(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
30. Mai 2003 (30.05.2003)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 03/043622 A1

(51) Internationale Patentklassifikation[7]: A61K 31/12, 35/64

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP02/12967

(22) Internationales Anmeldedatum:
20. November 2002 (20.11.2002)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
101 57 033.3 21. November 2001 (21.11.2001) DE

(71) Anmelder und
(72) Erfinder: **SEEBER, Siegfried** [DE/DE]; Wolfsbachweg 22, 45133 Essen (DE).

(72) Erfinder; und
(75) Erfinder/Anmelder *(nur für US)*: **HILGER, Ralf, Axel** [DE/DE]; Meisenweg 7, 58256 Eneppetal (DE). **DIAZ-CARBALLO, David** [DE/DE]; Hufelandstrasse 55 SHHI / App. 712, 45122 Essen (DE).

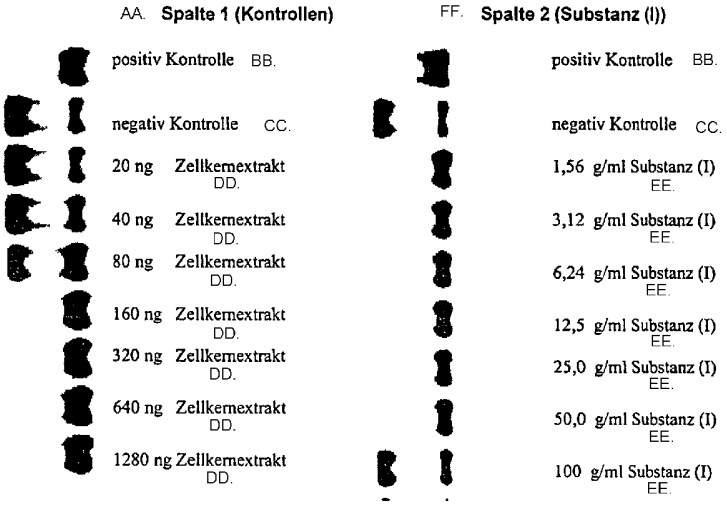
(74) Anwalt: **GESTHUYSEN, VON ROHR & EGGERT**; Huyssenallee 100, 45128 Essen (DE).

(81) Bestimmungsstaaten *(national)*: AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) **Title:** SUBSTITUTED BICYCLO[3.3.1]NONAN-2,4,9-TRIONES AS PHARMACEUTICAL ACTIVE INGREDIENTS

(54) **Bezeichnung:** SUBSTITUIERTE BICYCLO[3.3.1]NONAN-2,4,9-TRIONE ALS PHARMAZEUTISCHE WIRKSTOFFE



AA. COLUMN 1 (CONTROLS)
BB. POSITIVE CONTROL
CC. NEGATIVE CONTROL
DD. CELL NUCLEUS EXTRACT
EE. SUBSTANCE
FF. COLUMN 2 (SUBSTANCE (I))

(57) **Abstract:** The invention relates to the use of substituted bicyclo[3.3.1]nonan-2,4,9-triones, especially clusianon and clusianon derivatives, as pharmaceutical active ingredients or medicamentous active ingredients, especially for producing medicaments for the prophylactic and/or therapeutic (curative) treatment of tumour or cancer diseases, and of viral diseases. The above-mentioned compounds can be used in cytostatic agents and antiviral agents (virostatic agents). They are especially used as inhibitors of topoisomerases and telomerases and as regulators during the MAP kinase signal transduction and can thus intervene on a cellular scale in the mechanism for multiplication of tumour or cancer cells and viruses.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 03/043622 A1

(84) Bestimmungsstaaten *(regional)*: ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— *mit internationalem Recherchenbericht*

— *vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen*

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(57) Zusammenfassung: Beschrieben ist die Verwendung von substituierten Bicyclo[3.3.1]nonan-2,4,9-trionen, insbesondere Clusianon und Clusianonderivaten, als pharmazeutische Wirkstoffe bzw. Arzneimittelwirkstoffe, insbesondere zur Herstellung von Arzneimitteln zur prophylaktischen und/oder therapeutischen (kurativen) Behandlung von Tumor- bzw. Krebserkrankungen sowie von Viruserkrankungen. Die zuvor genannten Verbindungen können in Cytostatika und Antivirusmitteln (Virostatika) verwendet werden. Sie wirken insbesondere als Inhibitoren von Topoisomerasen und Telomerasen sowie als Regulatoren innerhalb der MAP-Kinase-Signaltransduktion und können auf diese Weise auf zellulärer Ebene in den Vermehrungsmechanismus von Tumor- bzw. Krebszellen und von Viren eingreifen.

Substituierte Bicyclo[3.3.1]nonan-2,4,9-trione als pharmazeutische Wirkstoffe

Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von substituierten Bicyclo[3.3.1]nonan-2,4,9-trionen, insbesondere Clusianon und Clusianonderivaten, als pharmazeutische Wirkstoffe bzw. Arzneimittelwirkstoffe, insbesondere zur Herstellung von Arzneimitteln zur prophylaktischen und/oder therapeutischen (kurativen) Behandlung von Tumor- bzw. Krebserkrankungen sowie von Viruserkrankungen. Gleichermaßen betrifft die vorliegende Erfindung substituierte Bicyclo[3.3.1]nonan-2,4,9-trione als pharmazeutisch wirksame Bestandteile von Arzneimitteln bzw. pharmazeutischen Zusammensetzungen, insbesondere Cytostatika und Antivirusmitteln (Virostatika). Des weiteren betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung von substituierten Bicyclo[3.3.1]nonan-2,4,9-trionen als Topoisomerase- und/oder Telomeraseinhibitoren sowie als Regulatoren innerhalb der MAP-Kinase-Signaltransduktion.

Tumor- bzw. Krebserkrankungen sind kein einheitliches Krankheitsbild, sondern Oberbegriffe für eine Vielzahl verschiedener Formen bösartiger, maligner Erkrankungen. Nahezu jedes Gewebe unseres Körpers kann krebsige Entartungen hervorbringen, manchmal sogar mehrere unterschiedliche Typen. Jedes der Leiden wiederum hat seine eigenen Merkmale. Die Ursachen, die zu diesen Erkrankungen führen, sind oftmals sehr heterogen.

Trotz dieser Verschiedenartigkeit entstehen nahezu alle Tumore bzw. krebsigen Entartungen durch sehr ähnliche, grundlegende molekulare bzw. zelluläre Prozesse. In den letzten zwei Jahrzehnten hat die Forschung erstaunliche Erkenntnisfortschritte erbracht, was die fundamentalsten Prozesse des Krebs- bzw. Tumorgeschehens auf molekularer Ebene anbelangt.

Träger der Erbinformationen sind die DNA-Moleküle der Chromosomen im Zellkern. Zwei Klassen von Genen, die zusammen nur einen kleinen Anteil der gesamten Ausstattung einer Zelle ausmachen, spielen für die Krebsentstehung eine wesentliche Rolle, nämlich insbesondere Proto-Onkogene (Krebsgen-Vorläufer) und Tumorsuppressor-Gene (tumorunterdrückende Gene). In ihrer normalen Form dirigieren sie den Lebenszyklus der Zelle, sie steuern die

verwickelte Abfolge von Vorgängen, durch die sich eine Zelle vergrößert und bei Bedarf teilt. Während Proto-Onkogene das Zellwachstum fördern, wird es durch Tumorsuppressor-Gene gebremst. Zusammen sind diese beiden Klassen von Genen für einen Großteil der unkontrollierten Zellvermehrungsprozesse in menschlichen Tumoren verantwortlich: Wenn z. B. ein Proto-Onkogen in der Regulator- oder in der Strukturregion mutiert, kann es passieren, daß nun zuviel von seinem wachstumsfördernden Protein hergestellt wird oder daß dieses nun übermäßig aktiv ist; aus dem Proto-Onkogen ist dann ein krebsbegünstigendes Onkogen geworden, das die Zellen zu übermäßiger Vermehrung anregt. Demgegenüber tragen Tumorsuppressor-Gene zur Krebsentstehung bei, wenn sie durch Mutationen inaktiviert werden; als Folge verliert die Zelle funktionsfähige Suppressor-Proteine und damit entscheidende Wachstumsbremsen, die sie normalerweise an einer unangemessenen Vermehrung hindern.

In normalen Körperzellen ist ein Notmechanismus gegen unbegrenzte Vermehrung eingebaut, es handelt sich dabei um eine Art Zählwerk, das jede Zellteilung registriert und nach einer bestimmten Anzahl von Generationen Einhalt gebietet. Nach einer bestimmten, in etwa voraussagbaren Zahl von Zellteilungen bzw. Verdoppelungen hört das Wachstum normaler Zellen auf. Dieser Prozeß wird als Zellalterung oder Seneszenz bezeichnet.

Für diesen Prozeß der Zellalterung oder Senenszenz auf molekularer Ebene verantwortlich sind die DNA-Segmente an den Enden der Chromosomen, die sogenannten Telomere. Sie registrieren sozusagen, wieviele Vermehrungszyklen eine Zellpopulation durchläuft und leiten ab einem bestimmten Zeitpunkt die Seneszenz bzw. die Krise ein. Dadurch begrenzen Sie die Fähigkeit einer Zellpopulation, uneingeschränkt zu wachsen. In den meisten, gesunden menschlichen Zellen verkürzen sich die Telomeren bei jeder Zellteilung um ein kleines Stück, wenn die Chromosomen repliziert werden. Sind sie auf eine bestimmte kritische Länge geschrumpft, ist das für die Zelle das Signal, in das Seneszenzstadium einzutreten; ignoriert die Zelle die Warnung, verkürzen sich die Telomere weiter, bis es schließlich zur Krise kommt: Bei extrem kurzen Telomeren verknüpfen sich Chromosomen miteinander oder zerbrechen, das angerichtete genetische Chaos ist für die Zelle tödlich.

Der Alterungs- bzw. Seneszenzprozeß in normalen Zellen, d. h. der Verlust des Teilungsvermögens, dem normale Zellen unterliegen, ist also dadurch bedingt, daß Chromosomen in normalen sterblichen Zellen etwa 50 bis 200 DNA-Nucleotide pro Zellteilung an ihren telomeren Enden verlieren. Der Verlust dieser endständigen Nukleotide (Telomere) hat die Funktion einer Art mitotischer Uhr, welche die Anzahl der Zellteilungen registriert. Der Erhalt der Telomeren scheint für Zellen erforderlich zu sein, um dem Seneszenzprozeß zu entkommen und sich undefiniert teilen zu können.

Der zuvor beschriebene Schutzmechanismus ist im Zuge der Entartung bei den meisten Krebs- bzw. Tumorzellen außer Kraft gesetzt, und zwar durch die Aktivierung eines Gens, das die Synthesevorschrift für ein Enzym namens Telomerase enthält. Dieses Enzym vervollständigt systematisch die sich sonst verkürzenden Telomerabschnitte, erhält sie dadurch auf Dauer und ermöglicht der Zelle eine quasi unbegrenzte Weiterteilung. Bei den meisten Tumor- bzw. Krebserkrankungen resultiert also die Unsterblichkeit der Zellen aus der Beibehaltung kurzer, aber stabiler Telomere aufgrund der Einwirkung von Telomerase. Die resultierende potentielle Unsterblichkeit der Zellen ist in mehrfacher Hinsicht ungünstig: Zum einen trägt sie dazu bei, daß ein Tumor sehr groß werden kann, und zum anderen gibt sie präkanzerösen oder bereits echten Krebszellen Zeit, weitere Mutationen anzuhäufen, die ihre Fähigkeiten steigern, sich zu vermehren, in andere Gewebe einzudringen und schließlich zu metastasieren.

Man hat herausgefunden, daß das unbegrenzte Zellwachstum entarteter Zellen in circa 80 % aller Tumorerkrankungen auf einer gestörten Regulation der Telomerase basiert. Die Behandlung von Tumor- bzw. Krebserkrankungen über Telomeraseinhibitoren scheint daher eine vielversprechende Therapie für diese Erkrankungen zu ermöglichen. Folglich wurde im Stand der Technik bereits vielfach der Versuch unternommen, Wirkstoffe zur Inhibierung von Telomerase zu entwickeln.

So wird beispielsweise in der WO 00/74667 A2 die Verwendung von Telomeraseinhibitoren (z. B. AZT) in Kombination mit einem die Telomerenzerstörung induzierenden Wirkstoff (z. B. Paclitaxel) zur Krebsbehandlung vorgeschlagen. Die WO 99/65875 A1 und die US-A-5 863 936 schlagen die Ver-

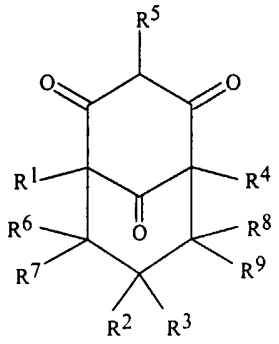
wendung spezieller heterobicyclischer Systeme als Telomeraseinhibitoren zur Therapie von Krebserkrankungen vor. Catechinderivate, wie sie in der europäischen Offenlegungsschrift EP 0 938 897 A1 beschrieben sind, sollen ebenfalls als Telomeraseinhibitoren zur Krebsbehandlung eingesetzt werden können.

Des weiteren wird gemäß dem Stand der Technik versucht, über andere Mechanismen auf molekularer bzw. zellulärer Ebene in die Vermehrung von Tumor- bzw. Krebszellen einzugreifen: So werden zur Behandlung von Tumor- bzw. Krebserkrankungen gemäß dem Stand der Technik vielfach Alkylierungsreagenzien eingesetzt, die über eine Alkylierung der DNA letztendlich eine direkte Schädigung der DNA der Tumor- bzw. Krebszellen induzieren (z. B. Cyclophosphamid, Ifosfamid, Carmustin, Chlorambucil etc.). Gleichermaßen kommen für die Tumor- bzw. Krebstherapie Substanzen zum Einsatz, die über die Inhibierung von Topoisomerasen in die Replikation der Tumor- bzw. Krebszellen eingreifen (z. B. Camptoceticin, 9-Aminocamptothecin, Irinotecan, Topotecan, Doxorubicin etc.) (vgl. beispielsweise Clive Page et al., Integrated Pharmacology, Mosby, 1997).

Während es – neben alkylierenden Wirkstoffen – einige Topoisomeraseinhibitoren in der Klinik gibt, gibt es zur Zeit in der Klinik keinen Wirkstoff zur Behandlung diverser Tumore, welcher über die Inhibition der Telomerase wirkt oder gar die Eigenschaften einer Inhibition der Topoisomerase und der Telomerase vereint.

Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung besteht somit in der Auffindung bzw. Bereitstellung von Wirkstoffen und Arzneimitteln, die sich insbesondere für die Behandlung von Tumor- bzw. Krebserkrankungen, gegebenenfalls aber auch von anderen Erkrankungen (z. B. Viruserkrankungen), eignen.

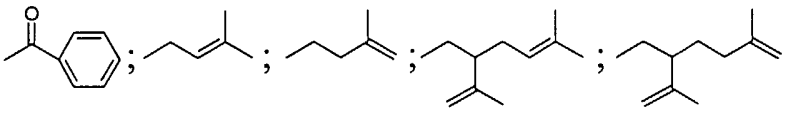
Der Anmelder hat nun überraschenderweise herausgefunden, daß substituierte Bicyclo[3.3.1]nonan-2,4,9-trione der allgemeinen Formel (I)



(I)

in der:

- R^1, R^2, R^4 und R^5, gleich oder verschieden, unabhängig voneinander eine der folgenden Gruppen darstellen:



jedoch mit der Maßgabe, daß, wenn einer der Reste R^1 oder R^2 oder R^4 oder R^5 eine Benzoylgruppe darstellt, keiner der anderen dieser Reste eine Benzoylgruppe darstellt;

- R^3 ein Wasserstoffatom darstellt;
- R^6 und R^7 beide jeweils eine Methylgruppe oder aber jeweils ein Wasserstoffatom darstellen und R^8 und R^9 beide jeweils eine Methylgruppe oder aber jeweils ein Wasserstoffatom darstellen,
  jedoch mit der Maßgabe, daß, wenn R^6 und R^7 Methylgruppen darstellen, R^8 und R^9 Wasserstoffatome sind und daß, wenn R^8 und R^9 Methylgruppen darstellen, R^6 und R^7 Wasserstoffatome sind;

und ihre physiologisch verträglichen Salze, Hydrate, Isomere, insbesondere Stereoisomere, Tautomere und Konstitutionsisomere, Derivate, Prodrugs und Metabolite sich insbesondere für die prophylaktische und/oder therapeutische (kurative) Behandlung von Tumor- bzw. Krebserkrankungen eignen.

Ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist somit die Verwendung der zuvor genannten Verbindungen der allgemeinen Formel (I) einschließlich ihrer physiologisch verträglichen Salze, Hydrate, Isomeren, insbesondere Stereoisomeren, Tautomeren und Konstitutionsisomeren, Derivate, Prodrugs und Metabolite zur Herstellung von Arzneimitteln zur prophylaktischen und/oder therapeutischen Behandlung von Tumor- und/oder Krebserkrankungen, und zwar von Menschen wie von Tieren, d. h. sowohl im Bereich der Human- als auch der Veterinärmedizin.

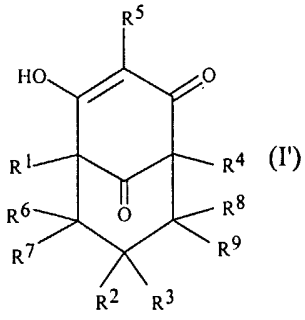
Physiologisch verträgliche bzw. unbedenkliche Salze der Verbindungen der allgemeinen Formel (I) können beispielsweise Salze mit Mineralsäuren, Carbonsäuren oder Sulfonsäuren sein; besonders bevorzugt sind z. B. Salze mit Chlorwasserstoffsäure, Bromwasserstoffsäure, Schwefelsäure, Phosphorsäure, Methansulfonsäure, Ethansulfonsäure, Toluolsulfonsäure, Benzolsulfonsäure, Naphthalindisulfonsäure, Essigsäure, Propionsäure, Milchsäure, Weinsäure, Zitronensäure, Fumarsäure, Maleinsäure oder Benzoesäure. Als physiologisch verträgliche bzw. unbedenkliche Salze können aber beispielsweise auch Salze mit üblichen Basen genannt werden, wie beispielsweise Alkalimetallsalze (z. B. Natrium- oder Kaliumsalze), Erdalkalisalze (z. B. Calcium- oder Magnesiumsalze) oder Ammoniumsalze, abgeleitet von Ammoniak oder organischen Aminen wie beispielsweise Diethylamin, Triethylamin, Ethyldiisopropylamin, Procain, Dibenzylamin, N-Methylmorpholin, Dihydroabiethylamin, 1-Ephenamin oder Methylpiperidin.

Die vorliegende Erfindung umfaßt auch die Hydrate der Verbindungen der allgemeinen Formel (I). Als Hydrate werden erfindungsgemäß solche Formen der Verbindungen der obigen allgemeinen Formel (I) bezeichnet, welche in festem oder flüssigem Zustand durch Hydratation mit Wasser eine Molekülverbindung (Hydrat) bilden. In den Hydraten sind die Wassermoleküle durch zwischenmolekulare Kräfte, insbesondere Wasserstoff-Brückenbindungen, angelagert. Feste Hydrate enthalten Wasser als sogenanntes Kristallwasser in stöchiometrischen oder nichtstöchiometrischen Verhältnissen, wobei die Wassermoleküle hinsichtlich ihres Bindungszustands nicht gleichwertig sein müssen. Beispiele für Hydrate sind Sesquihydrate, Monohydrate, Dihydrate, Trihydrate etc. Gleichermaßen kommen erfindungsgemäß auch die Hydrate von Salzen der Verbindungen der allgemeinen Formel (I) in Betracht.

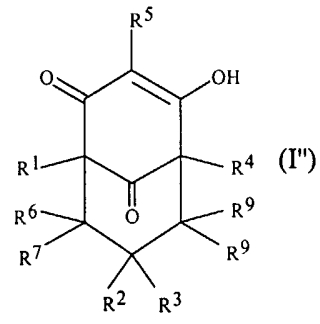
Die vorliegende Erfindung umfaßt auch die Isomere der Verbindungen der allgemeinen Formel (I). Der Begriff der Isomere im Sinne der vorliegenden Erfindung wird als umfassende Bezeichnung aller möglichen Isomerieformen verwendet. Nichtbeschränkende Beispiele für Isomere, die von der vorliegenden Erfindung mitumfaßt sind, sind insbesondere Stereoisomere, Tautomere und Konstitutionsisomere.

So können die Verbindungen der allgemeinen Formel (I) in Abhängigkeit von dem Substitutionsmuster in isomeren Formen vorkommen, insbesondere als Stereoisomere, z. B. entweder als sich wie Bild und Spiegelbild verhaltende Stereoisomere (Enantiomere) oder aber als sich nicht wie Bild und Spiegelbild verhaltende Stereosisomere (Diastereomere). Die vorliegende Erfindung umfaßt alle stereoisomeren Formen der Verbindungen der allgemeinen Formel (I), d. h. sowohl die Enantiomeren als auch die Diastereomeren wie auch deren jeweilige Mischungen. Die enantiomeren Formen lassen sich ebenso wie die Diastereomeren in an sich bekannter Weise in stereoisomer einheitliche Bestandteile trennen.

Weiterhin können die Verbindungen der allgemeinen Formel (I) in tautomeren Formen vorliegen. Dies ist dem Fachmann bekannt, und derartige Verbindungen sind ebenfalls vom Umfang der vorliegenden Erfindung mitumfaßt. Beispiele für tautomere Formen sind beispielsweise die folgenden Keto-Enol-Tautomere:



(I')



(I")

Wenn R^5 beispielsweise eine Benzoylgruppe darstellt, ist eine weitere Keto-Enol-Tautomerieform möglich.

Des weiteren können die Verbindungen der allgemeinen Formel (I) als Konstitutionsisomere, insbesondere Stellungsisomere (Substitutionsisomere), vor-

liegen. Dies ist dem Fachmann bekannt, und derartige Verbindungen sind ebenfalls vom Umfang der vorliegenden Erfindung umfaßt.

Die vorliegende Erfindung umfaßt auch Derivate der Verbindungen der allgemeinen Formel (I) (so z. B. Ether wie Alkylether, wie z. B. Methylether, die beispielsweise durch Alkylierung der tautomeren Formen (I') bzw. (I") erhalten werden können). Erfindungsgemäß besonders bevorzugte Derivate der Verbindungen der allgemeinen Formel (I) sind die pegylierten Derivate, insbesondere die Polyalkylenglykolether, vorzugsweise Polyethylenglykolether (PEG-Ether), der tautomeren Formen (I') und (I"). Des weiteren sind auch chemische Modifikationen möglich, insbesondere in bezug auf die Substituenten R^1 bis R^9 (z. B. durch Seitengruppenderivatisierung).

Gleichermaßen umfaßt die vorliegende Erfindung auch Prodrugs und Metabolite der Verbindungen der allgemeinen Formel (I). Als Prodrugs werden erfindungsgemäß insbesondere solche Formen der Verbindungen der obigen allgemeinen Formel (I) bezeichnet, welche selbst biologisch aktiv oder inaktiv sein können, jedoch in die entsprechende biologisch aktive Form überführt werden können (beispielsweise metabolitisch, solvolytisch oder auf andere Weise). Als Metabolite werden erfindungsgemäß insbesondere die aus dem Stoffwechsel resultierenden oder die im Stoffwechsel umgesetzten Produkte der Verbindungen der allgemeinen Formel (I) bezeichnet.

Die Verbindungen der allgemeinen Formel (I) sind Naturstoffe und sind beispielsweise erhältlich durch chromatographische Abtrennung aus dem Propolisextrakt karibischer Bienen. Propolis ist eine dunkelgelbliche bis hellbraune, harzartige, zwischen den Fingern erweichende Masse mit würzig-balsamischem Geruch, die von Bienen insbesondere von den Knospen von Blüten gesammelt und im Bienenstock als Überzug der Wände und zum Befestigen der Waben benutzt wird. Propolis ist chemisch sehr komplex aufgebaut und seine genaue Zusammensetzung ist von der jeweiligen lokalen Flora abhängig. Propolis enthält mehr als zweihundert verschiedene chemische Substanzen, hierunter größere Anteile Wachse und Harze, etherische und aromatische Öle sowie eine Vielzahl anderer chemischer Substanzen, hierunter beispielsweise Flavonoide, Kaffeesäurederivate und im Fall des karibischen Propolis auch die Verbindungen der allgemeinen Formel (I).

