbezeichnungen:

XAD-1180 (Rohm & Haas; vgl. Anlage)

Tegosipon (Goldschmidt; vgl. Anlage)

Lichroprep RP-18 (Merck; vgl. Anlage)

Nucleosil C-18 (Macherey-Nagel; vgl. Anlage)

Diodenarray-System HP 1040A (Hewlett-Packard)

Anti-HIV-1-Aktivität und Zytotoxizität im MT-4-Zelltest

Fenalamid A wurde im MT-4-Zellsystem (Harada et al.; 1986) auf die Anti-HIV-1-Wirkung und Zelltoxizität untersucht. MT-4 ist eine humane T-Zelllinie, die durch eine HIV-1-Infektion stark geschädigt wird und abstirbt.

In Abwandlung zu dem von Harada und Mitarbeiter beschriebenen MT-4-Zelltest (1986) wurden für den hier durchgeführten Zelltest Kulturüberstände aus der HIV-1 produzierenden Jurkat-Zelllinie eingesetzt, die durch Infektion lymphozytärer Jurkat-Zellen (Wendler et al.; 1987) mit dem HIV-1-Typ HTLLV-IIIB aus H9-Zellen (Popovic et al.; 1984) entstanden ist.

Als Gewebekulturmedium wurde für Jurkat- und MT-4-Zellen sterilfiltriertes Medium RPMI 1640 (Gibco, Karlsruhe) unter Zusatz von 10 % komplementinaktiviertem (30 Minuten, 56 °C) fötalen Rinderserum (Seromed, Berlin) sowie Antibiotika verwendet. Während der Durchführung des MT-4-Zelltests wurde zur Aufrechterhaltung des pH-Wertes dem Medium 25 mM HEPES (2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinylethansulfonsäure, Merck, Darmstadt) zugefügt. Die Zellkulturen wurden in einem Inkubator (Heraeus) bei 37 °C mit einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre mit 6 % CO₂ inkubiert.

Der MT-4-Zelltest wurde in Mikrotiterplatten durchgeführt. Pro Loch wurden 3×10^4 MT-4-Zellen mit verschiedenen Substanzverdünnungen mit und ohne HIV-1 kultiviert. Fenalamid A wurde in einer Anfangskonzentration von 500 µg/ml gefolgt von 1:10er Verdünnungen austritriert. Für die Virusinfektion wurde eine zuvor austritrierte Virusdosis von 100 TCID₅₀ eingesetzt. Nach drei Tagen Kultivierung wurde frisches Medium RPMI 1640 zugegeben. Vier Tage nach Testansatz wurden 0.1 µCi ³H-Thymidin pro Loch der Mikrotiterplatte zugegeben. Die Zellen wurden 20 Stunden

später auf Glasfaserfiltern geerntet, mit Wasser gewaschen und der ^3H -Thymidineinbau in der Zell-DNA nach Zugabe eines flüssigen Szintillators Toluol/POPOP (Roth, Karlsruhe) im β -Zähler (Packard, Frankfurt) gemessen. Niedrige Einbauraten weisen auf einen virusbedingten Zelltod bzw. die Toxizität der Substanz hin, hohe auf eine Hemmung der HIV-1-Infektion. Der ^3H -Thymidineinbau wurde in Abhängigkeit der Substanzkonzentration graphisch dargestellt und die Toxizität sowie die maximale antivirale Wirksamkeit der Substanz ermittelt. Die Ergebnisse wurden mit denen des Nukleosidanalogen 3'-Azido-3'-deoxythymidin (AZT) verglichen.