Des weiteren können die Verbindungen der allgemeinen Formel (I) auch direkt aus dem Pflanzensaft bzw. -harz (z. B. aus dem Harz, dem Latex, den Blättern, der Blüten etc.) verschiedener *Clusia*-Arten, Familie der Clusiaceae oder Guttiferae, isoliert werden (z. B. aus *Clusia grandiflora, Clusia rosea* oder *Clusia renggerioides*):

So beschreiben A. J. Marsaioli et al. "The Ecosystem of Microorganisms, Bees, and *Clusia* Floral Resin and Oils, from the Chemistry Point of View", Pure Appl. Chem., Band 70, 11, Seiten 2116 ff. (1998), C. M. A. de Oliveira et al. "Two polyisoprenylated benzophenones from the floral resins of three *Clusia* species", Phytochemistry 50 (1999), Seiten 1073-1079 und A. L. M. Porto et al. "Polyisopenylated benzophenones from *Clusia* floral resins", Phytochemistry 55 (2000), Seiten 755-768, die Isolierung verschiedener Clusianonderivate der obigen allgemeinen Formel (I) ausgehend von den Harzen bzw. Inhaltsstoffen verschiedener Pflanzen der Art *Clusia* (Familie der Clusiaceae oder Guttiferae) durch chromatographische Methoden (Umsetzung der Harze mit Diazomethan in Diethylether und anschließende Säulenchromatographie an einer mit Silicagel gepackten Säule mit Hexan/Ethylacetat oder Hexan/Diethylether als Eluiermittel (Gradientensäule), gefolgt von einer präparativen Dünnschichtchromatographie auf Silicagel/Silbernitrat mit Benzol/ Ethylacetat als Eluiermittel).

Die Isolierung des Clusianons selbst ausgehend von dem Harz von Pflanzen der Familie der Clusiaceae oder Guttiferae, nämlich *Clusia congestiflora*, und dessen Strukturaufklärung ist von L. E. McCandlish et al. "The Structures of Two Derivatives of Bicyclo[3.3.1]nonane-2,4,9-trione. A Natural Product: Clusianone, $C_{33}H_{42}O_4$, and Trimethylated Catechinic Acid, $C_{18}H_{20}O_6$" in Acta Cryst. (1976). B32, Seiten 1793-1801 beschrieben.

M. H. Santos et al. "Efeito de constituintes químicos extraídos do fruto de *Rheedia gardneriana* (bacupari) sobre bactérias patogênicas" in Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences (Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas), Band 35, Nr. 2, Juli/Dezember 1999, Seiten 297-301 und "Epiclusianon: A New Natural Product Derivative of Bicyclo[3.3.1]nonane-2,4,9-trione", Acta Cryst. (1998), C54, Seiten 1990-1992, beschreiben die Isolierung

von Epiclusianon aus dem Blütenextrakt von *Rheedia gardneriana* (bacuparí), einer Pflanze der Familie der Clusiaceae.

F. delle Monache et al. "Prenylated Benzophenones From *Clusia Sandiensis*", Phytochemistry, Band 30, Nr. 6, Seiten 2003-2005 (1991) beschreiben die Isolierung verschiedener Clusianonderivate ausgehend von dem Pflanzenharz von *Clusia Sandiensis* mittels chromatographischer Methoden (Säulenchromatographie, gefolgt von präparativer Dünnschichtchromatographie).

Der gesamte Offenbarungsgehalt der zuvor genannten Dokumente des Standes der Technik in bezug auf die Herstellung bzw. Isolierung der Verbindungen der allgemeinen Formel (I) wird hiermit durch Bezugnahme eingeschlossen.

Der Anmelder hat nun völlig überraschend herausgefunden, daß die Verbindungen der allgemeinen Formel (I) einschließlich ihrer physiologisch verträglichen Salze, Hydrate, Isomeren, insbesondere Stereoisomeren, Tautomeren und Konstitutionsisomeren, Derivate, Prodrugs und Metabolite ein nicht vorhersehbares, wertvolles pharmakologisches Wirkspektrum zeigen und sich daher zur Prophylaxe und/oder Behandlungen von Erkrankungen, insbesondere Krebs- bzw. Tumorerkrankungen aller Art, aber auch von Viruserkrankungen aller Art, eignen.

Die Verbindungen der allgemeinen Formel (I) einschließlich ihrer physiologisch verträglichen Salze, Hydrate, Isomeren, insbesondere Stereoisomeren, Tautomeren und Konstitutionsisomeren, Derivate, Prodrugs und Metabolite können folglich bevorzugt eingesetzt werden in Arzneimitteln zur Prophylaxe und/oder Behandlung von Erkrankungen, vorzugsweise von Tumor- und Krebserkrankungen (Cytostatika) und von Viruserkrankungen (Antivirusmittel bzw. Virostatika). Weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind somit auch pharmazeutische Zusammensetzungen oder Arzneimittel, insbesondere Cytostatika oder Antivirusmittel (Virostatika), die mindestens eine Verbindung der allgemeinen Formel (I), wie zuvor definiert, und/oder ihre physiologisch verträglichen Salze, Hydrate, Isomere, insbesondere Stereoisomere, Tautomere und Konstitutionsisomere, Derivate, Prodrugs und Metabolite, vorzugsweise in therapeutisch wirksamen Mengen, zusammen mit einem

pharmazeutisch verträglichen, im wesentlichen nichttoxischen Träger oder Exzipienten enthalten.

Der Anmelder hat überraschend herausgefunden, daß die Verbindungen der allgemeinen Formel (I) unter anderem als Topoisomeraseinhibitoren, insbesondere als Inhibitoren von Topoisomerase I, wirken. Des weiteren zeigen sie im allgemeinen auch eine telomeraseinhibitorische Wirkung. Letztendlich induzieren die erfindungsgemäß eingesetzten Verbindungen der allgemeinen Formel (I) die Zerstörung der DNA in Tumor- bzw. Krebszellen.

Die topoisomeraseinhibitorische und telomeraseinhibitorische Wirkung der erfindungsgemäß verwendeten Verbindungen der allgemeinen Formel (I) ist deutlich höher als bei den aus dem Stand der Technik bekannten Verbindungen. So zeigen beispielsweise die Verbindungen der allgemeinen Formel (I) in in-vitro-Versuchen eine erheblich stärkere Inhibition von Topoisomerase I als herkömmliche Therapeutika (z. B. Topotecan). Zusätzlich wirken die Verbindungen der allgemeinen Formel (I) auch als Regulatoren innerhalb der MAP-Kinase-Signaltransduktion.

Die Tatsache, daß die Verbindungen der allgemeinen Formel (I) die Eigenschaften der Inhibition von Topoisomerase und Telomerase vereinen, erklärt ihre wertvollen Eigenschaften und ihre besondere Eignung in bezug auf ihre Verwendung zur prophylaktischen und therapeutischen (kurativen) Behandlung von Tumor- und Krebserkrankungen aller Art (Primärtumore, Metastasen, Präkanzerosen bzw. Krebsvorstufen, benigne wie maligne Tumore etc.). Aus dem Stand der Technik dagegen ist kein Wirkstoff bzw. kein Präparat bekannt, welches die Eigenschaften der Inhibition von Topoisomerase einerseits und Telomerase andererseits in einem einzigen Molekül vereint.

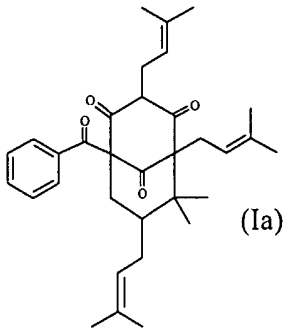
Die erfindungsgemäß verwendeten Wirkstoffe der allgemeinen Formel (I) zeigen nicht nur antitumorale Wirkung, sondern zusätzlich auch antimetastatische Wirkung.

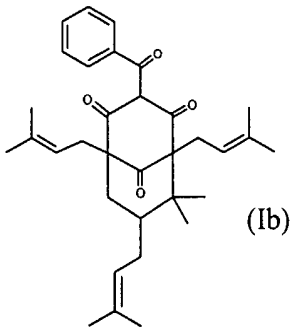
Die erfindungsgemäß verwendeten Wirkstoffe der allgemeinen Formel (I) zeigen überraschend auch gegenüber Karzinomen, welche gegen etablierte Chemotherapeutika definierte Resistenzen aufweisen, eine unerwartet gute

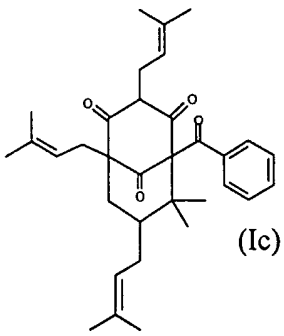
cytostatische Wirkung. Weiter wurden keine Resistenzen gegen die Wirkstoffe der allgemeinen Formel (I) beobachtet. Des weiteren haben die erfindungsgemäß verwendeten Wirkstoffe der allgemeinen Formel (I) den Vorteil, daß sie keine Kreuzresistenzen zu bereits etablierten Medikamenten bzw. Chemotherapeutika zeigen.

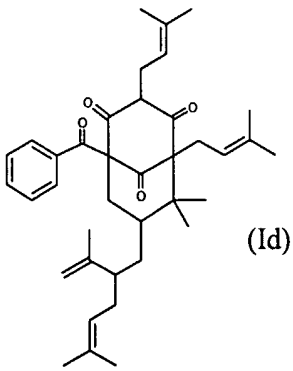
Als nicht beschränkende Beispiele für Tumor- bzw. Krebserkrankungen, für deren Behandlung die Verbindungen der allgemeinen Formel (I) eingesetzt werden können, lassen sich die folgenden Erkrankungen nennen: Darmkrebs (Kolonkarzinome), Brustkrebs (Mammakarzinome), Ovarialkarzinome, Uteruskarzinome, Lungenkrebs, Magenkrebs, Leberkrebs, Pankreaskarzinome, Nierenkrebs, Blasenkrebs, Prostatakrebs, Hodenkrebs, Knochenkrebs, Hautkrebs, Kaposi-Sarkome, Hirntumore, Myosarkome, Neuroblastome (z. B. Retinoblastome), Lymphome und Leukämien.

Erfindungsgemäß bevorzugt ist die Verwendung der folgenden Verbindungen der Formeln (Ia), (Ib), (Ic) und (Id) einschließlich ihrer physiologisch verträglichen Salze, Hydrate, Isomeren, insbesondere Stereoisomeren, Tautomeren und Konstitutionsisomeren, Derivate, Prodrugs und Metabolite:

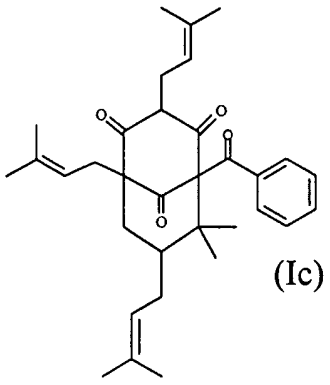

(Ia)


(Ib)


(Ic)

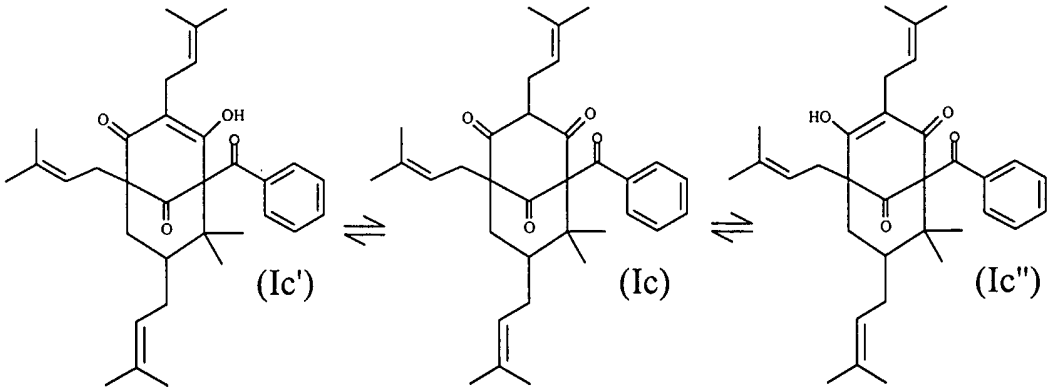

(Id)

Erfindungsgemäß besonders bevorzugt ist die Verwendung der folgenden Verbindung der allgemeinen Formel (Ic) einschließlich ihrer physiologisch verträglichen Salze, Hydrate, Isomeren, insbesondere Stereoisomeren, Tautomeren und Konstitutionsisomeren, Derivate, Prodrugs und Metabolite:



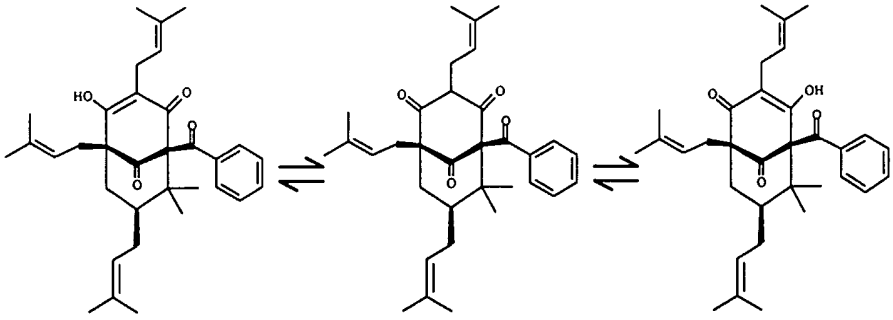
(Ic)

Die Verbindung der allgemeinen Formel (Ic) ist eines von mehreren Keto/Enol-Tautomeren, welche im Gleichgewicht nebeneinander vorliegen:



(Ic') (Ic) (Ic")

Erfindungsgemäß ganz besonders bevorzugt ist es, wenn die Verbindung der allgemeinen Formel (Ic) die folgende Konfiguration aufweist.



Der Anmelder hat weiterhin herausgefunden, daß es in bestimmten Fällen vorteilhaft sein kann, die Verbindungen der allgemeinen Formel (I) und/oder ihre physiologisch verträglichen Salze, Hydrate, Isomere, insbesondere Stereoisomere, Tautomere und Konstitutionsisomere, Derivate, Prodrugs und Metabolite in Kombination mit mindestens einem weiteren Chemotherapeutikum, insbesondere einem Proteinkinaseinhibitor, vorzugsweise einem MAP-Kinase-Inhibitor, einzusetzen bzw. zu verabreichen. Besonders gute Ergebnisse in der Therapie von Krebs- und Tumorerkrankungen können mit einer Kombination aus Verbindungen der allgemeinen Formel (I) und/oder ihrer physiologisch verträglichen Salze, Hydrate, Isomeren, insbesondere Stereoisomeren, Tautomeren und Konstitutionsisomeren, Derivaten, Prodrugs und Metabolite einerseits und einem Proteinkinaseinhibitor, vorzugsweise MAP-Kinase-Inhibitor, andererseits erzielt werden. Derartige Kombinationen wirken überraschenderweise synergistisch.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist somit auch eine pharmazeutische Kombination, insbesondere cytostatische Kombination, die

(A) mindestens eine Verbindung der allgemeinen Formel (I), wie zuvor definiert, und/oder ihre physiologisch verträglichen Salze, Hydrate, Isomere, insbesondere Stereoisomere, Tautomere und Konstitutionsisomere, Derivate, Prodrugs und Metabolite; und

(B) mindestens ein weiteres Chemotherapeutikum, insbesondere einen Proteinkinaseinhibitor, vorzugsweise MAP-Kinase-Inhibitor,

umfaßt.

Die einzelnen Komponenten (A) und (B) der erfindungsgemäßen Kombination können entweder gleichzeitig oder aber zeitlich abgestuft angewandt bzw. verabreicht werden. Die pharmazeutische Kombination kann die Komponenten (A) und (B) entweder als funktionelle Einheit, insbesondere in Form einer Mischung, eines Gemisches oder eines Gemenges, oder aber (räumlich) getrennt voneinander umfassen.

Proteinkinaseinhibitoren wirken, wie ihr Name schon sagt, inhibierend in bezug auf die Aktivität von Proteinkinasen, d. h. Enzyme, welche die γ-Phosphatgruppen von ATP auf Tyrosin- oder Serin- und Threonin-Seiten-

ketten übertragen. Für die erfindungsgemäße pharmazeutische Kombination und die erfindungsgemäße Kombinationstherapie insbesondere von Tumor- bzw. Krebserkrankungen eignen sich Proteinkinaseinhibitoren aller Art, z. B. alle aus dem Stand der Technik bekannten Proteinkinaseinhibitoren (z. B. bestimmte niedermolekulare heterocyclische Inhibitoren wie Staurosporin, 2'-Amino-3'-methoxyflavon, 1,4-Diamino-2,3-dicyano-1,4-[2-aminophenylthio]-butadien, SB 203580 von SmithKline Beecham etc.). Hierbei kann ein synergistischer Effekt beobachtet werden.

Für die erfindungsgemäße pharmazeutische Kombination und die erfindungsgemäße Kombinationstherapie von Tumor- bzw. Krebserkrankungen besonders bevorzugt ist die Verwendung von MAP-Kinase-Inhibitoren. MAP-Kinase-Inhibitoren wirken, wie ihr Name schon sagt, inhibierend in bezug auf die Aktivität von MAP-Kinasen (MAP = mitogen activated protein), d. h. Enzyme, welche insbesondere bei der Mitose aktiv sind und die endständigen Phosphatreste von Nucleotidtriphosphaten auf entsprechende Substrate übertragen. Auf diese Weise verhindern MAP-Kinase-Inhibitoren die Mitose und damit die Zellteilung von Krebs- bzw. Tumorzellen. Für die erfindungsgemäße pharmazeutische Kombination und die erfindungsgemäße Kombinationstherapie insbesondere von Tumor- bzw. Krebserkrankungen eignen sich MAP-Kinase-Inhibitoren aller Art, z. B. alle aus dem Stand der Technik bekannten MAP-Kinase-Inhibitoren. Beispiele für erfindungsgemäß einsetzbare MAP-Kinase-Inhibitoren sind z. B. in den folgenden Druckschriften genannt, deren gesamter Inhalt hiermit durch Bezugnahme eingeschlossen ist: WO 99/32111 A, WO 99/64400 A, WO 98/52941 A, WO 98/52937 A, WO 97/44467 A, WO 98/27098 A, WO 98/52558 A, WO 98/52940 A, WO 99/32110 A, WO 99/32463 A, WO 99/58502 A, WO 99/58523 A und WO 99/00357 A.

Des weiteren hat der Anmelder überraschend gefunden, daß die zuvor genannten Verbindungen der allgemeinen Formel (I) auch eine regulatorische Aktivität innerhalb der MAP-Kinase-Signaltransduktion zeigen, d. h. als Regulatoren innerhalb der MAP-Kinase-Signaltransduktion wirken.

Des weiteren eignen sich die Verbindungen der allgemeinen Formel (I) auch zur Behandlung von Viruserkrankungen bzw. als pharmazeutisch wirksame

Bestandteile von Antivirusmitteln (Virostatika) (z. B. zur Behandlung von Herpeserkrankungen oder HIV). Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist somit auch die Verwendung von Verbindungen der allgemeinen Formel (I), wie zuvor definiert, und ihrer physiologisch verträglichen Salze, Hydrate, Isomeren, insbesondere Stereoisomeren, Tautomeren und Konstitutionsisomeren, Derivate, Prodrugs und Metabolite zur prophylaktischen und/oder therapeutischen (kurativen) Behandlung von Viruserkrankungen aller Art.

Weiterhin betrifft die vorliegende Erfindung auch ein Verfahren zur Prophylaxe und/oder Behandlung von Erkrankungen des menschlichen oder tierischen Körpers, insbesondere Tumor- bzw. Krebserkrankungen oder Viruserkrankungen aller Art, unter Verwendung der Verbindungen der allgemeinen Formel (I) einschließlich ihrer physiologisch verträglichen Salze, Hydrate, Isomeren, insbesondere Stereoisomeren, Tautomeren und Konstitutionsisomeren, Derivate, Prodrugs und Metabolite in therapeutisch wirksamen Dosen bzw. Gaben, gegebenenfalls auch in Kombination mit weiteren Wirkstoffen, insbesondere Chemotherapeutika (z. B. Proteinkinaseinhibitoren wie beispielsweise MAP-Kinase-Inhibitoren).

Die erfindungsgemäß eingesetzten Wirkstoffe bzw. Wirkstoffkombinationen können, je nach Art der zur behandelnden Erkrankungen, systemisch oder aber auch topisch, insbesondere lokal, appliziert werden.

Für die Applikation der erfindungsgemäß eingesetzten Wirkstoffe bzw. Wirkstoffkombinationen kommen alle üblichen Applikationsformen in Betracht. Beispielsweise kann die Applikation oral, lingual, sublingual, bukkal, rektal oder parenteral (d. h. unter Umgehung des Intestinaltraktes, also intravenös, intraarteriell, intrakardial, intrakutan, subkutan, transdermal, intraperitoneal oder intramuskulär) erfolgen, insbesondere geeignet sind die orale und die intravenöse Applikation; ganz besonders bevorzugt ist die orale Applikation. Weiterhin ist eine topische Anwendung möglich (z. B. zur Behandlung von Melanomen).

Für die erfindungsgemäße Anwendung werden die Wirkstoffe bzw. Wirkstoffkombinationen in bekannter Weise in die üblichen Formulierungen überführt, wie z. B. Tabletten, Dragees, Pillen, Granulate, Aerosole, Sirupe, Emul-

sionen, Suspensionen, Lösungen, Salben, Cremes und Gele aller Art, insbesondere unter Verwendung inerter, im wesentlichen nichttoxischer, pharmazeutisch geeigneter Trägerstoffe oder Lösungsmittel. Des weiteren ist es möglich, die eingesetzten Wirkstoffe bzw. Wirkstoffkombinationen quasi in liposomale "Verpackungen" einzubringen, d. h. quasi eingebettet oder verkapselt in Liposomen, die ihrerseits gegebenenfalls weiter modifiziert sein können (z. B. verestert mit PEG). Hierbei können die erfindungsgemäß eingesetzten Wirkstoffe bzw. Wirkstoffkombinationen jeweils in einer therapeutisch wirksamen Konzentration, insbesondere in Konzentrationen von etwa 0,0001 bis etwa 99 Gew.-%, bevorzugt etwa 0,01 bis etwa 95 Gew.-%, der Gesamtmischung vorhanden sein, d. h. in Mengen, die ausreichend sind, um den angegebenen bzw. gewünschten Dosierungsspielraum zu erreichen. Trotzdem kann es gegebenenfalls erforderlich sein, von den zuvor genannten Mengen abzuweichen, und zwar in Abhängigkeit vom Körpergewicht bzw. von der Art des Applikationsweges, vom individuellen Verhalten gegenüber dem Medikament, von der Art der Formulierung und von dem Zeitpunkt bzw. Intervall, zu welchem die Verabreichung erfolgt. So kann es in einigen Fällen ausreichend sein, mit weniger als der vorgenannten Mindestmenge auszukommen, während in anderen Fällen die genannte obere Grenze überschritten werden muß. Im Fall der Applikation größerer Mengen kann es empfehlenswert sein, diese in mehreren Einzelgaben über einen definierten Zeitraum, z. B. über den Tag, zu verteilen.

Die Formulierungen werden beispielsweise hergestellt durch Verstrecken der Wirkstoffe bzw. Wirkstoffkombinationen mit Lösungsmitteln (z. B. Öle wie Rizinusöl) und/oder Trägerstoffen, gegebenenfalls unter Verwendung von Emulgiermitteln und/oder Dispergiermitteln, wobei z. B. im Fall der Benutzung von Wasser als Verdünnungsmittel gegebenenfalls organische Lösungsmittel als Hilfslösungsmittel verwendet werden können.

Je nach Applikationsart hat es sich als vorteilhaft erwiesen, die erfindungsgemäß eingesetzten Wirkstoffe bzw. Wirkstoffkombinationen in Mengen von etwa 0,0001 bis etwa 500 mg/kg Körpergewicht, insbesondere etwa 0,0001 bis etwa 100 mg/kg, vorzugsweise 0,01 bis 50 mg/kg, zur Erzielung wirksamer Ergebnisse zu verabreichen. Trotzdem kann es gegebenenfalls erforderlich sein, von den zuvor genannten Mengen abzuweichen, und zwar in Ab-

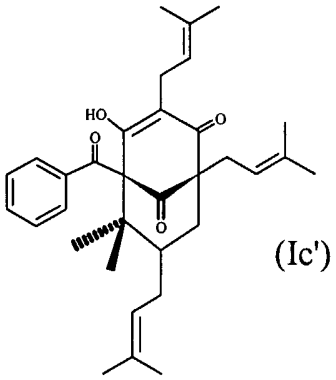
hängigkeit vom Körpergewicht bzw. von der Art des Applikationsweges, vom individuellen Verhalten gegenüber dem Medikament, von der Art der Formulierung und von dem Zeitpunkt bzw. Intervall, zu welchem die Verabreichung erfolgt. So kann es in einigen Fällen ausreichend sein, mit weniger als der vorgenannten Mindestmenge auszukommen, während in anderen Fällen die genannte obere Grenze überschritten werden muß. Im Falle der Applikation größerer Mengen kann es empfehlenswert sein, diese über einen definierten Zeitraum, z. B. über den Tag, zu verteilen, und zwar z. B. in mehreren Einzelgaben oder als Dauerapplikation (z. B. Dauerinfusion). Gleichermaßen ist die Anwendung in einer chronischen Therapie (z. B. in Tablettenform) möglich.

Weitere Ausgestaltungen, Abwandlungen und Variationen der vorliegenden Erfindung sind für den Fachmann beim Lesen der Beschreibung ohne weiteres erkennbar und realisierbar, ohne daß er dabei den Rahmen der vorliegenden Erfindung verläßt.

Die vorliegende Erfindung wird anhand der folgenden Ausführungsbeispiele veranschaulicht, welche die vorliegende Erfindung jedoch keinesfalls beschränken.

AUSFÜHRUNGSBEISPIELE

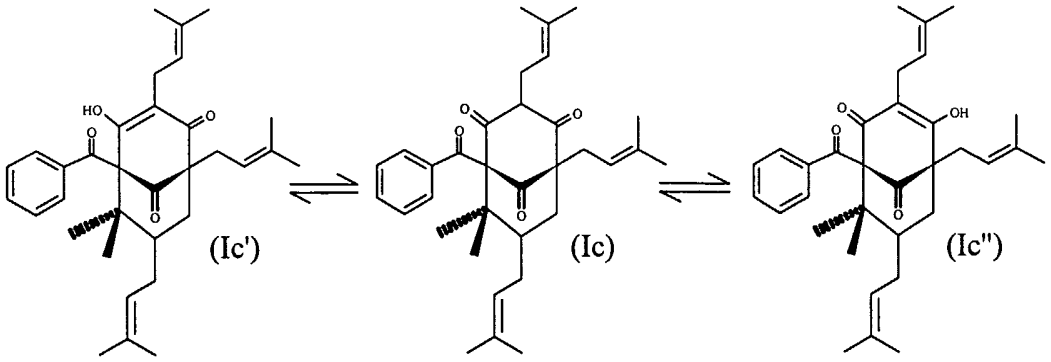
1-Benzoyl-8,8-dimethyl-2-hydroxy-3,5,7-tris-(3-methyl-2-butenyl)-bicyclo-[3.3.1]non-2-en-4,9-dion (Ic') aus dem Propolisextrakt karibischer Bienen



(Ic')

Im folgenden wird die Isolierung der Verbindung der Formel (Ic') und ihre physiologische Wirksamkeit beschrieben.

Die Verbindung der Formel (Ic') liegt im tautomeren Gleichgewicht mit den Strukturen der Formeln (Ic) und (Ic") vor:



(Ic') (Ic) (Ic")

Der Einfachheit halber wird im folgenden aber nur noch von der Verbindung der Formel (Ic') die Rede sein.

Herstellung von Propolis-Lösungen

Propolis, gesammelt von Bienenstöcken in der Karibik, wird in Ethanol aufgenommen, die unlöslichen Wachse mittels Filtration abgetrennt. Definierte Volumina werden getrocknet, das resultierende Pulver zu einer definierten Konzentration in Ethanol resuspendiert. Die Lösungen werden bei Raumtemperatur unter Lichtausschluß gelagert.

Semipräparative HPLC-Fraktionierung der Propolis-Lösungen

Die Fraktionierung erfolgt mit einer RP-HPLC-Anlage der Firma Waters GmbH (Eschborn) (Waters the Separator Module Alliance 2690, Waters PDA 996 Detektor, Waters Millennium Chromatography Manager). Die Fraktionierung gelingt auf einer Trennsäule der Firma Macherey-Nagel (Nucleosil 100-7 C18, 250 x 21 mm) unter Benutzung eines Gradientensystems bei 40 °C (Tabelle 1). Die wäßrige Phase besteht aus einer 0,01 M Ammoniumformiatlösung (pH = 7.00).

Tabelle 1: Gradientensystem

Zeit (min)	Flußrate (ml/min)	Ammoniumformiat %	Methanol %	Acetonitril %
0	4	50	30	20
80	4	10	70	20
180	4	0	80	20
190	4	0	80	20
200	4	50	30	20
210	4	50	30	20

Die so gewonnenen Fraktionen zu je 8 ml (2 min) werden getrocknet und in Methanol resuspendiert und unter Ausschluß von Licht bei Raumtemperatur gelagert.

Zur Überprüfung der Cytotoxizität der einzelnen Fraktionen werden vergleichbare Volumina in einem Medium verdünnt und in dem im folgenden beschriebenen SRB-Assay untersucht. Als Zielzelle wird unter anderem eine Darmkrebszell-Linie humanen Ursprungs (HCT8 WT) verwendet.

Reinigung der cytotoxischen Fraktion

Die im SRB-Test cytotoxisch wirkende Fraktion wird einer weiteren Reinigung unterzogen. Dazu wird das Gradientenelutionssystem der Polarität der zu reinigenden Fraktion angepaßt. Nach erneuter Fraktionierung und Überprüfung der mittels präparativer RP-HPLC erhaltenen Fraktionen im SRB-Test kann eine einheitliche Substanz (Ic') isoliert werden. Die Reinheit der Substanz (Ic') wird anhand UV-spektroskopischer Daten belegt (Fig. 1b). Als analytische Trennsäule wird eine Waters Symmetry Säule, gefüllt mit einer modifizierten C18-Phase (250 mm x 4,6 mm), gewählt. Das Ergebnis ist in Fig. 1a dargestellt.

Fig. 1a zeigt ein repräsentatives Chromatogramm der Substanz (Ic') aus der analytischen RP-HPLC (Reinheitsüberprüfung) bei 254 nm, Flußrate = 1 ml/min, T = 40 °C, Gradientensystem wie angegeben. Die obere Linie entspricht der Konzentration an Methanol (%), die mittlere Linie der Konzentration an wäßriger Phase (%, Ammoniumformiat 0,01M). Die Konzentration an Acetonitril (%) wird konstant auf 5 % gehalten (untere Linie).

Fig. 1b zeigt die PDA-Daten der in Fig. 1a gezeigten Analytik. Die Substanz (Ic') wird als einheitliche Fraktion gewonnen. Das UV-Spektrum unter diesen Elutionsbedingungen weist zwei Maxima auf (254 und 308 nm).

Strukturaufklärung

Die erste Isolierung und Charakterisierung der Verbindung der allgemeinen Formel (Ic') erfolgt ohne weitere Derivatisierung (z. B. mit Diazomethan). Die ethanolischen Extrakte von Propolis (gesammelt in der Karibik) können, wie zuvor beschrieben, mittels RP-HPLC Analytik gereinigt werden, wodurch die Verbindung der Formel (Ic') erstmals in seiner nichtderivatisierten Form zur Verfügung für weitere NMR-spektroskopische Untersuchungen gestellt werden kann, und zwar in ausreichend hoher Reinheit (> 98 %; LC-MS; UV-spektroskopische Untersuchungen mittels LC-PDA; MS).

Zur weiteren Bestätigung der Struktur wird die Verbindung der Formel (Ic') durch Umsetzung mit Diazomethan in die korrespondierenden Methylether überführt. Die O-methylierten Verbindungen werden im Verhältnis 40/60 isoliert (RP-HPLC).

Die Ergebnisse der NMR-Untersuchungen (^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR, DEPT135, DEPT90, HMQC, HMBC, H,H-COSY90 (gs), 1D-NOE-Differenzspektrum) sind im folgenden tabellarisch angegeben:

- DEPT steht für **D**istortionless **E**nhancement by **P**olarization **T**ransfer.
- COSY steht für **CO**rrelated **S**pectroscop**Y**. Dabei ist im allgemeinen das ^{1}H,^{1}H-COSY gemeint, welches nach seinem "Erfinder" auch Jeener-Experiment genannt wird und die erste 2D-Impulssequenz in der Geschichte der NMR darstellt.
- HMQC steht für **H**eteronuclear **M**ultiple **Q**uantum **C**oherence.
- HMBC steht für **H**eteronuclear **M**ultiple-**B**ond **C**orrelation.
- NOE steht für **N**uclear **O**verhauser **E**ffekt.

Fig. 1c, 1d und 1e sind ^{1}H-NMR-Spektren der Verbindung (Ic') (Meßfrequenz: 500 MHz, Lösemittel: CD_3OD).

Fig. 1f stellt ein ^{13}C-NMR-Spektrum der Verbindung (Ic') (Meßfrequenz: 125 MHz, Lösemittel: CD_3OD) dar.

Fig. 1g stellt ein ^{13}C-DEPT-Spektrum der Verbindung (Ic') (Meßfrequenz: 125 MHz, Lösemittel: CD_3OD) dar; die CHs und CH_3s zeigen nach oben, während die CH_2s nach unten zeigen.

Fig. 1h, 1i, 1j und 1k sind H,H-COSY-Spektren der Verbindung (Ic') (Meßfrequenz: 500 MHz, Lösemittel: CD_3OD).

Fig. 1l bis 1r sind HMBC-Spektren der Verbindung (Ic') (Meßfrequenz: 125 MHz, Lösemittel: CD_3OD).

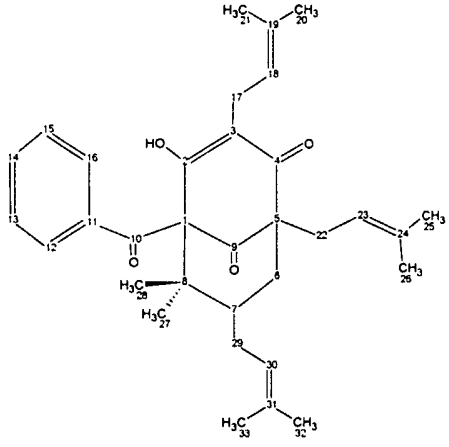
Tabelle 1a: NMR-Daten der Verbindung (Ic')

Verbindung der Formel (Ic') in CD_3OD			
C#	δ ^{13}C, ppm	HMBC Korrel. mit H#	δ ^{1}H, ppm
1	78.75	27, 28	-
2	186.30 (br)	17	-
3	119.83	17	-
4	185.20 (br)	22, 17, 6a	-
5	62.74	**22**, 6a, 6e	-
6	42.34	7, **22**, 29	1.98 (1H, dd, 4.5 u. 13.1 Hz, eq) 1.35 (1H, t, overlap, 13.1 Hz, ax.)
7	44.46	27, 28	1.83
8	48.24	6e, 27, 28	-
9	211.72	22, 6e	-
10	196.39	12, 16	-
11	138.87	13, 15	-
12	129.66	14, 16	7.65 (1H)
13	128.54	15	7.22 (1H)
14	132.74	12, 16	7.39 (1H)
15	128.54	13	7.22 (1H9
16	129.66	12, 14	7.65 (1H)
17	22.9	18(w)	3.10 (1H, dd, J=14 u. 7 Hz) 3.05 (1H, dd, J=14, u. 7 Hz)
18	124.07	17(w), 20, 21	5.15 (1H, tm, J=7 u. 1.4 Hz)
19	131.81	20	-
20	26.26	18, 21	1.68 (3H, s)
21	17.96	18, 20	1.63 (3H, s)
22	30.73		2.47 (1H, dd, J=15 u. 7 Hz) 2.44 (1H, dd, J=15 u. 7 Hz)
23	121.88	22, 25, 26	5.02 (1H, m)
24	134.09	22, 25, 26	-
25	26.03	23, 26	1.63 (3H, s)
26	18.28	23, 25	1.63 (3H, s)
27	24.51	28	1.35
28	16.42	27	1.08

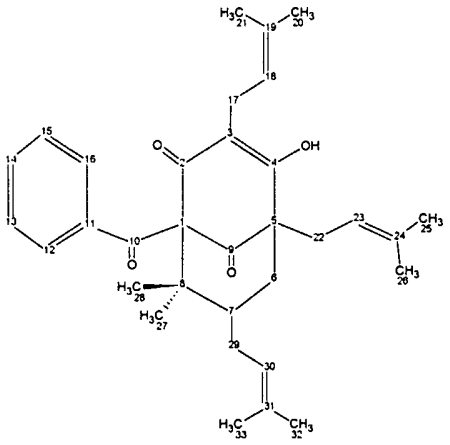
29	28.42		2.13 (1H, m) 1.70 (1H, m, overlap)
30	124.41	32, 33	5.02 (1H, m)
31	133.68	32, 33	-
32	26.05	30, 33	1.58 (3H, s)
33	18.20	30, 32	1.67 (3H, s)

H,H-COSY: H6a-H7, H6e-H7, H7-H29, H7-H29‘ (w) = weak, (br) = broad

Dementsprechend liegt die nichtderivatisierte Verbindung der Formel (Ic') bzw. (Ic") bzw. (Ic) in einem Keto/Enol-Gleichgewicht vor, was sowohl durch die chemische Verschiebung der Signale, als auch durch die Breite der ^{13}C-Signale der C-Atome 2 und 4 bestätigt wird.



(Ic')



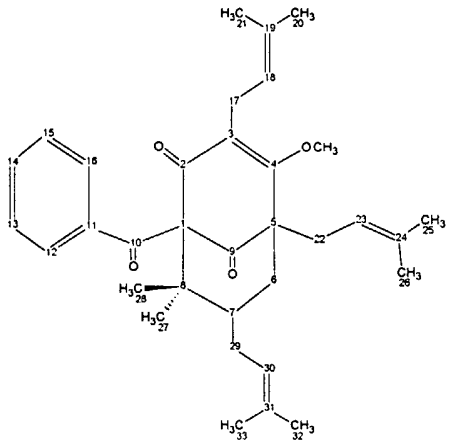
(Ic")

Tabelle 1b: NMR-Daten des Methylethers (II)

Verbindung der Formel (II) in $CDCl_3$			
C#	δ ^{13}C, ppm	HMBC Korrel. mit H#	δ ^{1}H, ppm
1	79.25	27, 28	-
2	194.07	17	-
3	126.80	17	-
4	173.07	17, 22, 6a, OMe	-
5	59.81	22, 6a(w)	-
6	40.22	22, 29(w)	2.00 (1H, dd, J=3.7 u. 13.4 Hz, eq) 1.45 (1H, dd, J=12.2 u. 13.4 Hz, ax)
7	43.70	27, 28, 29, 6a(w)	1.68
8	48.83	27, 28, 6e	-
9	207.28	22, 6e	-
10	193.06	12, 16	-
11	136.26	13, 15	-
12	128.57	14, 16	7.42 (1H)
13	127.73	15	7.20 (1H)
14	131.89	12, 16	7.35 (1H)
15	127.73	13	7.20 (1H)
16	128.57	12, 14	7.42 (1H)
17	23.29		3.23 (1H, dd, J=15.2 u. 6.9 Hz) 3.14 (1H, dd, J=15.2 u. 6.9 Hz)
18	121.32	17, 20, 21	5.00 (1H, m)
19	133.03	17, 20, 21	
20	26.02	18, 21	1.67 (3H, s)
21	18.09	18, 20	1.63 (3H, s)
22	29.78		2.57 (1H, dd, J=14.3 u. 7 Hz) 2.42 (1H, dd, J=14.3 u. 7 Hz)
23	119.51	22, 25, 26	5.00 (1H, m)
24	134.36	22, 25, 26	-
25	25.68	23, 26	1.63 (3H, s)
26	17.87	23, 25	1.61 (3H, s)
27	23.42	28	1.33 (3H, s)
28	15.72	27	1.11 (3H,s)

29	26.72		2.14 (broad) (1H, dd, 6.5 u. 12.4 Hz) 1.70 (1H, overlap)
30	122.58	32, 33	4.98 (1H, m)
31	133.49	32, 33	-
32	25.79	30, 33	1.66 (3H, s)
33	17.87	30, 32	1.56 (3H, s)
CH_3-O	62.39		3.99 (3H, s)

H,H-COSY: H6a-H7, H7-H29 (w) = weak



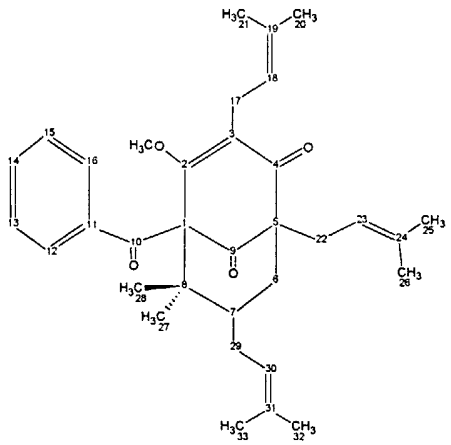
(II)

Tabelle 1c: NMR-Daten des Methylethers (III)

Verbindung der Formel (III) in $CDCl_3$			
C#	δ ^{13}C, ppm	HMBC Korrel. mit H#	δ ^{1}H, ppm
1	73.97	27, 28	-
2	169.95	17, OMe	-
3	123.22	17	-
4	197.14	17, 22, 6a	-
5	65.17	7, 22	-
6	43.16	22, (w)	1.925 (1H, dd, J=3.8 u. 12.9 Hz, eq) 1.42 (1H, t, J=12.9 Hz, ax)
7	42.53	27, 28, 29, 6a	1.66
8	47.86	27, 28, 6e	-
9	207.91	22, 6e	-
10	193.14	12, 16	-
11	137.03	13, 15	-
12	128.41	14, 16	7.59 (1H)
13	127.94	15	7.28 (1H)
14	132.08	12, 16	7.41 (1H)
15	127.94	13	7.28 (1H)
16	128.41	12, 14	7.59 (1H)
17	23.25	18 (w)	3.32 (1H, dd, J=15.7 u. 6.8 Hz) 3.21 (1H, dd, J=15.7 u. 6.8 Hz)
18	121.54	17, 20, 21	4.97 (1H, m)
19	133.02	17, 20, 21	
20	25.85	18, 21	1.66 (3H, s)
21	18.02	18, 20	1.65 (3H, s)
22	29.48		2.55 (1H, dd, J=14 u. 7 Hz) 2.45 (1H, dd, J=14 u. 7 Hz)
23	119.69	22, 25, 26	4.99 (1H, m)
24	134.44	22, 25, 26	-
25	25.64	23, 26	1.66 (3H, s)
26	18.15	23, 25	1.65 (3H, s)
27	24.46	28	1.32 (3H, s)
28	16.17	27	1.16 (3H,s)

29	27.68		2.07 (1H, m) 1.66 (1H, overlap)
30	122.54	32, 33	4.89 (1H, m)
31	133.23	32, 33	-
32	26.00	30, 33	1.65 (3H, s)
33	17.86	30, 32	1.53 (3H, s)
CH_3-O	61.54		3.44 (3H, s)

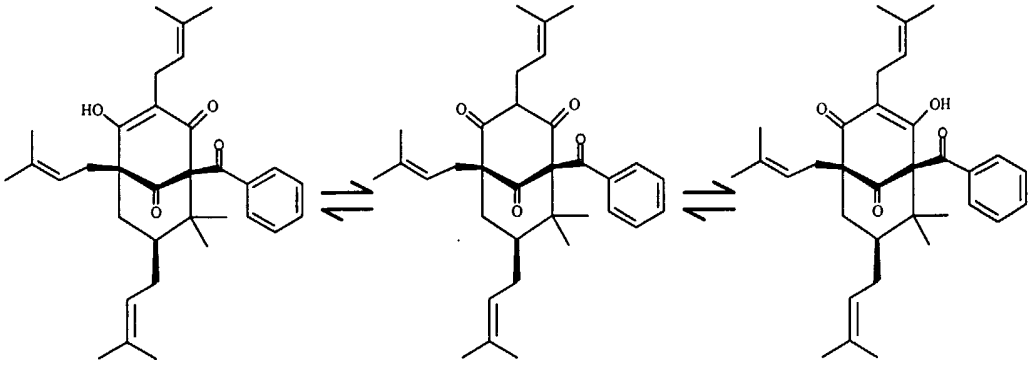
H,H-COSY: H6a-H7, H6e-H7, H7-H29 (w) = weak



(III)

Absolutkonfiguration

Aufgrund der zuvor aufgeführten NMR-Daten konnte der Verbindung der allgemeinen Formel (Ic) bzw. (Ic') bzw. (Ic") die folgende Absolutkonfiguration zugeordnet werden:



Zellkulturen

Sechs eindeutig charakterisierte tumorale Zell-Linien humanen Ursprungs (native wie auch in resistente Subklone überführte Zell-Linien) sowie zwei nichttumorale Zell-Linien werden für weitere Untersuchungen herangezogen (Tabelle 2).

Tabelle 2: Zell-Linien, histologische Charakterisierung der Zell-Linien und ihre Herkunft

Zell-Linie	Histologische Charakterisierung	RF	Quelle
M 51 **M51 DDP**	Magenkarzinom Cisplatin-resistent	 8,5	Hannover Medizinische Fakultät
HT29 WT **HT29 24R** **HT29 SN38**	Kolonadenokarzinom 5-FU-resistent SN38-resistent	 3,7 3,6	ATCC HTB 38 Universität Essen Medizinische Fakultät
HCT8 WT **HCT8 SN38** **HCT8 ICID**	Kolonkarzinom SN38-resistent Raltitrexed-resistent	 6,9 2,9	ATCC CCL24 Universität Essen Medizinische Fakultät
MCF-7 WT **MCF-7 AD** **MCF-7 24R**	Brustadenokarzinom Doxorubicin-resistent gp 170+ 5-FU-resistent	 222 6,5	ATCC HTB 22 Roswell Park Cancer Institute
A2780 WT **A2780 DX5** **A2780 CP2**	Eierstockadenokarzinom Doxorubicin-resistent gp 170+ Cisplatin-resistent	 15,6 15,0	Roswell Park Cancer Institute
H460 WT	Großzelliges Lungenkarzinom		ATCC HTB 117
3T3	Mäusefibroblasten		ATCC CCL 163
MCR-5	Diploide embryonale Lungenfibroblasten		ATCC CCL 171

SRB-Test

Die Sensitivität der Zell-Linien gegenüber der Substanz (Ic') wird in einem sogenannten Sulphorhodamin B (SRB)-Test ermittelt. Hierbei handelt es sich um ein robustes und hoch reproduzierbares Standardverfahren, wie es auch z. B. am NCI (National Cancer Institute, USA) etabliert ist (Skehan et al. 1990).

Die Ergebnisse der Tests sind in der Tabelle 3 wiedergegeben. Die Konzentration an Substanz (Ic'), welche das Zellwachstum um 50 % inhibiert (IC_{50}, ermittelt aus halblogarithmischer Dosis gegen Wirkungskurven) sind angegeben. Als Ergebnis werden in der Tabelle 3 Mittelwerte und ihre Standardabweichungen von mindestens drei unabhängigen Experimenten dargestellt. Es gibt keine Kreuzresistenz zu den angegebenen Cytostatika. Gegenüber den nichttumoralen Zell-Linien (Fibroblasten der 3T3- und MCR 5- Linien) erweist sich die Substanz (Ic') als wesentlich weniger cytotoxisch.