In der Abbildung 1 wurden die ^3H -Thymidineinbauraten der mit HIV-1 und ohne Viruszugabe kultivierten MT-4-Zellen den Substanzverdünnungen gegenübergestellt. Dabei wurde der ^3H -Thymidineinbau (cpm) in die Zell-DNA gegen die Substanzkonzentration (nM) von (C) Fenalamid und (D) AZT aufgetragen. Die Zellen wurden mit Substanz in Anwesenheit (---) und in Abwesenheit von HIV-1 (- - -) kultiviert. Die für MT-4-Zellen maximale nicht toxische Substanzkonzentration, sowie die maximalen und therapeutischen Konzentrationen wurden aus den Graphiken ermittelt und in Tabelle 1 zusammengefaßt. Fenalamid A war bei einer Konzentration von 102 μM zelltoxisch.

Fenalamid A wurde bisher noch nicht stark genug ausverdünnt, so daß die minimale therapeutische Substanzkonzentration noch nicht bestimmt werden konnte. Fenalamid A zeigte noch in der Konzentration von 1,02 nM Anti-HIV-1-Wirksamkeit. In Tabelle 1 wird der Selektivitätsindex (SI) der untersuchten Substanz aufgeführt. Er beschreibt das Verhältnis der auf die MT-4-Zellen toxisch wirkenden Substanzkonzentration zu der Substanzkonzentration, bei der eine HIV-1-Infektion zu 100 % verhindert wird. Fenalamid A ist in seiner Fähigkeit, eine HIV-1-Infektion zu verhindern, mit der hohen Wirksamkeit von AZT mit einem SI von 10^4 zu vergleichen.

Tabelle 1: Vergleich der Toxizität und anti-HIV-1-Wirksamkeit der Reinsubstanz mit AZT.

Substanz	Tox ¹ nM	TE ² nM	SI ³
Fenalamid A	102 000	<1.02	>10 ⁵
AZT 250000	25	10 ⁴	

¹Tox: toxische Substanzkonzentration, bei der der ³H-Thymidineinbau in die MT-4-Zellen um 100 % reduziert ist.

²TE: geringste therapeutische Substanzkonzentration, bei der die HIV-1-Infektion um 100 % verhindert wird.

³SI: Selektivitätsindex = Quotient von Tox zu TE.

LITERATUR:

Harada, S., Purtilo, D.T., Koyanagi, Y., Sonnabend, J., Yamamoto, N. (1986). Sensitive assay for neutralizing antibodies against AIDS-related viruses (HTLV-III/LAV). J. Immunol. Meth. 92, 177-181.

Popovic, M., Sarngadharan, M. G., Read, E., Gallo, R. C. (1984). Detection, isolation and production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. Science 224, 497-500.

Wendler, I., Jentsch, K.D., Schneider, J., Hunsmann, G. (1987). Efficient replication of HTLV-III and STLV-IIImac in human Jurkat cells. Med. Microbiol. Immunol. 176, 273-280.

WO 92/11004

BUDAPESTER VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE
ANERKENNUNG DER HINTERLEGUNG VON MIKROORGANISMEN
FÜR DIE ZWECKE VON PATENTVERFAHREN

PCT/EP91/02503

PCT/EP 91 / 0 2 5 0 3

INTERNATIONALES FORMBLATT

Gesellschaft für
Biotechnologische Forschung
Geschäftsführung

Mascheroder Weg 1
3300 Braunschweig

EMPFANGSBESTÄTIGUNG BEI ERSTHINTERLEGUNG,
ausgestellt gemäß Regel 1.1 von der unten angegebenen
INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE

I. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS

Vom HINTERLEGER zugewiesenes Bezugszeichen:

MX 540

Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE
zugewiesene EINGANGSNUMMER:

DSM 6259

II. WISSENSCHAFTLICHE BESCHREIBUNG UND/ODER VORGESCHLAGENE TAXONOMISCHE BEZEICHNUNG

Mit dem unter I. bezeichneten Mikroorganismus wurde:

- () eine wissenschaftliche Beschreibung
(X) eine vorgeschlagene taxonomische Bezeichnung

eingereicht:

(Zutreffendes ankreuzen)

III. EINGANG UND ANNAHME

Diese internationale Hinterlegungsstelle nimmt den unter I bezeichneten Mikroorganismus an, der bei ihr
am 1990-11-29 (Datum der Ersthinterlegung) eingegangen ist.