Tabelle 3: Ermittelte IC_{50}-Konzentrationen an Substanz (Ic') in den unterschiedlichen Zell-Linien.

Zell-Linie	Substanz (Ic') IC_{50} (µg/ml)
M51 WT	5,70 ± 0,21
M51 DDP	4,77 ± 0,13
HT29 WT	5,25 ± 0,43
HT29 24R	5,18 ± 0,76
HT29 SN38	3,50 ± 1,40
HCT8 WT	4,23 ± 0,19
HCT8 SN38	4,07 ± 0,08
HCT8 ICID	4,44 ± 0,13
MCF-7 WT	4,37 ± 0,12
MCF-7 AD	4,28 ± 0,08
MCF-7 24R	3,30 ± 0,51
A2780 WT	9,20 ± 0,82
A2780 DX5	6,75 ± 1,55
A2780 CP2	6,23 ± 0,12
H460 WT	4,21 ± 0,91
3T3	> 80, 0
MCR-5	21,73 ± 6,47

Untersuchungen zur Inhibition der Topoisomerase I

Um den Effekt der Substanz (Ic') auf die Topoisomerase I zu untersuchen, wird der sogenannte "Topo I unwinding" Test durchgeführt. Der Test beruht auf einer ATP-unabhängigen "unwinding" (Entknäuelung) von verdrillter pBR322-Plasmid-DNA-Dimeren durch die Topoisomerase I. Die beiden verschiedenen topologischen Formen der Plasmid-DNA, die verdrillte Form und die entknäuelte, relaxierte Form, werden bei dieser Untersuchung mittels eines Agarosegels getrennt. Das Enzym Topoisomerase I wird dazu aus Zellkernextrakten der tumoralen Zell-Linien gewonnen.

Gewinnung der Zellkernextrakte

Zellkernextrakte werden entsprechend der Methode von Sullivan mit den Modifikationen von Danks et al. gewonnen.

Inhibition der Topoisomerase I-Aktivität durch Substanz (Ic')

Wie in Fig. 3 (Spalte 1: Kontrollen) gezeigt, werden 160 ng Zellkernextrakt mit der darin enthaltenen Topoisomerase I benötigt, um die hochverdrillten pBR322-Plasmid-DNA-Dimeren (Negativkontrolle) in die relaxierte Topologie (Positivkontrolle) zu überführen. Die Substanz (Ic') inhibiert die Topoisomerase I-Aktivität zu 100 % bei einer Konzentration von 100 µg/ml. Dies entspricht einem 20fachen der benötigten Konzentration, die das tumorale Wachstum der korrespondierenden Zell-Linien zu 50 % inhibiert (IC_{50}, Fig. 2). Vergleicht man diese Daten mit der in-vitro-inhibitorischen Aktivität von z. B. Topotecan, so wird für diese bereits in der Klinik etablierte Substanz, das 1000fache der IC_{50} benötigt. Fig. 3 veranschaulicht die Inhibition der Topoisomerase I-Aktivität durch Substanz (Ic').

Zellzyklusanalysen

Die bisher beschriebenen Wirkungen der Substanz (Ic') auf das Zellwachstum lassen sich auch mit Veränderungen im Zellzyklus belegen. Durchflußcytometrische Untersuchungen nach einer angepaßten Methode von Tsugita M. et al. werden zur Analyse herangezogen.

Exponentiell wachsende HCT8 WT-Darmkrebszellen werden mit der Substanz (Ic') mit der ermittelten IC_{50}-Konzentration für 24 Stunden behandelt,

danach werden die Zellen mit BrdU inkubiert. Die mit Methanol fixierten Zellen werden einer Behandlung mit einem Detergens (Triton X-100/HCl) unterworfen, um die DNA-Stränge zu denaturieren. Nach Inkubation mit dem fluoreszenzmarkierten Antikörper (anti-BrdU mAb, FITC-markiert) wird der zweite Fluoreszenzfarbstoff (PI, Propidiumiodid) hinzugegeben.

Der Gehalt an DNA (Propidiumiodid-Fluoreszenz) und die Menge an aufgenommenem BrdU (FITC-Fluoreszenz) werden mittels eines Durchflußcytometers der Firma Coulter bestimmt (Coulter EPICS XL). Beispielhafte Ergebnisse sind in Fig. 4a und 4b dargestellt.

Die Fig. 4a und 4b zeigen BrdU- und PI-Aufnahmen in die DNA von HCT8 WT-Zellen, nicht behandelt (Kontrolle, Fig. 4a) und mit Substanz (Ic') behandelt (IC_{50}, 24 Stunden, Fig. 4b). Die dargestellten Ergebnisse sind repräsentativ für n = 3 unabhängige Experimente.

Offensichtlich führt die Behandlung mit Substanz (Ic') zu einer Inhibition der Synthese-Phase. Dies wird anhand der Abbildungen zum DNA-Gehalt (Abb. 4a und 4b, BrdU-Aufnahme) deutlich.

Analyse der DNA-Degradation

Die Untersuchungen zum Nachweis der Degradation der DNA durch die Substanz (Ic') werden beispielhaft an humanen Zellen eines Bronchialkarzinoms (H460 WT) und eines kolorektalen Karzinoms (HT29 WT) durchgeführt. DNA, isoliert nach Behandlung der Zellen für unterschiedliche Dauer mit der Substanz (Ic'), wird dazu gelelektrophoretisch analysiert.

Die Bestimmung der Doppelstrangbrüche der DNA gelingt an ^{14}C-markierter DNA. Dazu werden [^{14}C]d-Thymidin gelabelte Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen an Substanz (Ic') behandelt. Die Isolierung der DNA erfolgt nach einer angepaßten Methode von Chia Chiao et al.

Nach Bestimmung der Menge und der Reinheit der isolierten DNA mittels eines GeneQuant Spektrophotometers werden vergleichbare Mengen an DNA mittels eines Agarosegels aufgetrennt. Die gelelektrophoretisch aufgetrennte DNA wird anschließend mit Ethidiumbromid angefärbt.

Auf einem Tansilluminator (302 nm) wird die nicht im elektrischen Feld gewanderte intakte DNA von der fragmentierten und damit in das Gel einge-

wanderten DNA durch Extraktion getrennt. Die isolierten Gel- bzw. DNA-Fragmente werden bei + 80 °C in Anwesenheit von Salzsäure verflüssigt. Nach Zugabe eines Szintillators kann die Radioaktivität mittels eines Flüssigszintillationsmeßgerätes (TPI-CARB 2100RT) bestimmt werden. Die gemessene Radioaktivität wird in Zerfälle pro Minute (cpm) angegeben.
In Fig. 5 ist die Induktion der Doppelstrangbrüche durch die Substanz (Ic') nach Inkubation von bronchialen Karzinomzellen (H480 WT) für 6 Stunden gezeigt. Fig. 5 zeigt DNA-Doppelstrangbrüche, nachgewiesen in [^{14}C]d-Thy-gelabelten H460 WT- Zellen, ausgelöst durch die Behandlung mit Substanz (Ic') für 6 Stunden. Die Ergebnisse stellen Mittelwerte und ihre Standardabweichung aus n = 3 unabhängigen Experimenten dar.

Durch die Behandlung der Tumorzellen mit bis zu einem 10fachen der ermittelten IC_{50}-Konzentration werden innerhalb von 6 Stunden signifikante Mengen an Doppelstrangbrüchen induziert, welche offensichtlich schon bei der IC_{50}-Konzentration nicht mehr ausreichend durch die Tumorzellen repariert werden und somit den Zelltod einleiten.

In Fig. 6 ist ein weiteres Beispiel der Induktion von Doppelstrangbrüchen in der DNA von Tumorzellen, hier Zellen eines kolorektalen Tumors (HT29 WT), aufgezeigt. Wie schon bei der Zell-Linie des Bronchialkarzinoms, werden offensichtlich substantielle Mengen an Doppelstrangbrüchen induziert, welche nicht wieder durch die Reparaturmechanismen der Tumorzelle korrigiert werden können und letztendlich mit ein auslösender Faktor für die Apoptose, den programmierten Zelltod der Tumorzelle darstellt.

Bestimmung der inhibitorischen Aktivität von Substanz (Ic') auf die humane Telomerase

Um die Wirkung der Substanz (Ic') auf die humane Telomerase zu bestimmen wird der sogenannte "Telomeric Repeat Amplification Assay" (TRAP)-ELISA, basierend auf der Methode von N. W. Kim et al., durchgeführt.

Diese Methode basiert auf der Nutzung der Polymerasen-Kettenreaktion (PCR). Dabei wird in einem ersten Schritt mittels der Telomerase-Aktivität eine Anzahl von (GGTTAG)-Motiven an das 3'-Ende eines mittels Biotin markierten Oligonukleotids (TS = Telomerase-Substrat) angehängt. In einem zweiten Schritt werden die so verlängerten Produkte mittels der PCR-Technik

unter Nutzung von TS- und RP- (R = reverse) Primern vervielfältigt. Auf diese Art und Weise wird eine "Leiter" von Produkten in Inkrementen zu 6 Basen (Startgröße = 50 Nukleotide) generiert. Während der Vervielfältigung wird DNP-markiertes dCTP in die PCR-Produkte eingebaut. Die Detektion und Quantifizierung der synthetisierten Telomeraseprodukte mittels einer "Sandwich ELISA"-Methode sind ein Maß für die enzymatische Aktivität der Telomerase.

Die Produkte der Telomerase tragen die mittels Biotin markierten TS-Primer und binden an der Oberfläche von Mikrotiterplatten, welche vorher mit Streptavidin beschichtet werden. Ein anti-DIG Antikörper, konjugiert mit POD, bindet an die während der Vervielfältigung eingebauten DNP-markierten Nukleotide. Nach Zugabe des Substrates TMB wird über die einsetzende Farbreaktion durch das Enzym POD die Aktivität der Telomerase fluoreszenzspektroskopisch sichtbar gemacht. Dabei ist die gemessene Absorption direkt proportional zur Aktivität der Telomerase.

Effekt der Substanz (Ic') auf die Aktivität humaner Telomerase

Um die Wirkung der Substanz (Ic') auf die Telomerase sicherzustellen, muß eine Wirkung der Substanz (Ic') auf die DNA-Polymerase ausgeschlossen werden. In einem Vorexperiment mit TSR8 als interne Kontrolle wurde die Wirkung von Substanz (Ic') bei verschiedenen Konzentrationsstufen ausgeschlossen.

Die Vervielfältigung des TSR8 Templates ist nur von der DNA-Polymerase abhängig. Jeder Inhibitor dieses Enzyms kann mit diesem Substrat nachgewiesen werden.

Fig. 7 zeigt die Ergebnisse des Vorexperiments mit dem TSR8-Template. Das Experiment wird in Triplikaten durchgeführt. Fig. 7 belegt, daß selbst die maximal eingesetzte Konzentration von 50 µg/ml der Substanz (Ic') in diesem Experiment nicht zu einer signifikanten Inhibition der Taq-Polymerase führt.

Das Experiment zur Untersuchung einer Inhibition der Telomerase durch die Substanz (Ic') wird in Fig. 8 gezeigt. Dargestellt ist der Konzentrationsbereich zwischen 10 und 50 µg/ml. Eine komplette Inhibition humaner Telomerase wird bei einer Konzentration von 50 µg/ml beobachtet. Fig. 8 zeigt die Ergeb-

nisse des TRAP-Assays: Dosisabhängige Inhibition humaner Telomerase, gewonnen aus Zellen eines Kolonkarzinoms (HCT8 WT), durch die Substanz (Ic'). Die Ergebnisse stellen Mittelwerte und Standardabweichungen dreier unabhängiger Experimente dar.

Phosphorylierung von ERK1/2 (MAP-Kinase-Pathway)

Die Phosphorylierung bestimmter Signaltransduktionswege spielt eine essentielle Rolle bei der Regulation von Zellwachstum bzw. Genexpression. Das Protein ERK1/2 (MAP-Kinase) gehört zu dem MAP-Kinase-Signaltransduktionsweg.

Die Behandlung humaner Kolonkarzinomzellen (HCT8 WT) mit der Substanz (Ic') führt zu einer Phosphorylierung dieses Proteins, welches in einer Western-Blot-Analyse nachgewiesen wird (Fig. 9). Fig. 9 zeigt die Western-Blot-Analyse des ERK1/2-Proteins; in der unteren Zeile ist die Ladungskontrolle mitgeführt.

Die Behandlung der Zellen mit der Substanz (Ic') führt dosisabhängig zu einer Phosphorylierung des ERK1/2-Proteins. Schon ab einer Dosis der IC_{50} entsprechend läßt sich die Phosphorylierung durch die Substanz (Ic') belegen. Als Resultat dieses – bisher in der Literatur als Aktivierung gedeuteten – Prozesses wird die Tumorzelle in einen Zellzyklusarrest geschickt, was durch die durchgeführten Zellzyklusanalysen belegt wird (s. o.).

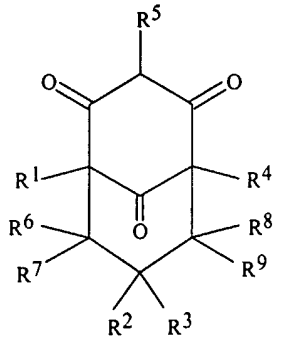
Zur Überprüfung dieser Befunde, inwieweit die erzielten Ergebnisse hinsichtlich einer ERK1/2-Aktivierung durch die Substanz (Ic') durch Zugabe eines ERK1/2-Inhibitors antagonisierbar sind, wird ein Koinkubationsexperiment mit der Substanz (Ic') und einem spezifischen ERK1/2-Inhibitor (MAP-Kinase-Inhibitor) durchgeführt. Dabei werden Tumorzellen, z.B. Kolonkarzinomzellen (HCT8 WT), mit beiden Wirkstoffen in jeweils unterschiedlichen Dosierungen für 24 Stunden koinkubiert (Fig. 10). Fig. 10 gibt das Koinkubationsexperiment zur Cytotoxizität mit der Substanz (Ic') und einem spezifischen ERK1/2-Inhibitor (MAP-Kinase-Inhibitor) wieder. Koinkubiert wurden HCT8 WT-Zellen. Die gezeigten Punkte geben die entsprechenden Verhältnisse (% der jeweiligen IC_{50}-Konzentration) beider Wirkstoffe zueinander an.

Dieses derart durchgeführte Experiment führt aber in keinem Dosierungsverhältnis zu einer Aufhebung der gemessenen Cytotoxizität. Vielmehr ist ein ausgeprägter Synergismus bei der Koinkubation beider Wirkstoffe zu verzeichnen.

Alle Dosierungskombinationen liegen unterhalb der Winkelhalbierenden, und damit im Bereich eines eindeutigen Synergismus. Die Kombination von 30 % der IC_{50}-Konzentration von Substanz (Ic') mit einer Wirkstoffkonzentration von 30 % der IC_{50}-Konzentration des spezifischen ERK1/2-Inhibitors führt zu einer Wachstumsinhibition der Tumorzellen, isoliert aus einem Kolonkarzinom (HCT8 WT).

Patentansprüche:

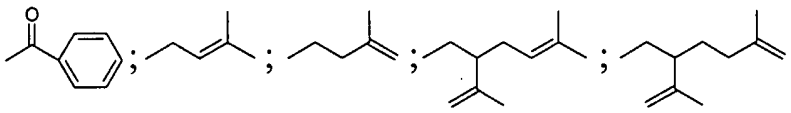
1. Verwendung substituierter Bicyclo[3.3.1]nonan-2,4,9-trione der allgemeinen Formel (I)



(I)

in der:

- R^1, R^2, R^4 und R^5, gleich oder verschieden, unabhängig voneinander eine der folgenden Gruppen darstellen:

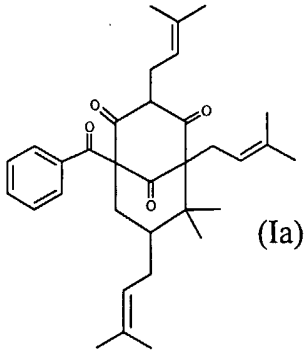


jedoch mit der Maßgabe, daß, wenn einer der Reste R^1 oder R^2 oder R^4 oder R^5 eine Benzoylgruppe darstellt, keiner der anderen dieser Reste eine Benzoylgruppe darstellt;

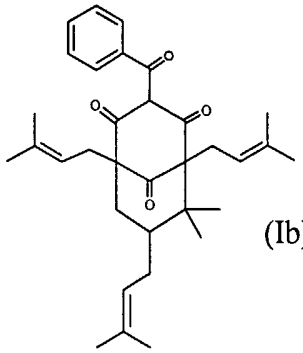
- R^3 ein Wasserstoffatom darstellt;
- R^6 und R^7 beide jeweils eine Methylgruppe oder aber jeweils ein Wasserstoffatom darstellen und R^8 und R^9 beide jeweils eine Methylgruppe oder aber jeweils ein Wasserstoffatom darstellen,
  jedoch mit der Maßgabe, daß, wenn R^6 und R^7 Methylgruppen darstellen, R^8 und R^9 Wasserstoffatome sind und daß, wenn R^8 und R^9 Methylgruppen darstellen, R^6 und R^7 Wasserstoffatome sind;

und ihrer physiologisch verträglichen Salze, Hydrate, Isomeren, insbesondere Stereoisomeren, Tautomeren und Konstitutionsisomeren, Derivate, Prodrugs und Metabolite zur Herstellung von Arzneimitteln zur prophylaktischen und/oder therapeutischen Behandlung von Tumor- und/oder Krebserkrankungen.

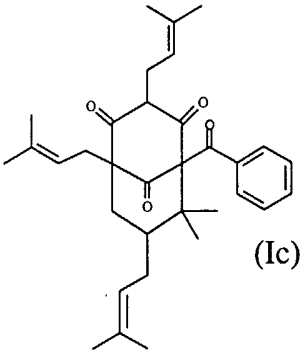
2. Verwendung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Verbindungen der Formel (I) ausgewählt sind aus der Gruppe der folgenden Verbindungen:



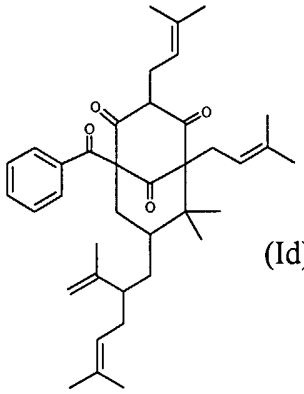
(Ia)



(Ib)

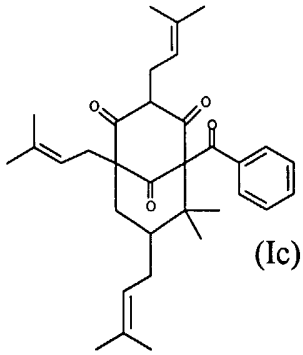


(Ic)



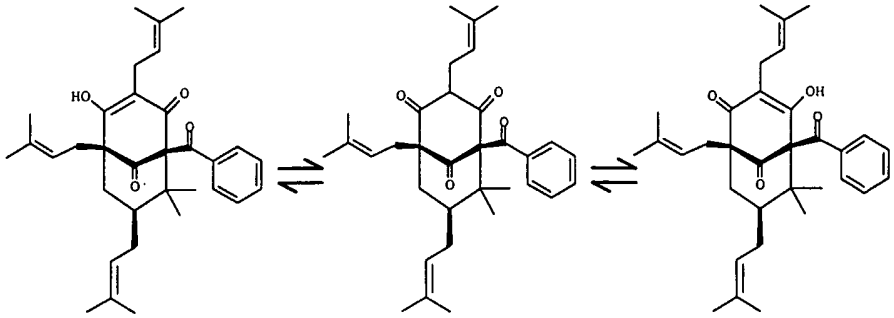
(Id)

3. Verwendung nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Verbindung der Formel (I) die folgende Verbindung der Formel (Ic) ist:



(Ic)

4. Verwendung nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Verbindung der Formel (Ic) die folgende Konfiguration aufweist:



5. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 4 zur prophylaktischen und/oder therapeutischen Behandlung von Tumor- und/oder Krebserkrankungen, insbesondere Primärtumoren und Metastasen, und/oder Präkanzerosen (Krebsvorstufen).

6. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 5 zur prophylaktischen und/oder therapeutischen Behandlung benigner und maligner Tumore.

7. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 6 zur prophylaktischen und/oder therapeutischen Behandlung von Darmkrebs (Kolonkarzinomen), Brustkrebs (Mammakarzinomen), Ovarialkarzinomen, Uteruskarzinomen, Lungenkrebs, Magenkrebs, Leberkrebs, Pankreaskarzinomen, Nierenkrebs, Blasenkrebs, Prostatakrebs, Hodenkrebs, Knochenkrebs, Hautkrebs, Kaposi-Sarkomen, Hirntumoren, Myosarkomen, Neuroblastomen, Lymphomen und Leukämien.

8. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Verbindungen der allgemeinen Formel (I) systemisch und/oder topisch appliziert werden.

9. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß die Verbindungen der allgemeinen Formel (I) das Zellwachstum und die Zellteilung von Tumor- und/oder Krebszellen hemmen und/oder zum Stillstand bringen.

10. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Verbindungen der allgemeinen Formel (I) eine Zerstörung der DNA der Tumor- und/oder Krebszellen induzieren.

11. Verwendung von Verbindungen der allgemeinen Formel (I), wie zuvor definiert, und/oder ihrer physiologisch verträglichen Salze, Hydrate, Isomeren, insbesondere Stereoisomeren, Tautomeren und Konstitutionsisomeren, Derivate, Prodrugs und Metabolite als Topoisomeraseinhibitoren und/oder Telomeraseinhibitoren.

12. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß die Verbindungen der allgemeinen Formel (I), wie zuvor definiert, und/oder ihre physiologisch verträglichen Salze, Hydrate, Isomere, insbesondere Stereoisomere, Tautomere und Konstitutionsisomere, Derivate, Prodrugs und Metabolite in Kombination mit mindestens einem weiteren Chemotherapeutikum, insbesondere Proteinkinaseinhibitor, vorzugsweise MAP-Kinase-Inhibitor, eingesetzt werden.

13. Verwendung nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß die Verbindungen der allgemeinen Formel (I), wie zuvor definiert, und/oder ihre physiologisch verträglichen Salze, Hydrate, Isomere, insbesondere Stereoisomere, Tautomere und Konstitutionsisomere, Derivate, Prodrugs und Metabolite einerseits und das mindestens eine weitere Chemotherapeutikum entweder gleichzeitig oder aber zeitlich abgestuft angewandt oder verabreicht werden.

14. Pharmazeutische Zusammensetzung oder Arzneimittel, insbesondere Cytostatikum oder Antivirusmittel, enthaltend mindestens eine Verbindung der allgemeinen Formel (I), wie zuvor definiert, und/oder ihre physiologisch verträglichen Salze, Hydrate, Isomere, insbesondere Stereoisomere, Tautomere und Konstitutionsisomere, Derivate, Prodrugs und Metabolite zusammen mit einem pharmazeutisch verträglichen, im wesentlichen nichttoxischen Träger oder Exzipienten.

15. Pharmazeutische Zusammensetzung oder Arzneimittel nach Anspruch 14, enthaltend die mindestens eine Verbindung der allgemeinen Formel (I), wie zuvor definiert, und/oder ihre physiologisch verträglichen Salze, Hydrate, Isomere, insbesondere Stereoisomere, Tautomere und Konstitutionsisomere, Derivate, Prodrugs und Metabolite in therapeutisch wirksamen Mengen.

16. Pharmazeutische Zusammensetzung oder Arzneimittel nach Anspruch 14 oder 15 zur systemischen und/oder topischen Anwendung.

17. Pharmazeutische Kombination, insbesondere cytostatische Kombination, die

(A) mindestens eine Verbindung der allgemeinen Formel (I), wie zuvor definiert, und/oder ihre physiologisch verträglichen Salze, Hydrate, Isomere, insbesondere Stereoisomere, Tautomere und Konstitutionsisomere, Derivate, Prodrugs und Metabolite; und

(B) mindestens ein weiteres Chemotherapeutikum, insbesondere einen Proteinkinaseinhibitor, vorzugsweise MAP-Kinase-Inhibitor,

umfaßt.

18. Pharmazeutische Kombination nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß die Komponenten (A) und (B) entweder als funktionelle Einheit, insbesondere in Form einer Mischung, eines Gemisches oder eines Gemenges, oder aber (räumlich) getrennt voneinander vorliegen.

19. Pharmazeutische Kombination nach Anspruch 17 oder 18, wobei die Komponenten (A) und (B) entweder gleichzeitig oder aber zeitlich abgestuft anwendbar oder applizierbar sind.

20. Pharmazeutische Kombination nach einem der Ansprüche 17 bis 19, enthaltend die Komponenten (A) und (B) jeweils in therapeutisch wirksamen Mengen.

21. Pharmazeutische Kombination nach einem der Ansprüche 17 bis 20 zur systemischen und/oder topischen Anwendung.

22. Verbindungen der allgemeinen Formel (I), wie zuvor definiert, und/oder ihre physiologisch verträglichen Salze, Hydrate, Isomere, insbesondere Stereoisomere, Tautomere und Konstitutionsisomere, Derivate, Prodrugs und Metabolite zur prophylaktischen und/oder therapeutischen Behandlung von Erkrankungen.

23. Verbindungen der allgemeinen Formel (I), wie zuvor definiert, und/oder ihre physiologisch verträglichen Salze, Hydrate, Isomere, insbesondere Stereoisomere, Tautomere und Konstitutionsisomere, Derivate, Prodrugs und Metabolite als pharmazeutische Wirkstoffe und/oder pharmazeutisch wirksame Arzneimittelbestandteile.

24. Verbindungen der allgemeinen Formel (I), wie zuvor definiert, und/oder ihre physiologisch verträglichen Salze, Hydrate, Isomere, insbesondere Stereoisomere, Tautomere und Konstitutionsisomere, Derivate, Prodrugs und Metabolite zur prophylaktischen und/oder therapeutischen Behandlung von Krebserkrankungen, insbesondere Primärtumoren und Metastasen, und/oder Präkanzerosen (Krebsvorstufen), insbesondere von Darmkrebs (Kolonkarzinomen), Brustkrebs (Mammakarzinomen), Ovarialkarzinomen, Uteruskarzinomen, Lungenkrebs, Magenkrebs, Leberkrebs, Pankreaskarzinomen, Nierenkrebs, Blasenkrebs, Prostatakrebs, Hodenkrebs, Knochenkrebs, Hautkrebs, Kaposi-Sarkomen, Hirntumoren, Myosarkomen, Neuroblastomen, Lymphomen und Leukämien.

25. Verbindungen der allgemeinen Formel (I), wie zuvor definiert, und/oder ihre physiologisch verträglichen Salze, Hydrate, Isomere, insbesondere Stereoisomere, Tautomere und Konstitutionsisomere, Derivate, Prodrugs und Metabolite, insbesondere nach einem der Ansprüche 22 bis 24, zur Inhibierung von Topoisomerasen und/oder Telomerasen.

26. Verbindungen der allgemeinen Formel (I), wie zuvor definiert, und/oder ihre physiologisch verträglichen Salze, Hydrate, Isomere, insbesondere Stereoisomere, Tautomere und Konstitutionsisomere, Derivate, Prodrugs und Metabolite, insbesondere nach einem der Ansprüche 22 oder 23, zur prophylaktischen und/oder therapeutischen Behandlung von Viruserkrankungen.

27. Verbindungen der allgemeinen Formel (I), wie zuvor definiert, und/oder ihre physiologisch verträglichen Salze, Hydrate, Isomere, insbesondere Stereoisomere, Tautomere und Konstitutionsisomere, Derivate, Prodrugs und Metabolite, insbesondere nach einem der Ansprüche 22 bis 26, zur systemischen und/oder topischen Anwendung.

28. Verbindungen der allgemeinen Formel (I), wie zuvor definiert, und/oder ihre physiologisch verträglichen Salze, Hydrate, Isomere, insbesondere Stereoisomere, Tautomere und Konstitutionsisomere, Derivate, Prodrugs und Metabolite, als Regulatoren innerhalb der MAP-Kinase-Signaltransduktion.

29. Verwendung von Verbindungen der allgemeinen Formel (I), wie zuvor definiert, und ihrer physiologisch verträglichen Salze, Hydrate, Isomeren, insbesondere Stereoisomeren, Tautomeren und Konstitutionsisomeren, Derivate, Prodrugs und Metabolite zur Herstellung von Arzneimitteln zur prophylaktischen und/oder therapeutischen Behandlung von Viruserkrankungen.

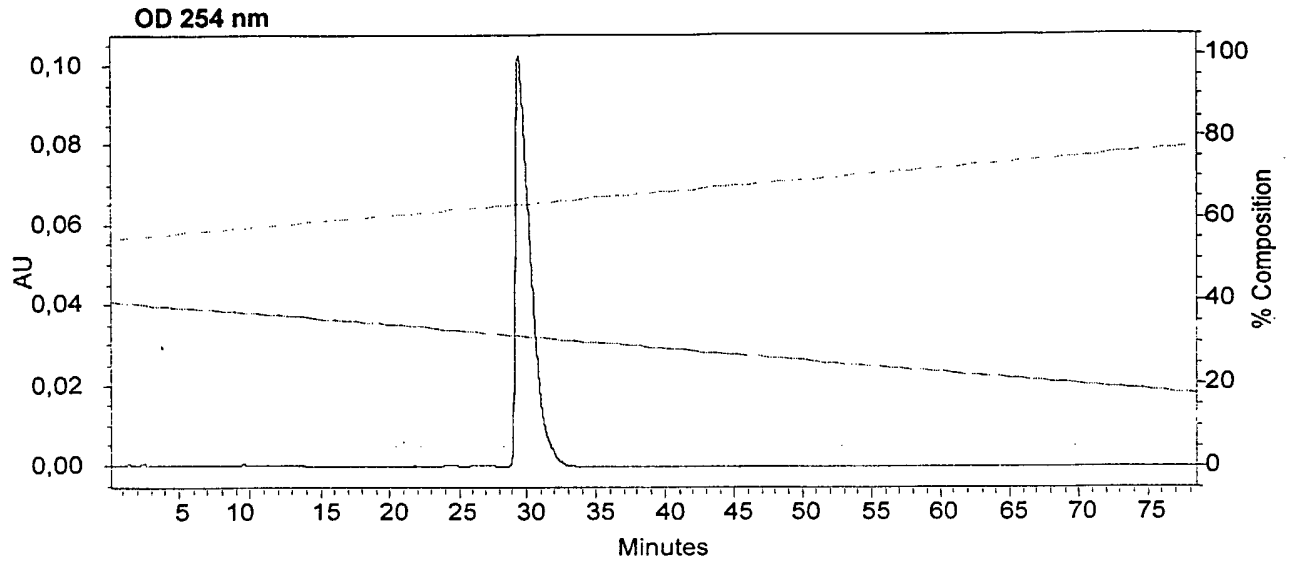

OD 254 nm
AU
0,10
0,08
0,06
0,04
0,02
0,00
% Composition
100
80
60
40
20
0
5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65 70 75
Minutes

Fig. 1a

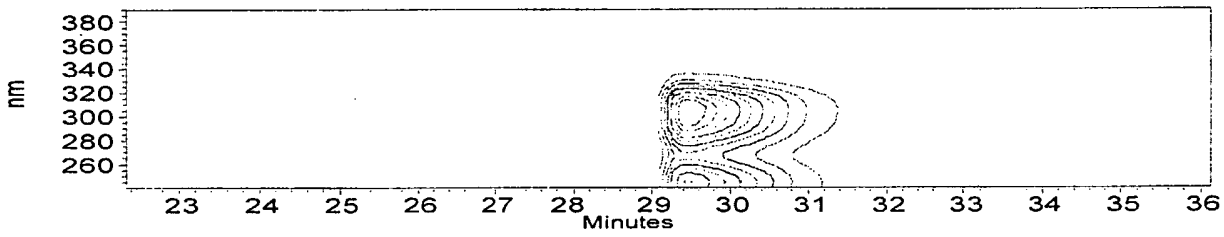

nm
380
360
340
320
300
280
260
23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36
Minutes

Fig. 1b

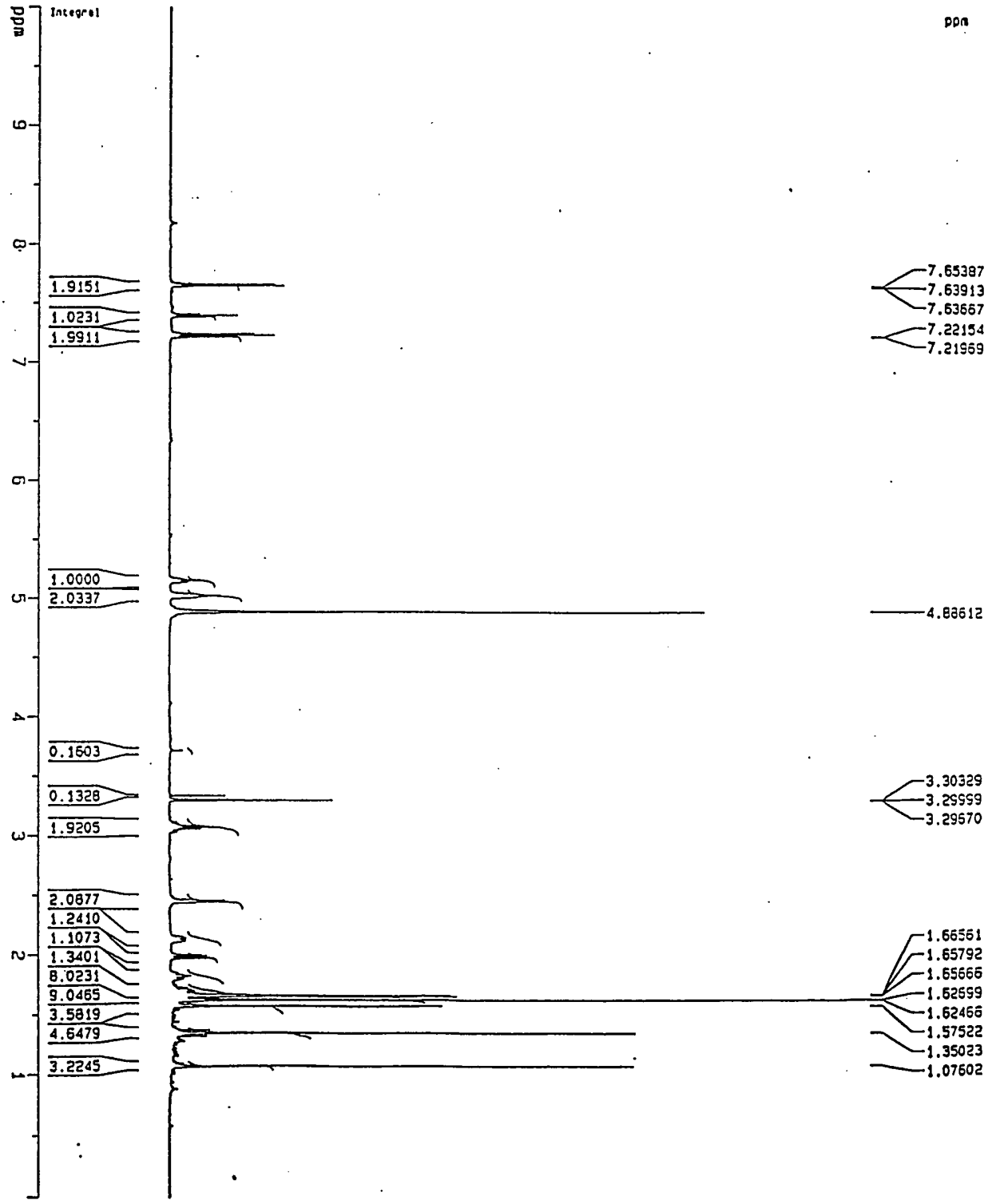

ppm
Integral
ppm
1.9151
1.0231
1.9911
1.0000
2.0337
0.1603
0.1328
1.9205
2.0877
1.2410
1.1073
1.3401
8.0231
9.0465
3.5819
4.6479
3.2245
7.65387
7.63913
7.63667
7.22154
7.21959
4.88612
3.30329
3.29999
3.29670
1.66561
1.65792
1.65666
1.62699
1.62466
1.57522
1.35023
1.07602

Fig. 1c

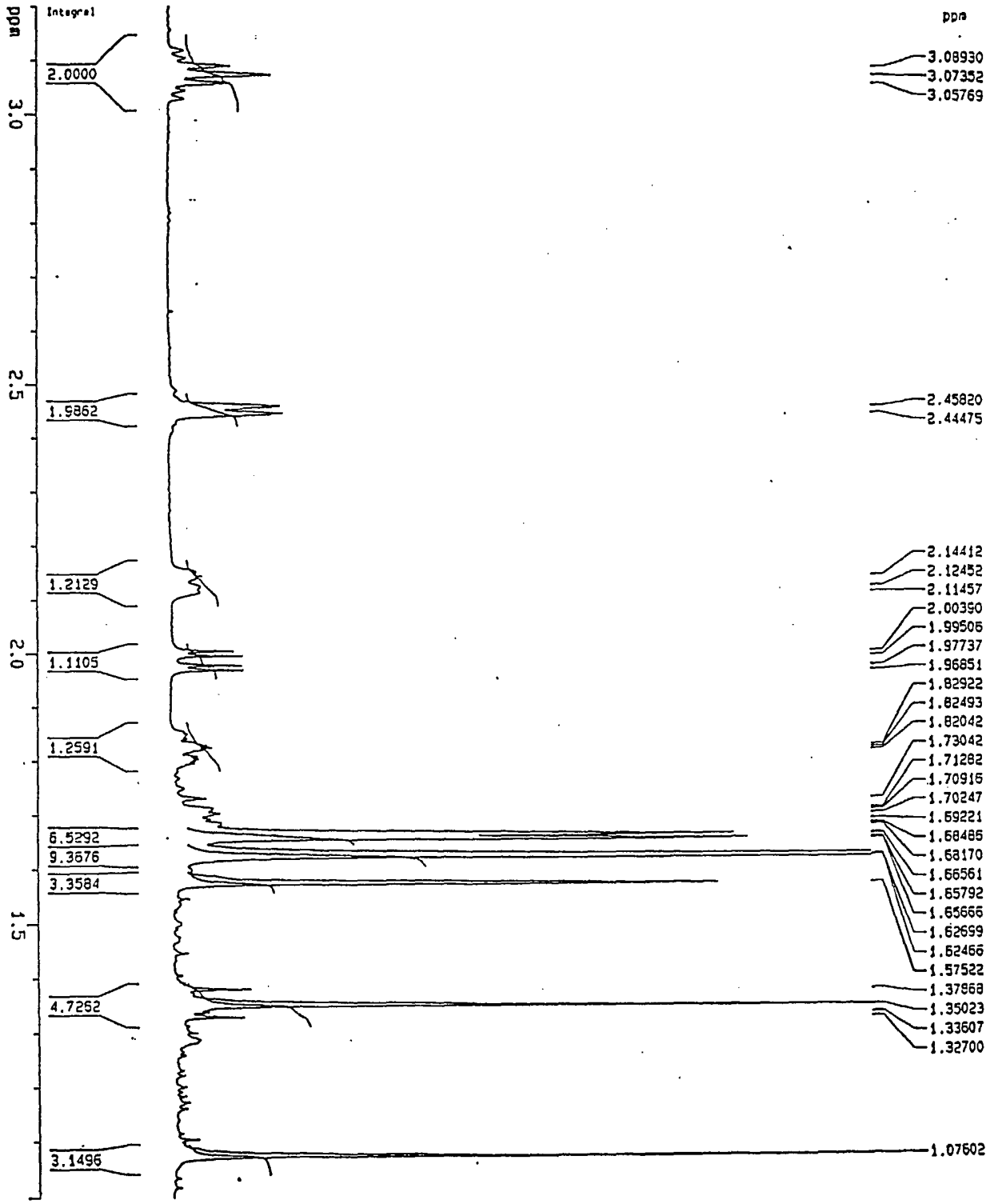

ppm
Integral
2.0000
1.9862
1.2129
1.1105
1.2591
6.5292
9.3676
3.3584
4.7262
3.1496
3.0
2.5
2.0
1.5
ppm
3.08930
3.07352
3.05769
2.45820
2.44475
2.14412
2.12452
2.11457
2.00390
1.99506
1.97737
1.96851
1.82922
1.82493
1.82042
1.73042
1.71282
1.70916
1.70247
1.69221
1.68485
1.68170
1.66561
1.65792
1.65666
1.62699
1.62466
1.57522
1.37868
1.35023
1.33607
1.32700
1.07602

Fig. 1d

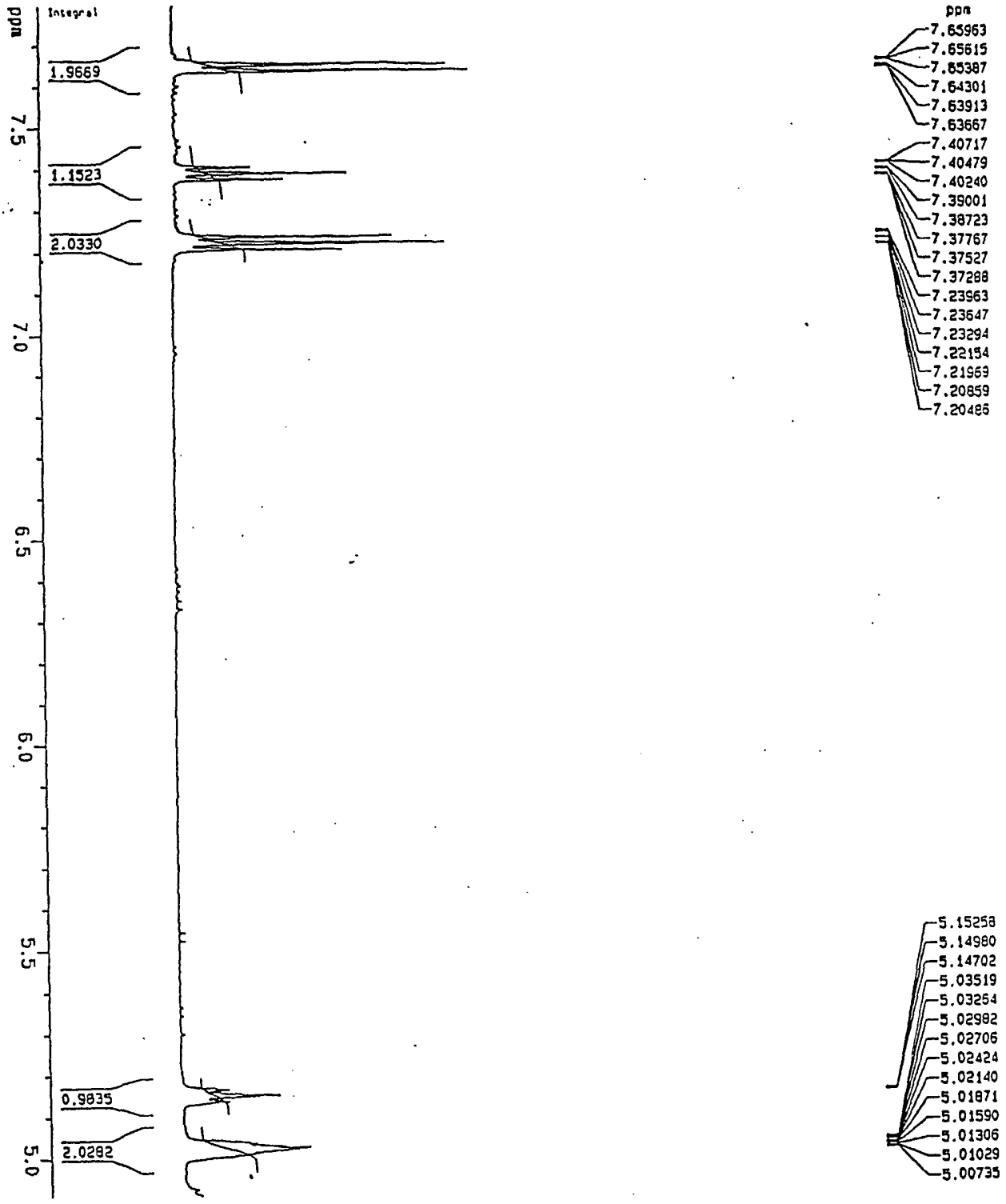

ppm
Integral
1.9669
1.1523
2.0330
0.9835
2.0282
7.5
7.0
6.5
6.0
5.5
5.0
ppm
7.65963
7.65615
7.65387
7.64301
7.63913
7.63667
7.40717
7.40479
7.40240
7.39001
7.38723
7.37767
7.37527
7.37288
7.23963
7.23647
7.23294
7.22154
7.21969
7.20859
7.20486
5.15258
5.14980
5.14702
5.03519
5.03254
5.02982
5.02706
5.02424
5.02140
5.01871
5.01590
5.01306
5.01029
5.00735

Fig. 1e

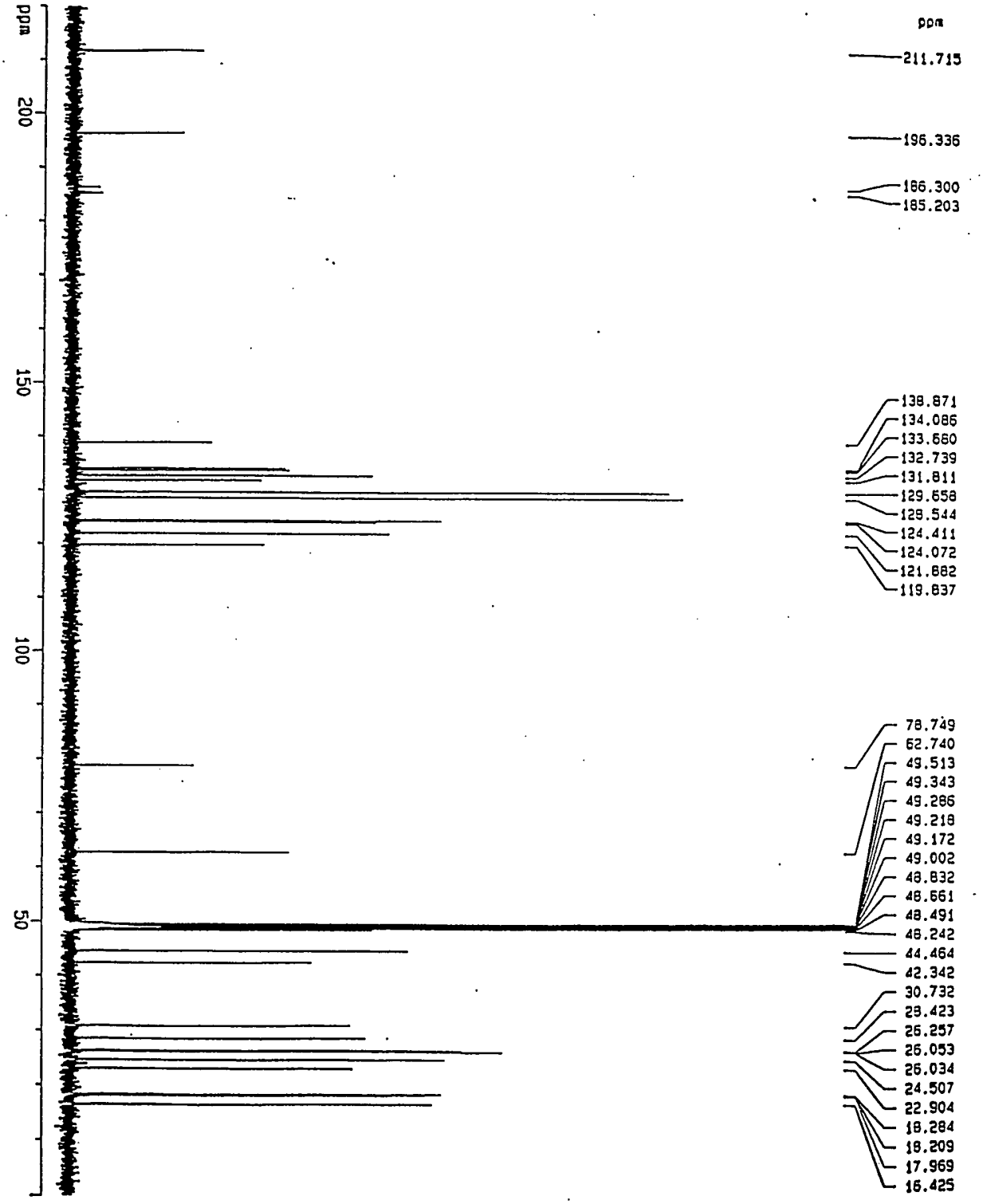

ppm
200
150
100
50
ppm
211.715
196.336
186.300
185.203
138.871
134.086
133.660
132.739
131.811
129.658
128.544
124.411
124.072
121.882
119.837
78.749
62.740
49.513
49.343
49.286
49.218
49.172
49.002
48.832
48.661
48.491
48.242
44.464
42.342
30.732
28.423
26.257
26.053
26.034
24.507
22.904
18.284
18.209
17.969
16.425