IV. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE

Name: DSM DEUTSCHE SAMMLUNG VON
MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH

Anschrift: Mascheroder Weg 1 B
D-3300 Braunschweig

Unterschrift(en) der zur Vertretung der internationalen
Hinterlegungsstelle befugten Person(en) oder des (der) vor-
 ihr ermächtigten Bediensteten:

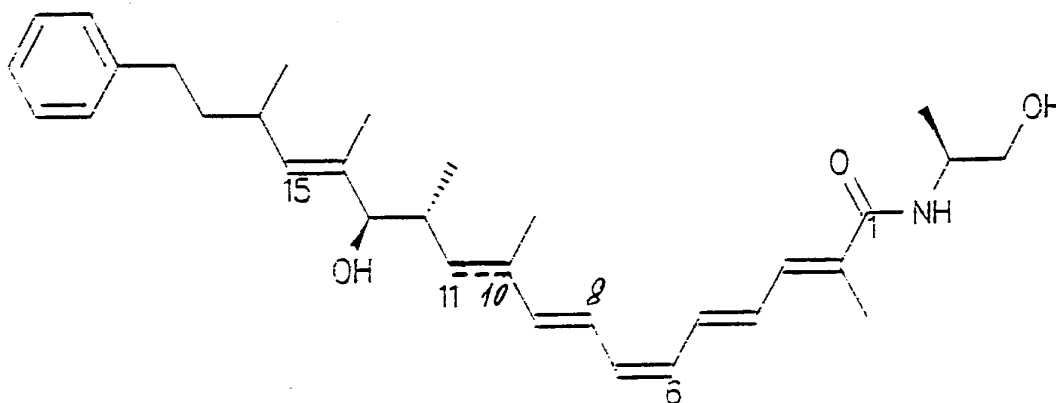


Datum: 1990-12-13

Falls Regel 6.4 Buchstabe d zutrifft, ist dies der Zeitpunkt, zu dem der Status einer internationalen Hinterlegungsstelle erworben wor-
den ist; wird eine außerhalb des Budapest-Vertrags vorgenommene Hinterlegung nach dem Erwerb des Status einer internationalen
Hinterlegungsstelle in eine Hinterlegung aufgrund des Budapest-Vertrages umgewandelt, so ist dies der Zeitpunkt, zu dem der Mikro-
organismus bei der internationalen Hinterlegungsstelle eingegangen ist.

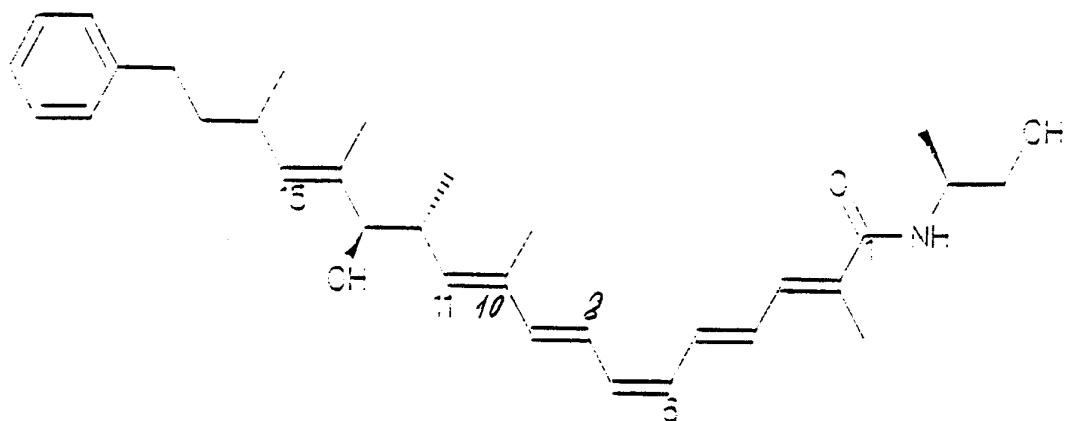
Patentansprüche

1. Therapeutische Mittel zur Bekämpfung von Viruserkrankungen, bestehend aus Fenalamiden der folgenden allgemeinen Formel oder enthaltend Fenalamide der folgenden allgemeinen Formel, gegebenenfalls neben üblichen Trägern und/oder Verdünnungsmitteln:

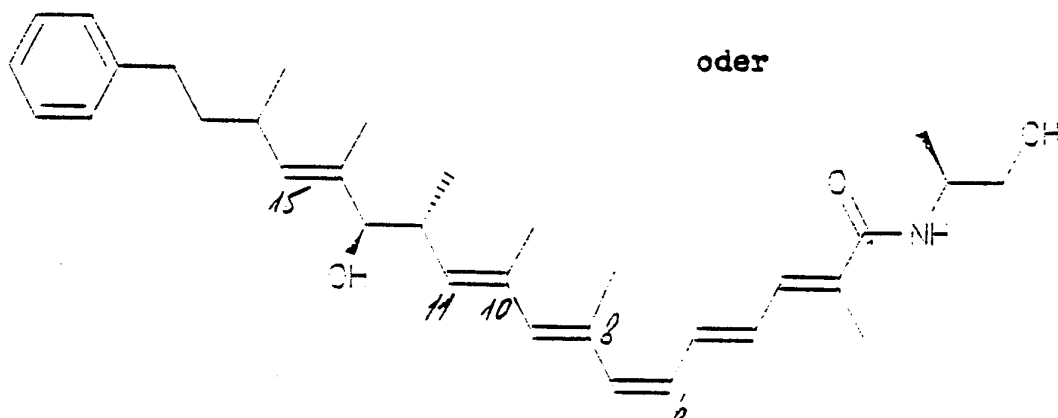


wobei die gestrichelte Linie zwischen dem C10- und dem C11-Atom eine (weitere) C-C-Bindung oder eine -O-Brücke sein kann und wobei das C8-Atom eine Methylgruppe tragen kann.

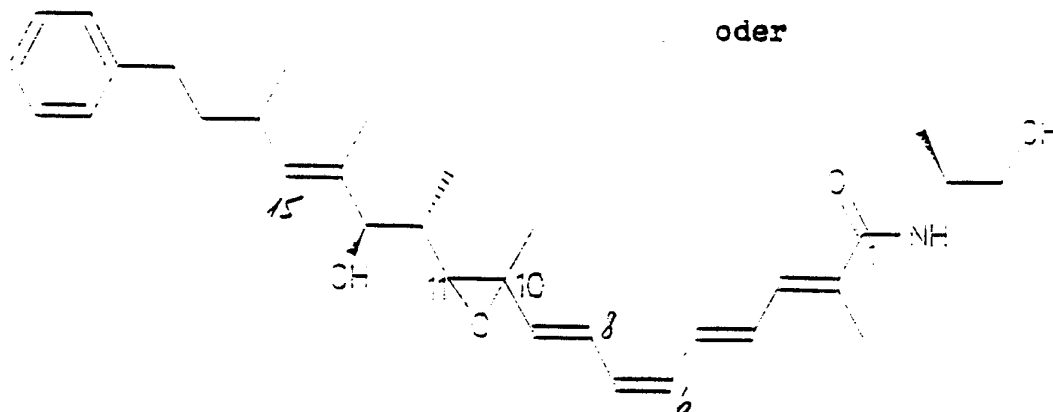
2. Therapeutische Mittel zur Bekämpfung von Viruserkrankungen, bestehend aus Fenalamiden der folgenden allgemeinen Formel oder enthaltend Fenalamide der folgenden allgemeinen Formel, gegebenenfalls neben üblichen Trägern und/oder Verdünnungsmitteln:



oder



oder



3. Therapeutisches Mittel zur Bekämpfung von Viruserkrankungen, bestehend aus Fenalamid mit einem oder mehreren der folgenden Parameter oder enthaltend Fenalamid mit einem oder mehreren der folgenden Parameter, gegebenenfalls neben einem üblichen Träger oder Verdünnungsmittel:

HPLC (Säule: Nucleosil-C₁₈, 5µ, 12.5 cm x 4 mm; Laufmittel: Methanol:Wasser = 85/15; Durchfluß: 1.5 ml/min; Detektion: Diodenarray-System HP 1040A) : Retentionszeit R_t = 6.5 min. -

UV (Methanol): $\lambda_{\max}$ ($\lg \epsilon$) = 356 nm (4.77)

$[\alpha]_D^{25} = -189^\circ$ ($c = 1$, in Methanol)

¹H-NMR (600 MHz, CD₃OD): δ = 7.24 [t, $J = 7.7$ Hz, 2H, meta-Protonen am Aromaten], 7.16 [d, $J = 7.2$ Hz, 2H, ortho-Protonen am Aromaten], 7.14 [t, $J = 7.3$ Hz, 1H, para-Proton am Aromat], 7.07 [dd, $J = 11.0$ und 14.5 Hz, 1H, 5-H], 7.02 [d, $J = 11.4$ Hz, 1H, 3-H], 7.73 [dd, $J = 10.6$ und 15.1 Hz, 1H, 8-H], 6.59 [dd, $J = 11.4$ und 14.5 Hz, 1H, 4-H], 6.40 [d, $J = 15.1$ Hz, 1H, 9-H], 6.14 [m, 2H, 6- und 7-H (durch 2D-H-COSY-Spektren ermittelt), 5.63 [d, $J = 9.7$ Hz, 1H, 11-H], 5.27 [d, $J = 9.6$ Hz, 1H, 15-H], 4.09 [dq, $J = 5.7$ und 12.4 Hz, 1H, 1'-H], 3.85 [d, $J = 6.7$ Hz, 1H, 13-H], 5.72 [dq, $J = 5.8$ und 11.0 Hz, 2H, 2'-H₂], 2.83 [m, 1H, 12-H], 2.64 [m, 1H, 18H_a], 2.52 [m, 1H, 18H_b], 2.45 [m, 1H, 16-H], 2.02 [d, $J = 0.8$ Hz, 3H, 2-CH₃], 1.89 [d, $J = 1.0$ Hz, 3H, 10-CH₃], 1.68 [m, 1H, 17-H_a], 1.62 [d, $J = 1.2$ Hz, 3H, 14-CH₃], 1.54 [m, 1H, 17-H_b], 1.23 [d, $J = 6.8$ Hz, 3H, 1'-CH₃], 1.00 [d, $J = 1.0$ Hz, 3H, 16-CH₃], 0.97 [d, $J = 6.9$ Hz, 3H, 12-CH₃]. -

EI-MS: m/z (%) = 491 (3) [M]⁺, 473 (6) [M-H₂O]⁺, 455 (2) [M-2 x H₂O], 289 (100) [C₁₈H₂₇NO₂], 271 (30) [$m/z = 289 - H_2O$]. -

Hochauflösung: gefunden 491.3381, für C₃₂H₄₅NO₃ ber. 491.3399

4. Therapeutisches Mittel zur Bekämpfung von Viruserkrankungen, bestehend aus Fenalamid mit einem oder mehreren der folgenden Parameter oder enthaltend Fenalamid mit einem oder mehreren der folgenden Parameter, gegebenenfalls neben einem üblichen Träger oder Verdünnungsmittel:

HPLC (Säule: Nucleosil-C₁₈, 5 μ , 12.5 cm x 4 mm; Laufmittel: Methanol:Wasser = 85/15; Durchfluß: 1.5 ml/min; Detektion: Diodenarray-System HP 1040A) : Retentionszeit R_t = 9.6 min. -