Fig. 1f

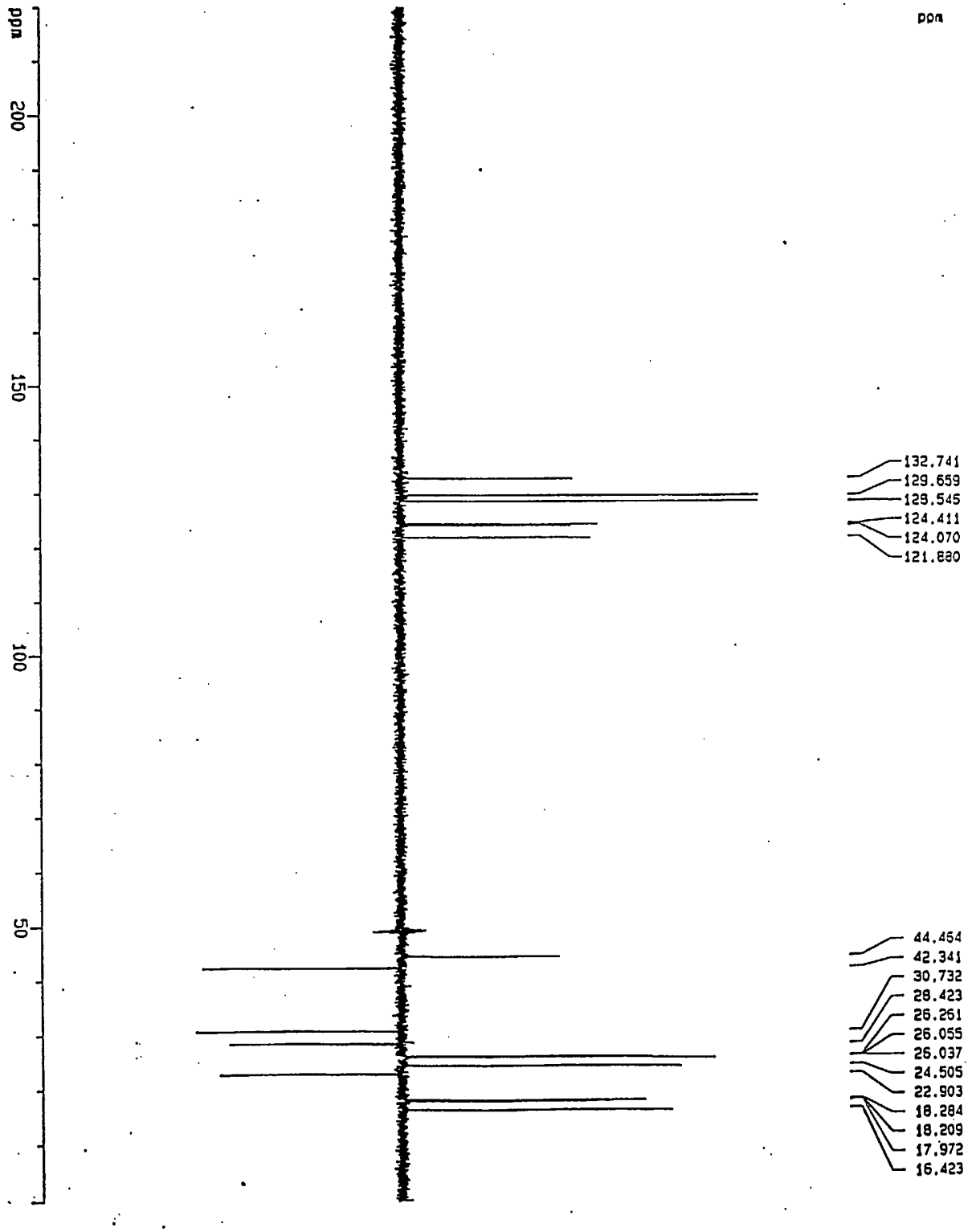

ppm
200
150
100
50
ppm
132.741
129.659
128.545
124.411
124.070
121.880
44.464
42.341
30.732
28.423
26.261
26.055
26.037
24.505
22.903
18.284
18.209
17.972
16.423

Fig. 1g

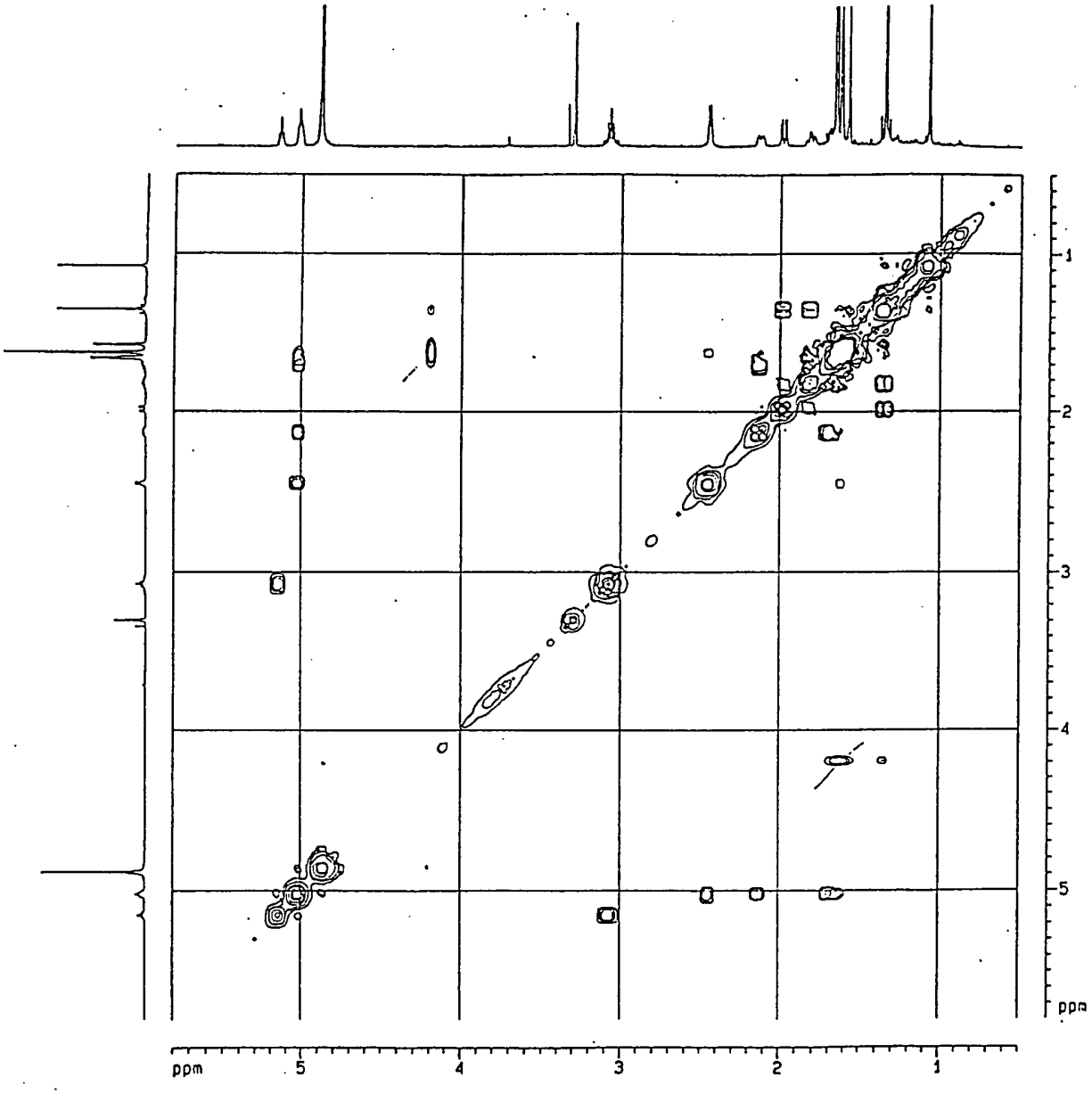


Fig. 1h

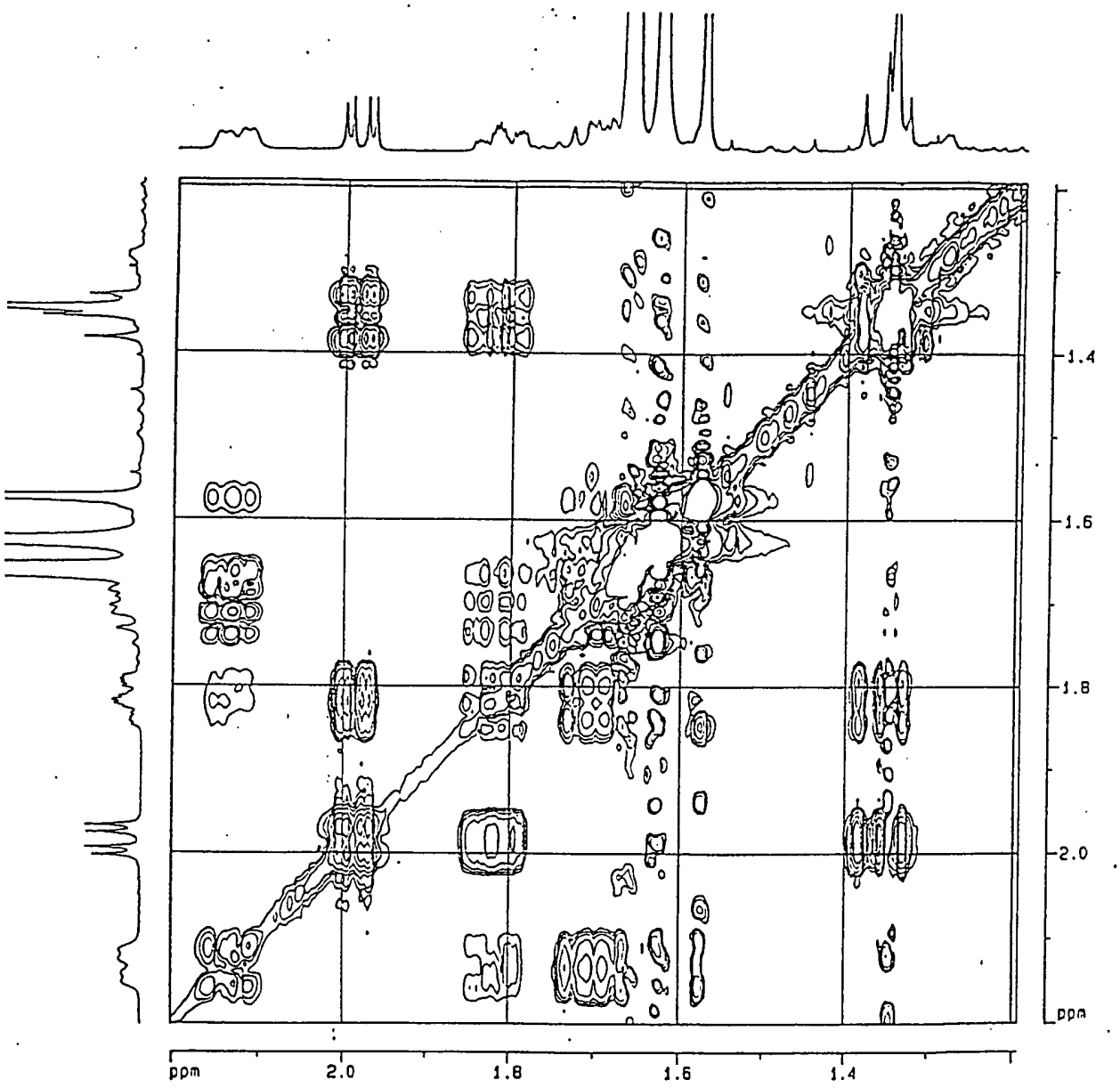


Fig. 1i

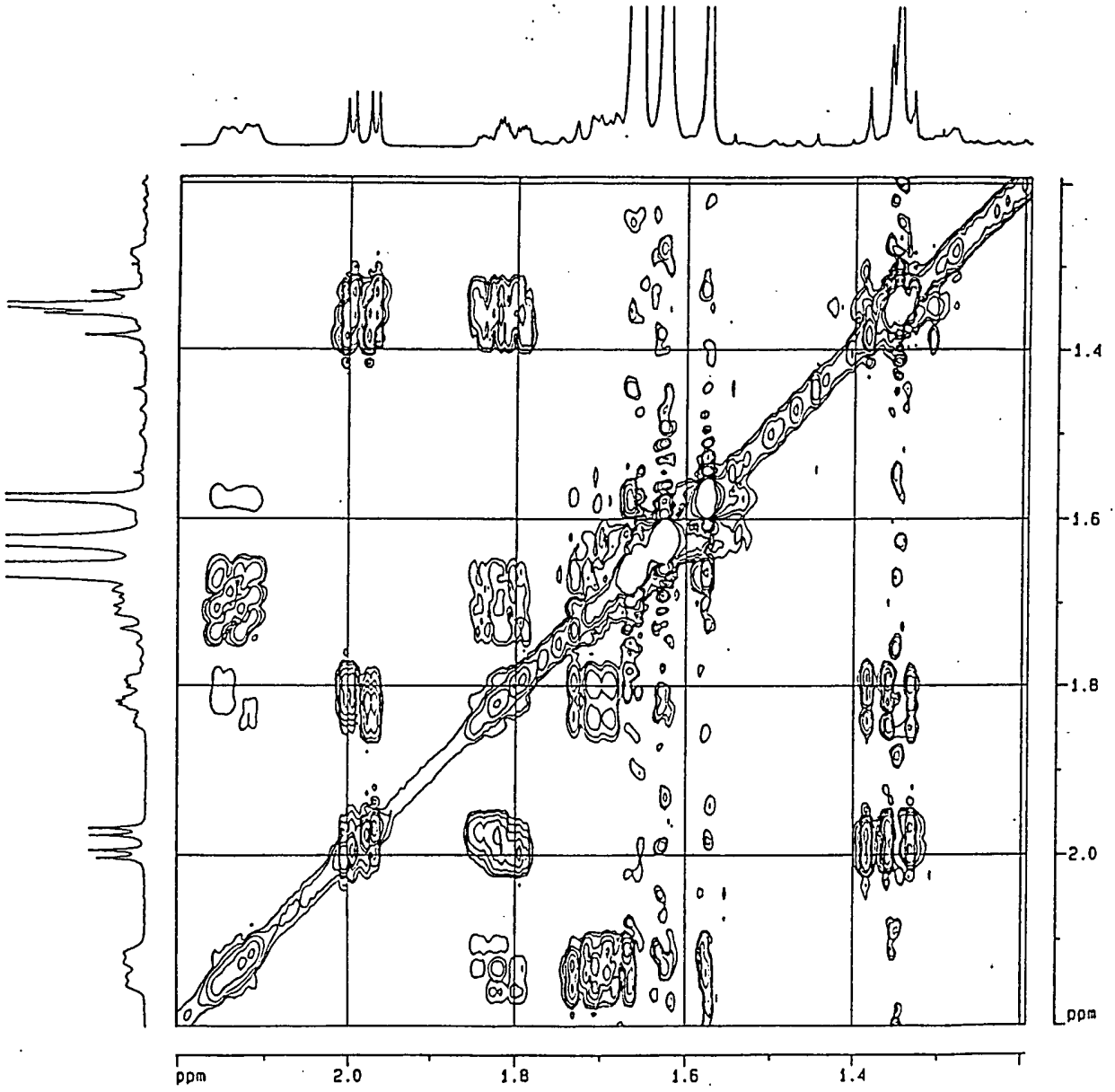


Fig. 1j

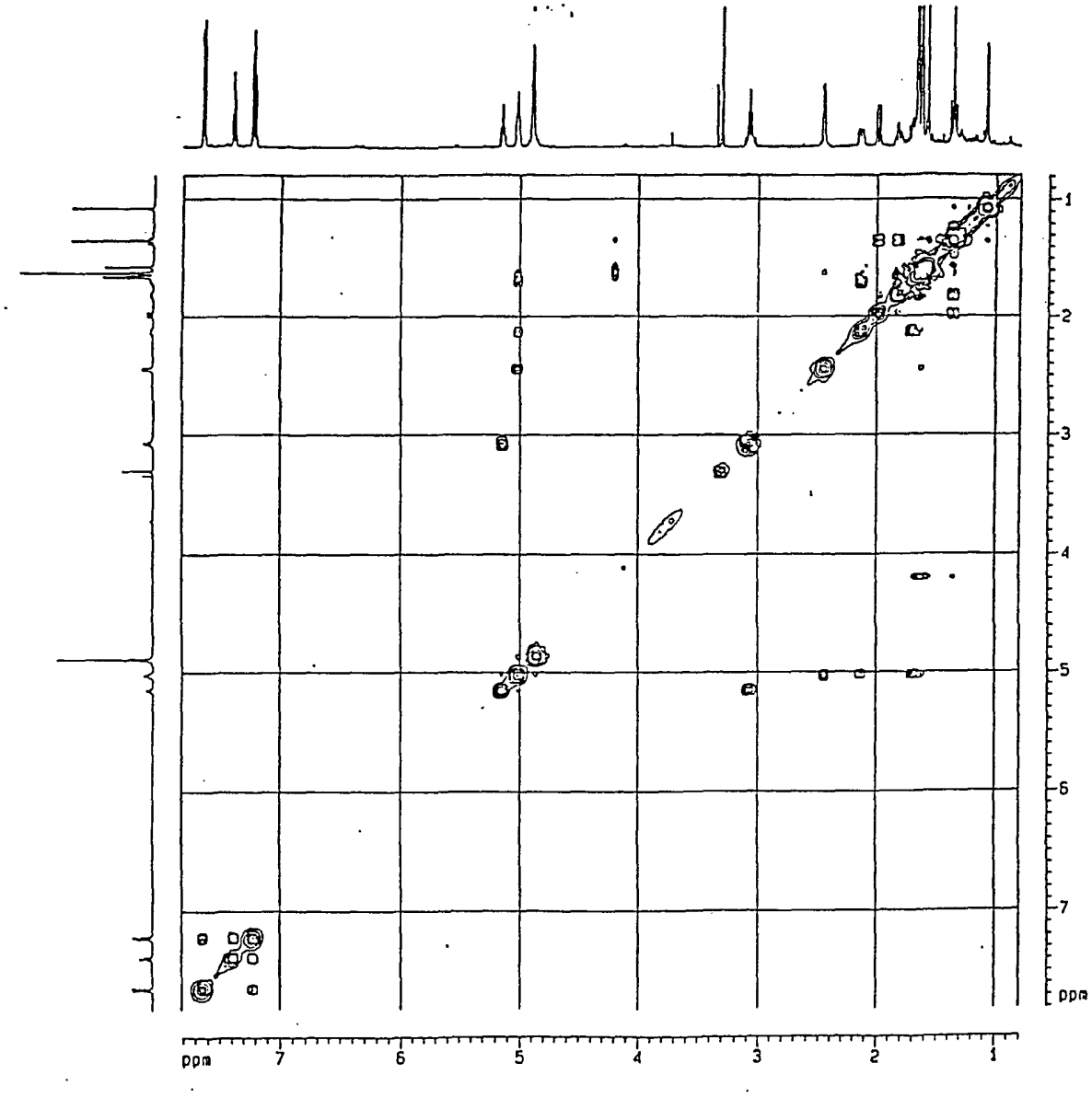


Fig. 1k

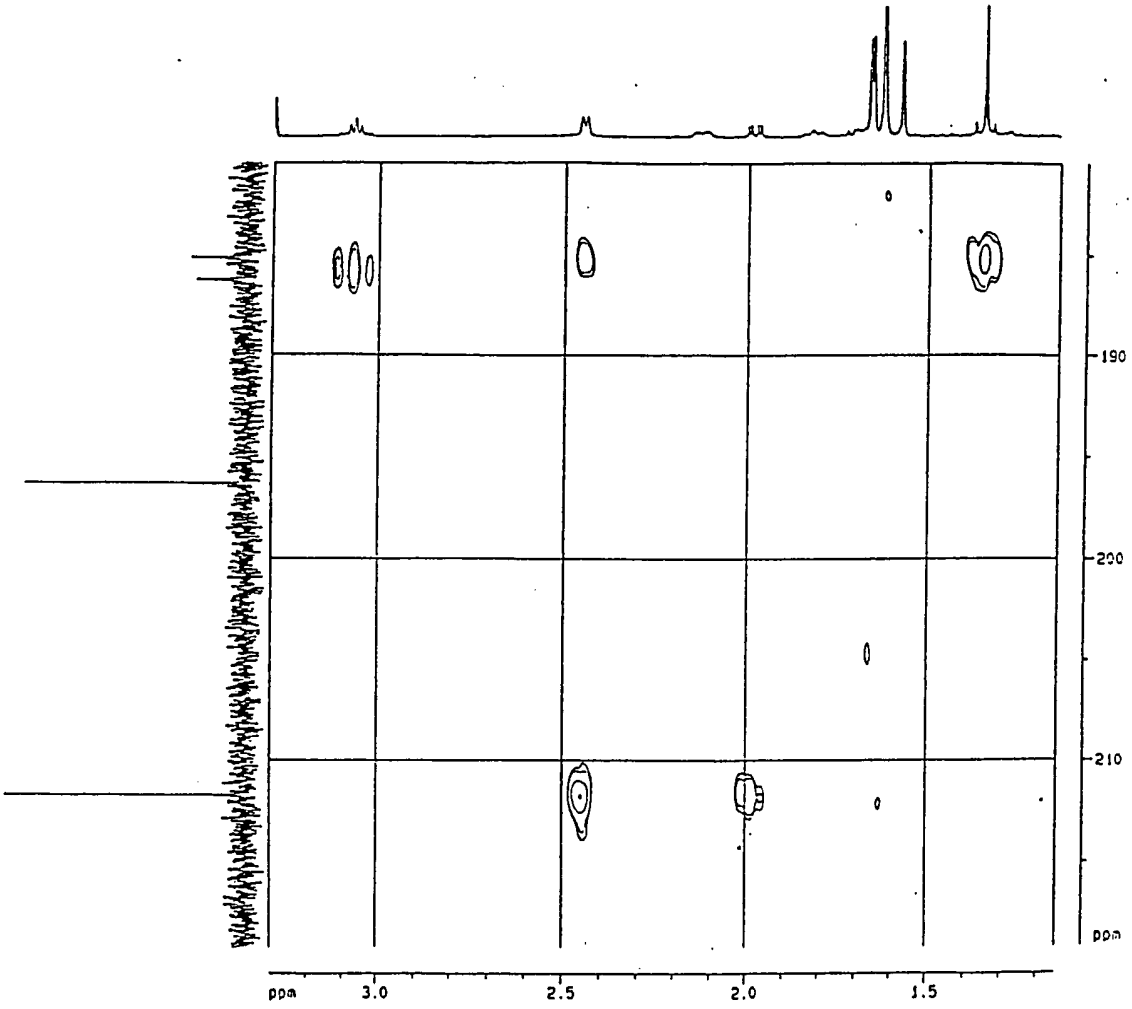


Fig. 11

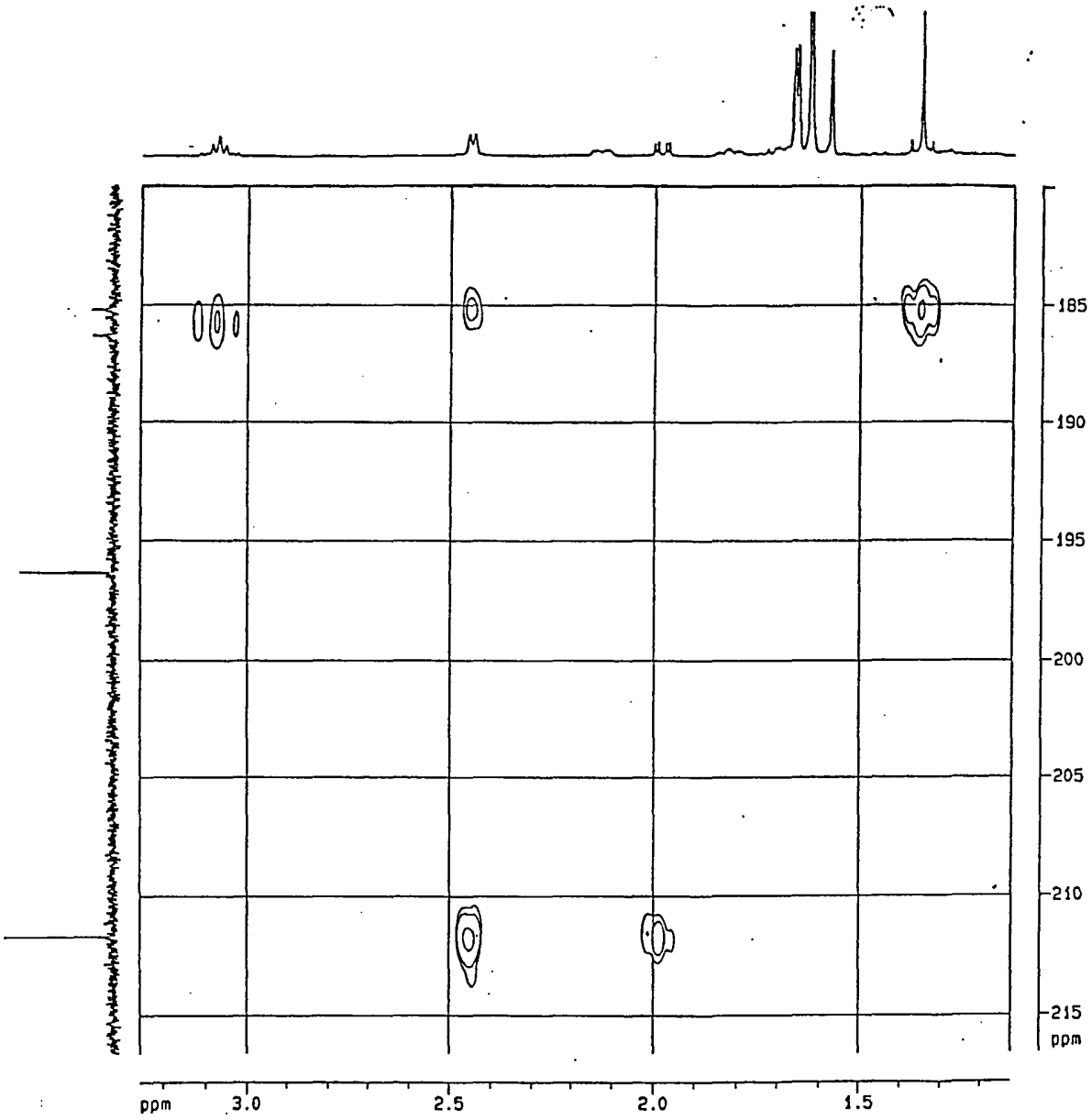


Fig. 1m

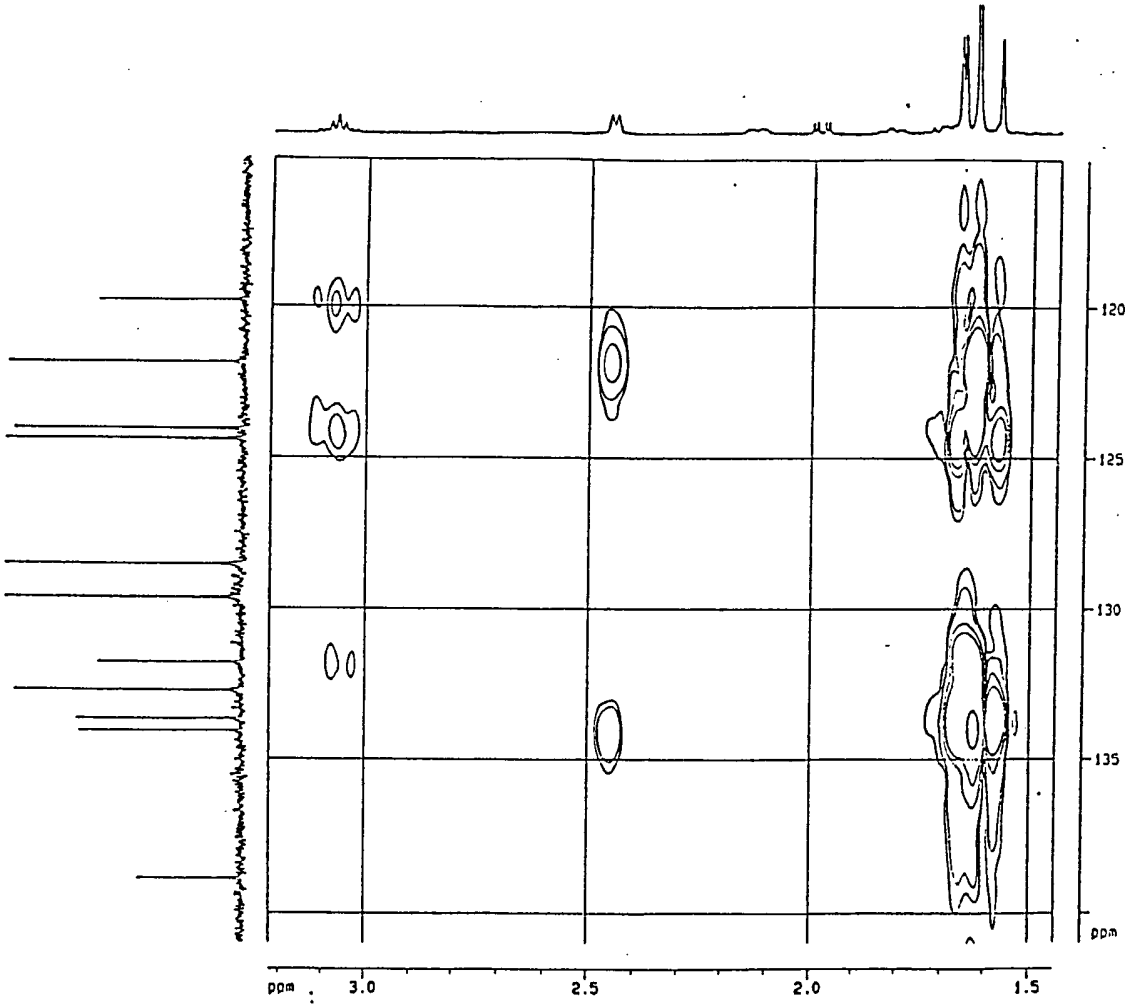


Fig. 1n

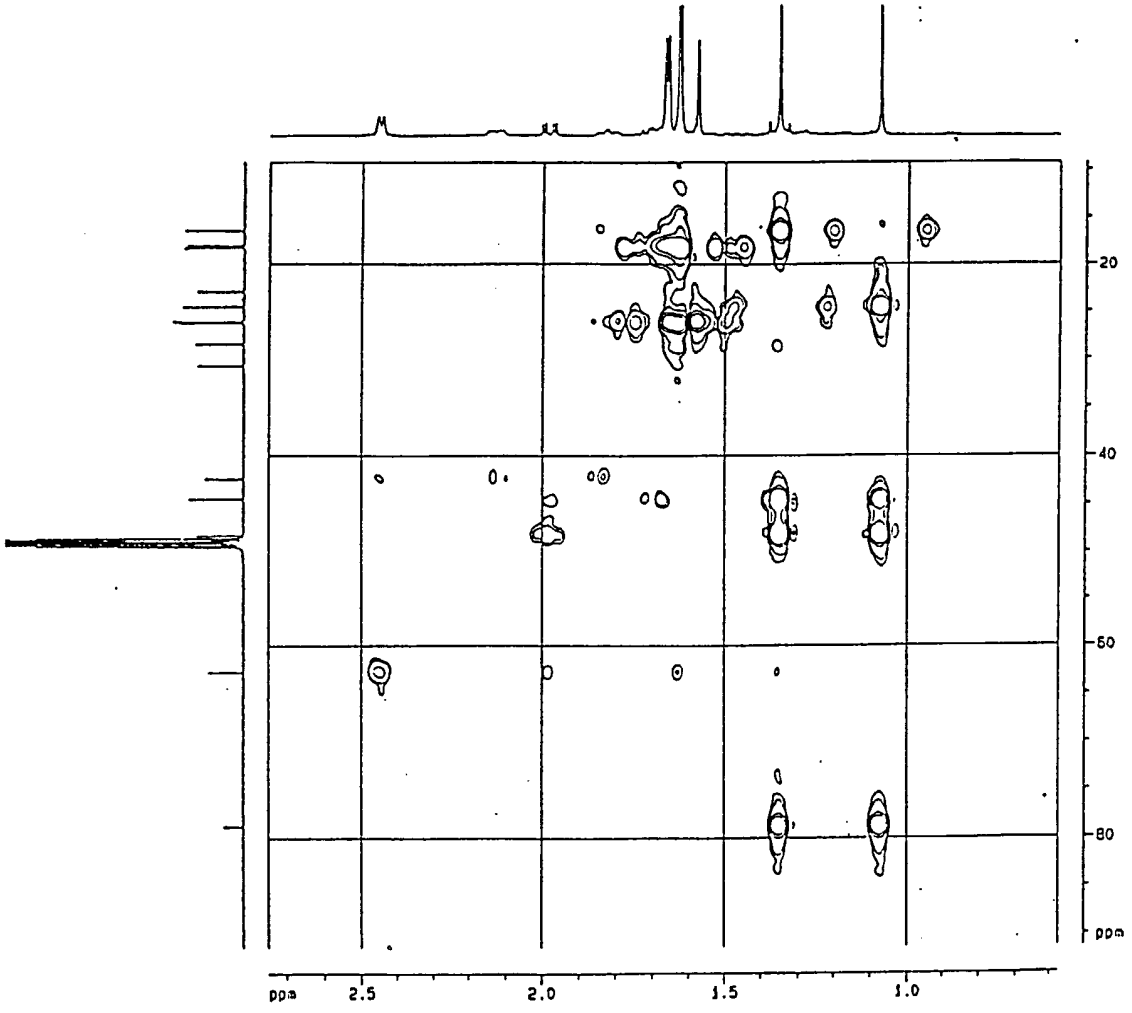


Fig. 1o

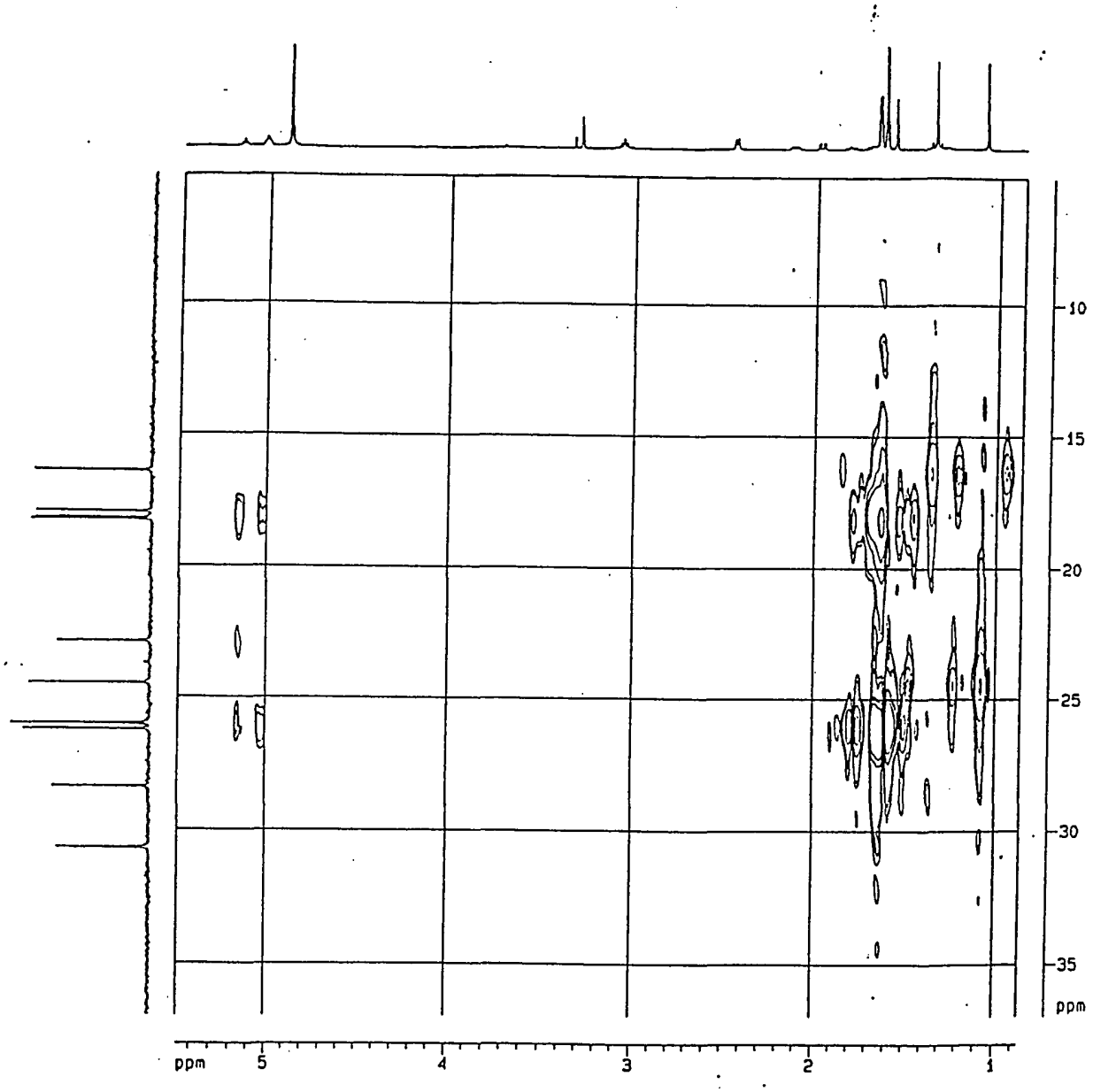


Fig. 1p

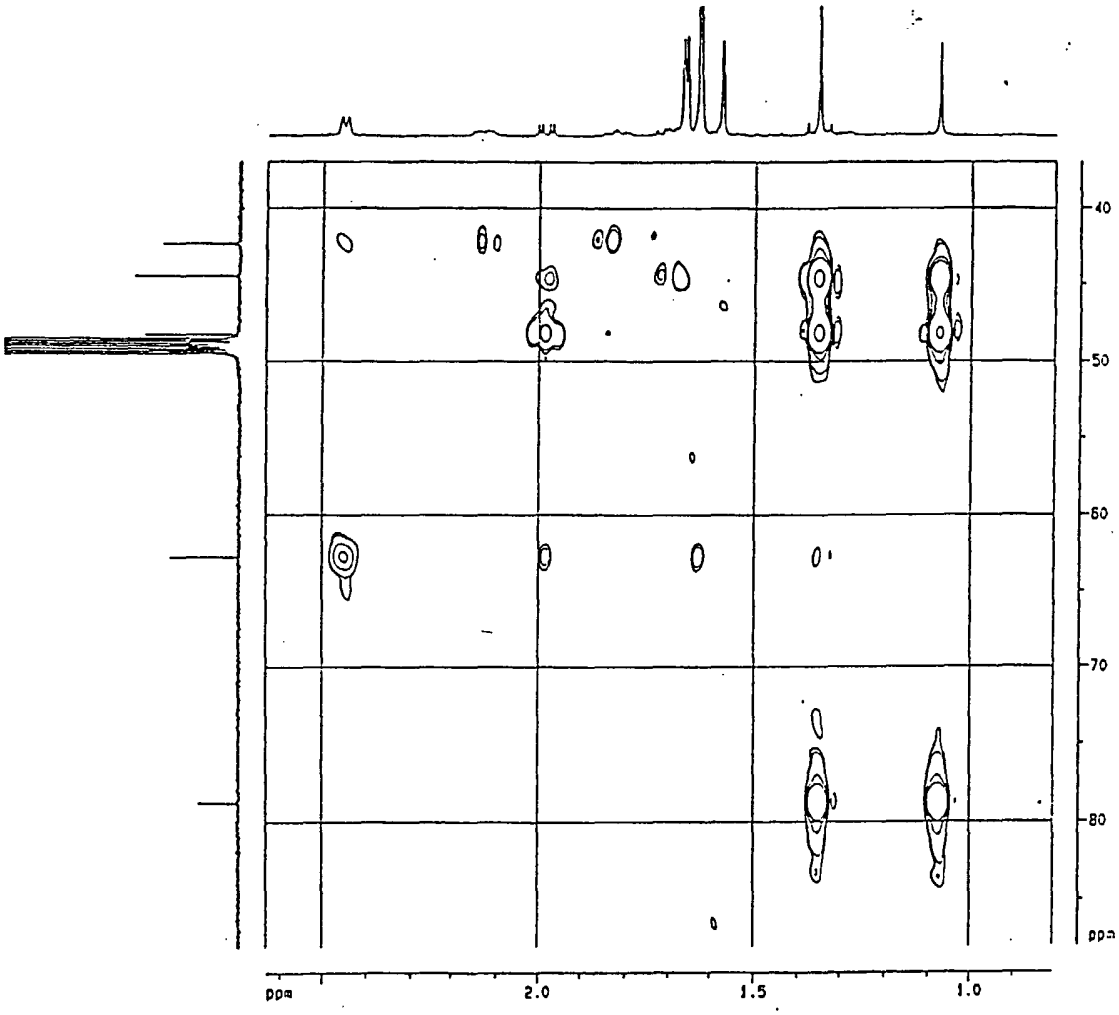


Fig. 1q

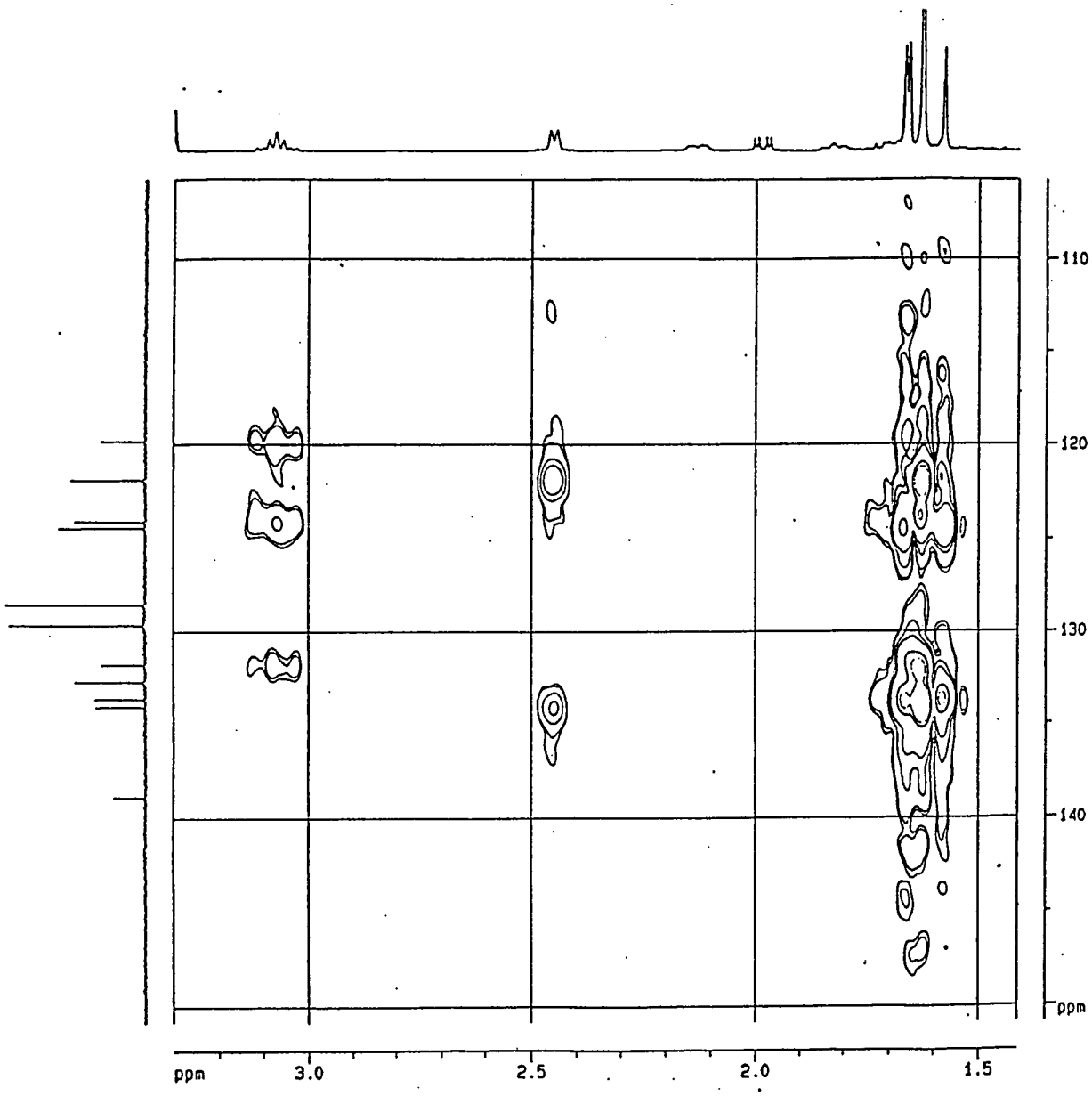


Fig. 1r

JEGLICHE REFERENZ ZU FIGUR 2 SOLLTE ALS NICHT-EXISTENT BETRACHTET WERDEN

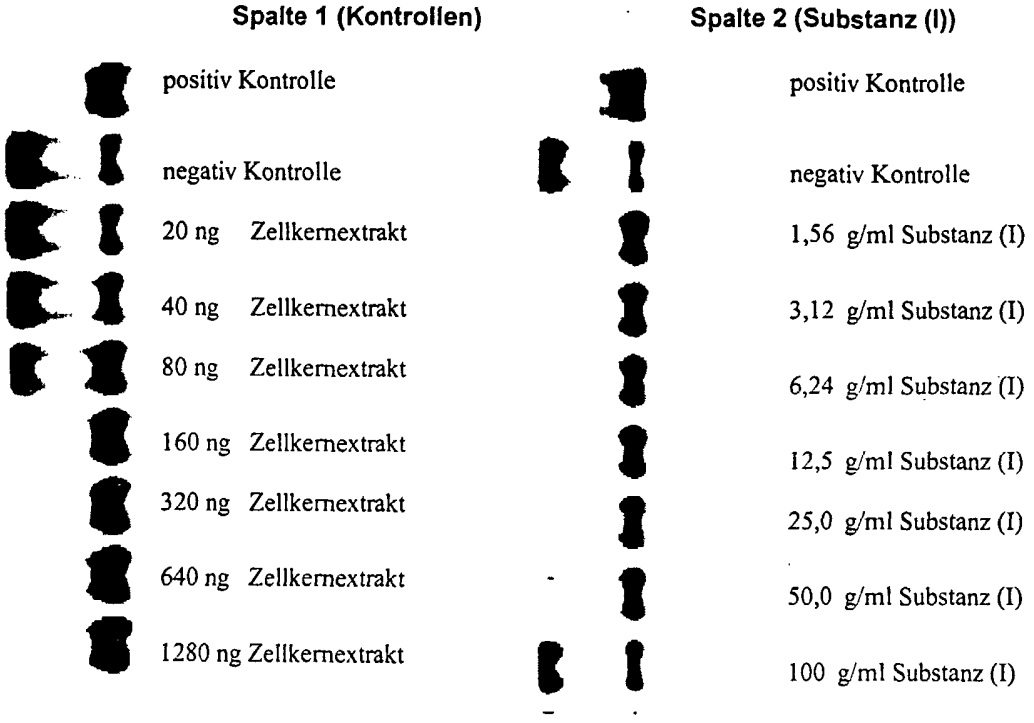

Spalte 1 (Kontrollen)
positiv Kontrolle
negativ Kontrolle
20 ng Zellkernextrakt
40 ng Zellkernextrakt
80 ng Zellkernextrakt
160 ng Zellkernextrakt
320 ng Zellkernextrakt
640 ng Zellkernextrakt
1280 ng Zellkernextrakt
Spalte 2 (Substanz (I))
positiv Kontrolle
negativ Kontrolle
1,56 g/ml Substanz (I)
3,12 g/ml Substanz (I)
6,24 g/ml Substanz (I)
12,5 g/ml Substanz (I)
25,0 g/ml Substanz (I)
50,0 g/ml Substanz (I)
100 g/ml Substanz (I)