UV (Methanol): $\lambda_{\max}$ ($\lg \epsilon$) = 346 nm (4.70). -

¹H-NMR (600 MHz, [D₆]Aceton): δ = 7.24 [t, J = 7.6 Hz, 2H, meta-Protonen am Aromat], 7.16 [d, J = 6.9 Hz, 2H, ortho-Protonen am Aromat], 7.14 [t, J = 7.3 Hz, 1H, para-Proton am Aromat], 6.95 [d, J = 11.4 Hz, 1H, 3-H], 6.60 [dd, J = 11.4 und 14.6 Hz, 1H, 4-H], 6.55 [dd, J = 14.6 und 10.0 Hz, 1H, 5-H], 6.42 [dd, J = 15.3 und 10.0 Hz, 1H, 6-H], 6.41 [d, J = 15.3 Hz, 1H, 7-H], 6.02 [s, 1H, 9-H], 5.47 [d, J = 9.6 Hz, 1H, 11-H], 5.52 [d, J = 9.6 Hz, 1H, 15-H], 4.03 [m, 1H, 1'-H], 3.82 [d, J = 6.0 Hz, 1H, 13-H], 3.61 [m, 2H, 2'-H₂], 2.74 [m, 1H, 12-H], 2.61 [ddd, J = 5.5, 10.5 und 14.0 Hz, 1H, 18H_a], 2.50 [ddd, J = 6.5, 10.0 und 14.0 Hz, 1H, 18H_b], 2.44 [m, 1H, 16-H], 2.04 [d, J = 1.0 Hz, 3H, 2-CH₃], 1.96 [d, J = 1.1 Hz, 3H, 8-CH₃], 1.83 [d, J = 1.0 Hz, 3H, 10-CH₃], 1.62 [d, J = 1.1 Hz, 3H, 14-CH₃], 1.60 [m, 1H, 17-H_a], 1.51 [m, 1H, 17-H_b], 1.16 [d, J = 6.8 Hz, 3H, 1'-CH₃], 0.96 [d, J = 6.5 Hz, 3H, 16-CH₃], 0.95 [d, 6.8 Hz, 3H, 12-CH₃].-

EI-MS (Die Ionen im Molpeak-Bereich sind nur sehr schwach. Im Gesamtspektrum ist m/z = 91 Basis-Ion. Das Ion m/z 487 beträgt hiervon ca. 5 %, die angegebenen Prozentzahlen beziehen sich nur auf den genannten Massenbereich): m/z (%) = 505 (17) [M]⁺, 487 (100) [M-H₂O]⁺, 469 (74) [M-2 x H₂O], 454 (48) [M-2 x H₂O-CH₃].-

Hochauflösung: gef. 505.3550 für C₃₃H₄₇NO₃ ber. 505.3555

5. Therapeutisches Mittel zur Bekämpfung von Viruserkrankungen, bestehend aus Fenalamid mit einem oder mehreren der folgenden Parameter oder enthaltend Fenalamid mit einem oder mehreren der folgenden Parameter, gegebenenfalls neben einem üblichen Träger oder Verdünnungsmittel:

HPLC (Säule: Nucleosil-C₁₈, 5 μ , 12.5 cm x 4 mm; Laufmittel: Methanol:Wasser = 85/15; Durchfluß: 1.5 ml/min; Detektion: Diodenarray-System HP 1040A) : Retentionszeit R_t = 3.8 min. -

UV (Methanol): $\lambda_{\max}$ ($\lg \epsilon$) = 328 nm (4.63). -

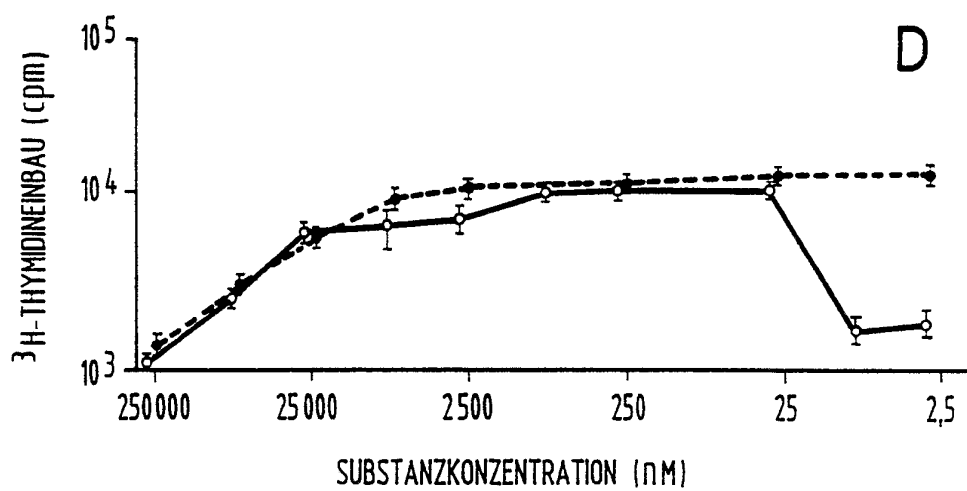
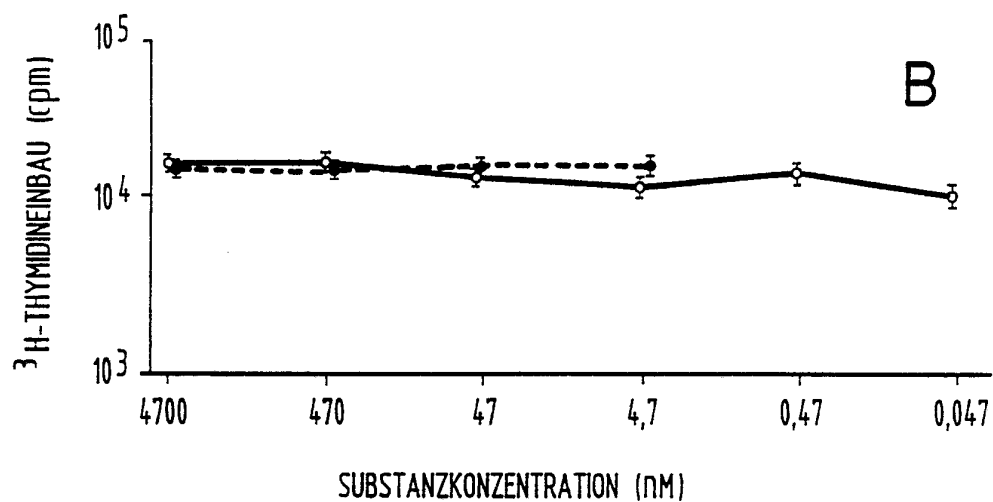
¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD): δ = 7.28 [t, J = 7.1 Hz, 2H, meta-Protonen am Aromat], 7.20 [d, J = 6.9 Hz, 2H, ortho-Protonen am Aromat], 7.18 [t, J = 7.1 Hz, 1H, para-Proton am Aromat], 6.96 [d, J = 11.0 Hz, 1H, 3-H], 6.60 [m, höherer Ordnung, 2H, 4- und 5-H], 6.64 [m, höherer Ordnung, 3H, 6-, 7- und 8-H], 5.35 [d, J = 9.6 Hz, 1H, 15-H], 4.08 [m, 1H, 1'-H], 3.92 [d, J = 10.4 Hz, 1H, 13-H], 3.62 [d, J = 9.8 Hz, 1H, 11-H], 3.57 [dq, J = 5.6 und 11.6 Hz, 2H, 2'-H₂], 2.65 [m, 3H, 12-, 18-H_a und 18 H_b], 2.51 [m, 2H, 18 H_b und 16-H], 2.01 [s, 3H, 2-CH₃], 1.69 [s, 3H, 14-CH₃], 1.61 [m, 1H, 17-H_a], 1.42 [s, 3H, 10-CH₃], 1.33 [m, 1H, 17-H_b], 1.23 [d, J = 7.2 Hz, 3H, 1'-CH₃], 1.02 [d, J = 6.8 Hz, 3H, 16-CH₃], 0.99 [d, J = 7.3 Hz, 3H, 12-CH₃]. -

EI-MS (Basis-Ion ist auch hier m/z = 91. Das Ion m/z 489 beträgt ca. 5 % des Basis-Ions): m/z (%) = 507 (84) [M]⁺, 489 (100) [M-H₂O]⁺, 474 (30) [M-H₂O-CH₃], 446 (69), 432 (76). -

Hochauflösung: gef. 507.3335, für C₃₂H₄₅NO₄ ber. 507.3348. -

6. Therapeutisches Mittel nach einem der vorhergehenden Ansprüche zur Bekämpfung von Erkrankungen durch Retroviren.

7. Therapeutisches Mittel nach Anspruch 6 zur Bekämpfung von HIV.



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/EP 91/02503

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (If several classification symbols apply, indicate all) * According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC Int. Cl. 5 A 61 K 31/165 C 07 C 235/32								
II. FIELDS SEARCHED Minimum Documentation Searched ⁷ <table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 25%; border-bottom: 1px solid black;">Classification System</td> <td style="border-bottom: 1px solid black;">Classification Symbols</td> </tr> <tr> <td style="padding: 5px;">Int. Cl. 5</td> <td style="padding: 5px;">C 07 C</td> </tr> </table> Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched *			Classification System	Classification Symbols	Int. Cl. 5	C 07 C		
Classification System	Classification Symbols							
Int. Cl. 5	C 07 C							
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT ⁹ <table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 10%; border-bottom: 1px solid black;">Category *</td> <td style="width: 60%; border-bottom: 1px solid black;">Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²</td> <td style="width: 30%; border-bottom: 1px solid black;">Relevant to Claim No. ¹³</td> </tr> <tr> <td style="height: 300px; vertical-align: top; padding: 10px;"> No citations. </td> <td></td> <td></td> </tr> </table>			Category *	Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²	Relevant to Claim No. ¹³	No citations.		
Category *	Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²	Relevant to Claim No. ¹³						
No citations.								
* Special categories of cited documents: ¹⁰ "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "&" document member of the same patent family								
IV. CERTIFICATION								
Date of the Actual Completion of the International Search March 4, 1992 (04.03.1992)	Date of Mailing of this International Search Report March 25, 1992 (25.03.1992)							
International Searching Authority EUROPEAN PATENT OFFICE	Signature of Authorized Officer							

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Ak. Zeichen

PCT/EP 91/02503

I. KLASSEIFIKATION DES ANMELDUNGSGEGENSTANDS (bei mehreren Klassifikationssymbolen sind alle anzugeben) ⁶		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC Int.C1.5 A 61 K 31/165 C 07 C 235/32		
II. RECHERCHIERTE SACHGEBIETE		
Recherchierter Mindestprüfstoff ⁷		
Klassifikationssystem	Klassifikationssymbole	
Int.C1.5	C 07 C	
Recherchierte nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Sachgebiete fallen ⁸		
III. EINSCHLAGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN ⁹		
Art. ^o	Kennzeichnung der Veröffentlichung ¹¹ , soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile ¹²	Betr. Anspruch Nr. ¹³
	Keine Entgegenhaltungen -----	
^o Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen ¹⁰ : "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt) "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist		
IV. BESCHEINIGUNG		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts	
04-03-1992	25. 03. 92	
Internationale Recherchenbehörde	Unterschrift des bevollmächtigten Bediensteten	
EUROPAISCHES PATENTAMT	Nicole De Bie	