Fig. 3

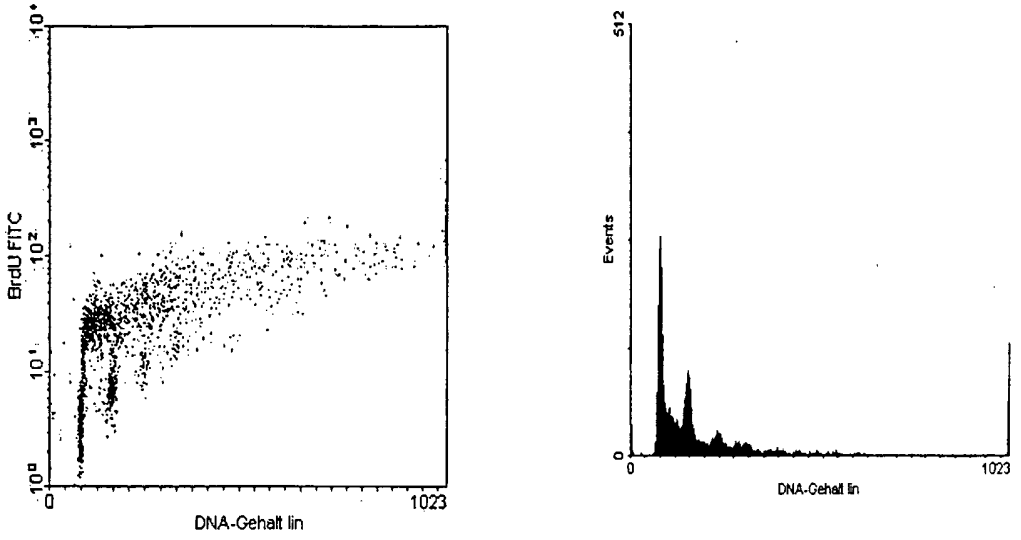

BrdU FITC
DNA-Gehalt lin
0
1023
Events
512
DNA-Gehalt lin
BrdU-Aufnahme
DNA-Gehalt

Fig. 4a

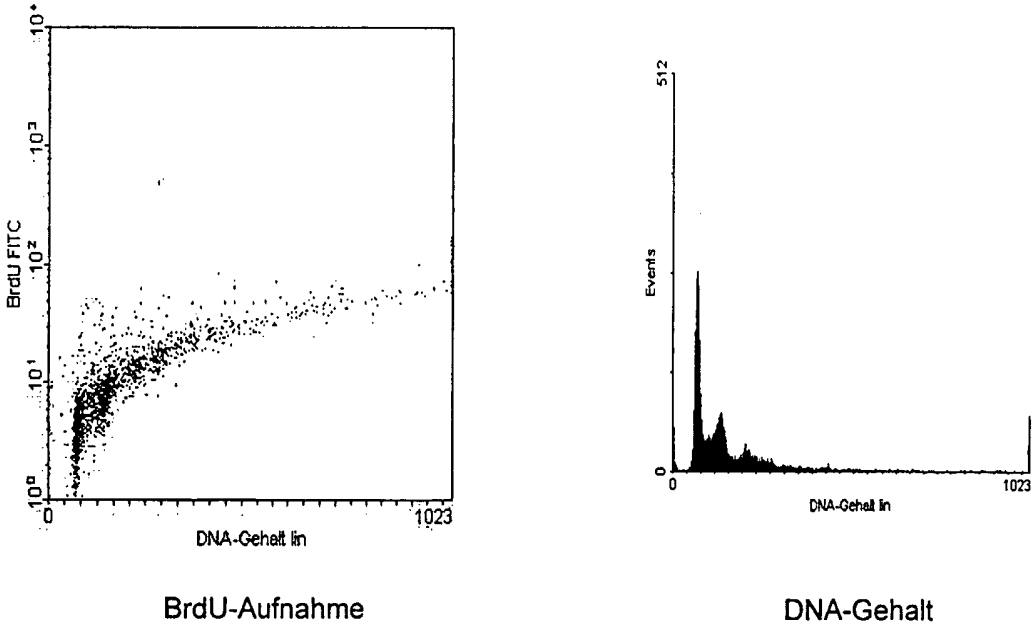

BrdU FITC
DNA-Gehalt lin
0
1023
Events
512
DNA-Gehalt lin
BrdU-Aufnahme
DNA-Gehalt

Fig. 4b

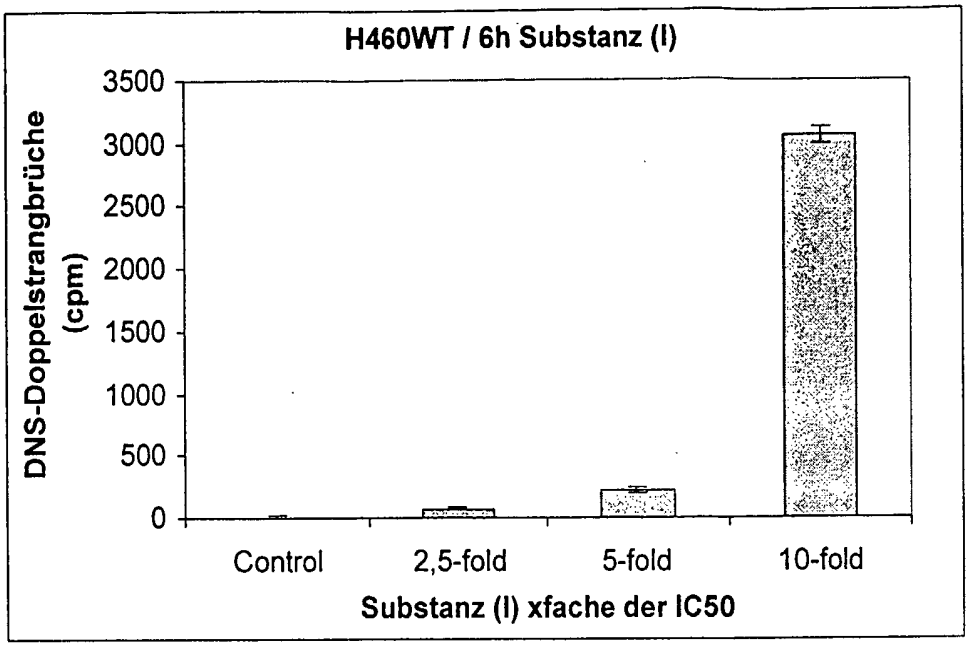

H460WT / 6h Substanz (I)
DNS-Doppelstrangbrüche (cpm)
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
Control
2,5-fold
5-fold
10-fold
Substanz (I) xfache der IC50

Fig. 5

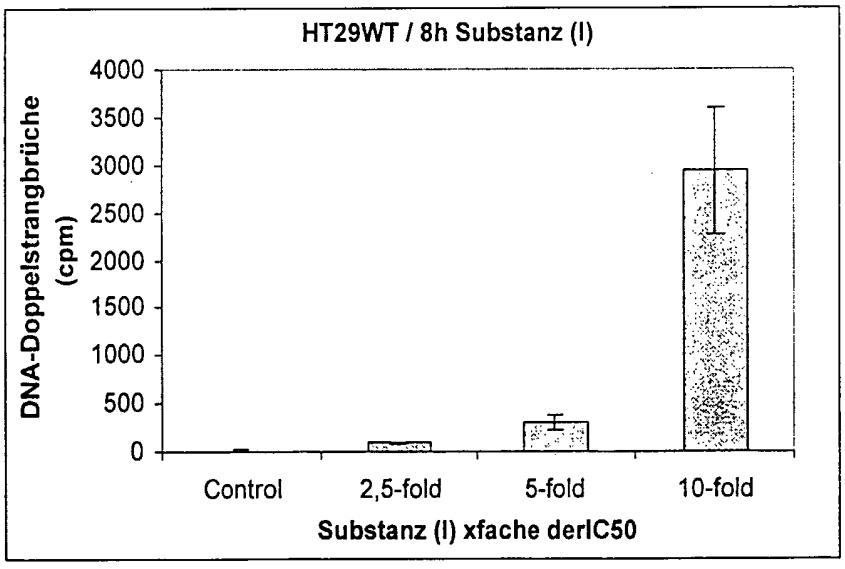

HT29WT / 8h Substanz (I)
DNA-Doppelstrangbrüche (cpm)
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
Control
2,5-fold
5-fold
10-fold
Substanz (I) xfache derIC50

Fig. 6

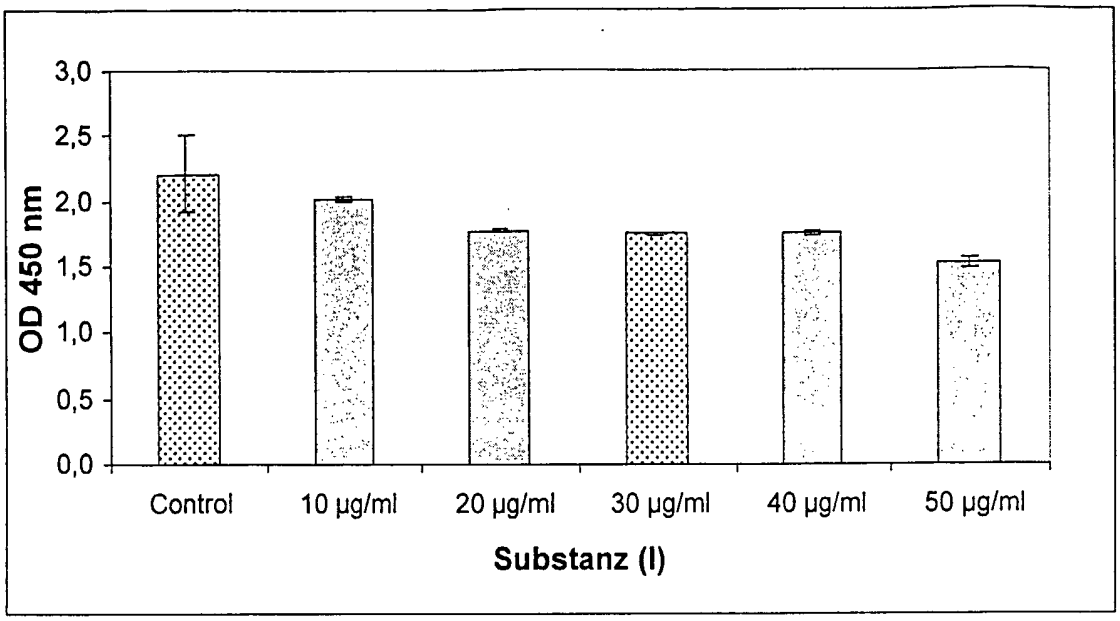

3,0
2,5
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
OD 450 nm
Control
10 µg/ml
20 µg/ml
30 µg/ml
40 µg/ml
50 µg/ml
Substanz (I)

Fig. 7

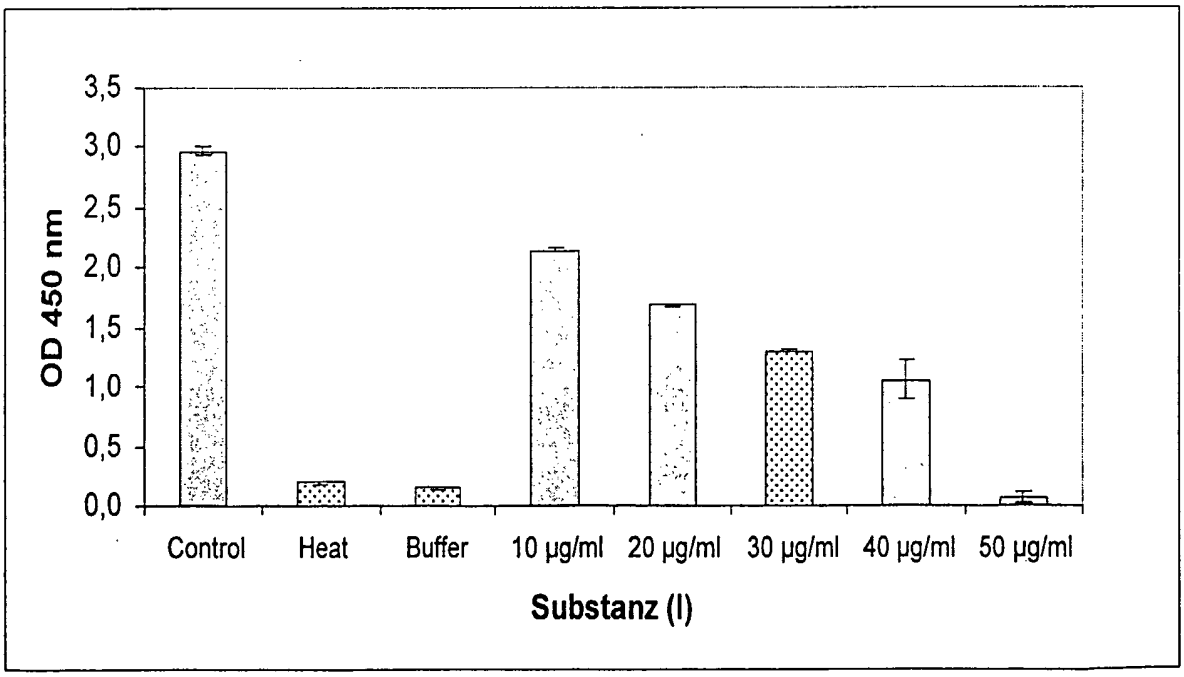

3,5
3,0
2,5
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
OD 450 nm
Control
Heat
Buffer
10 µg/ml
20 µg/ml
30 µg/ml
40 µg/ml
50 µg/ml
Substanz (I)

Fig. 8

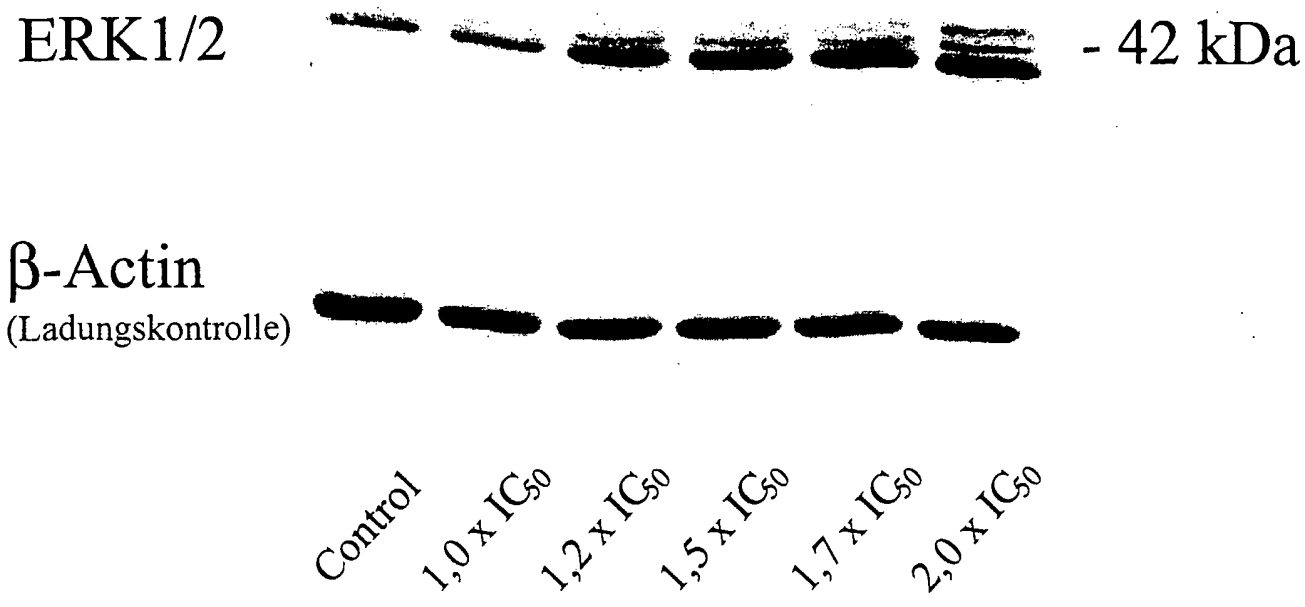

ERK1/2
- 42 kDa
β-Actin
(Ladungskontrolle)
Control
1,0 x IC50
1,2 x IC50
1,5 x IC50
1,7 x IC50
2,0 x IC50

Fig. 9

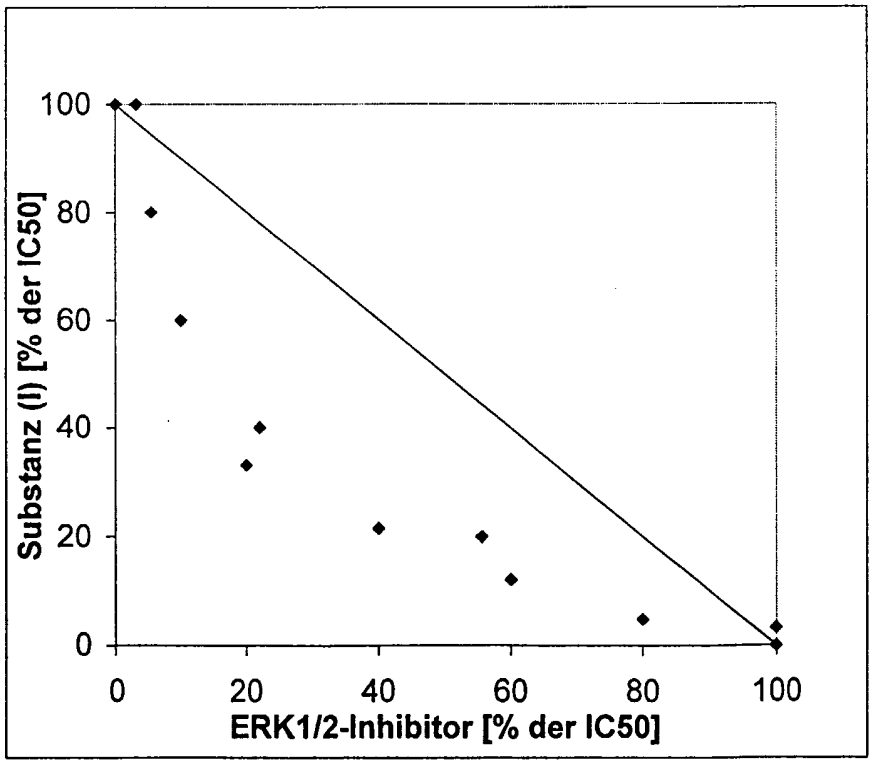

Substanz (I) [% der IC50]
ERK1/2-Inhibitor [% der IC50]
0
20
40
60
80
100

Fig. 10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int nal Application No
PCT/EP 02/12967

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 A61K31/12 A61K35/64

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DE OLIVEIRA CECILIA M A ET AL: "Floral resins of Clusia spp.: Chemical composition and biological function." TETRAHEDRON LETTERS, vol. 37, no. 36, 1996, pages 6427-6430, XP002236050 ISSN: 0040-4039 Verbindung 3 page 6427, line 12 - line 14 --- -/--	14-16, 22,23, 26-29

[X] Further documents are listed in the continuation of box C.

[ ] Patent family members are listed in annex.

° Special categories of cited documents :

"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 when the document is taken alone

"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

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
31 March 2003	11/04/2003

Name and mailing address of the ISA	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Loher, F

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication,where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	GUSTAFSON KIRK R ET AL: "The guttiferones, HIV-inhibitory benzophenones from Symphonia globulifera, Garcinia livingstonei, Garcinia ovalifolia and Clusia rosea." TETRAHEDRON, vol. 48, no. 46, 1992, pages 10093-10102, XP001146562 ISSN: 0040-4020 Verbindungen 5 und 7 page 10098, line 12 - line 17 ---	14-16, 22,23, 26-29
X,P	CUESTA-RUBIO OSMANY ET AL: "Polyisoprenylated benzophenones in Cuban propolis;biological activity of nemorosone." ZEITSCHRIFT FUER NATURFORSCHUNG SECTION C JOURNAL OF BIOSCIENCES, vol. 57, no. 3-4, March 2002 (2002-03), pages 372-378, XP009008412 ISSN: 0939-5075 Verbindung 2 table 2 ---	1-29
X,P	DIAZ-CARBALLO DAVID ET AL: "Isolation and characterization of the novel antitumoral compound FB1, a potent telomerase- and topoisomerase-I-inhibitor." PROCEEDINGS OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH ANNUAL, vol. 43, March 2002 (2002-03), page 250 XP001146555 93rd Annual Meeting of the American Association for Cancer Research;San Francisco, California, USA; April 06-10, 2002, March, 2002 ISSN: 0197-016X abstract ---	1-29
P,X	CHATURVEDULA V S P ET AL: "New cytotoxic coumarins and prenylated benzophenone derivatives from the bark of Ochrocarpos punctatus from the Madagascar rainforest" JOURNAL OF NATURAL PRODUCTS 2002 UNITED STATES, vol. 65, no. 7, 2002, pages 965-972, XP002236051 ISSN: 0163-3864 Verbindung 8 page 969, right-hand column, paragraph 5 -----	1-16, 22-25, 27,28

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP 02/12967

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. [X] Claims Nos.: –
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

see supplemental sheet ADDITIONAL MATTER PCT/ISA/210

2. [ ] Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. [ ] Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. [ ] As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. [ ] As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. [ ] As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. [ ] No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

[ ] The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

[ ] No protest accompanied the payment of additional search fees.

Continuation of Box I.1

Although Claims 11, 22 and 24-26 relate to a method for treatment of the human or animal body, the search was carried out on the basis of the alleged effects of the compounds.

Continuation of Box I.1

PCT Rule 39.1(iv) - method for treatment of the human or animal body by therapy.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Int nales Aktenzeichen
PCT/EP 02/12967

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 A61K31/12 A61K35/64

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)
EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, EMBASE

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	DE OLIVEIRA CECILIA M A ET AL: "Floral resins of Clusia spp.: Chemical composition and biological function." TETRAHEDRON LETTERS, Bd. 37, Nr. 36, 1996, Seiten 6427-6430, XP002236050 ISSN: 0040-4039 Verbindung 3 Seite 6427, Zeile 12 - Zeile 14 --- -/--	14-16, 22,23, 26-29

[X] Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

[ ] Siehe Anhang Patentfamilie

° Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
"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 allein aufgrund dieser Veröffentlichung 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

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
31. März 2003	11/04/2003

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde	Bevollmächtigter Bediensteter
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Loher, F

Formblatt PCT/ISA/210 (Blatt 2) (Juli 1992)

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	GUSTAFSON KIRK R ET AL: "The guttiferones, HIV-inhibitory benzophenones from Symphonia globulifera, Garcinia livingstonei, Garcinia ovalifolia and Clusia rosea." TETRAHEDRON, Bd. 48, Nr. 46, 1992, Seiten 10093-10102, XP001146562 ISSN: 0040-4020 Verbindungen 5 und 7 Seite 10098, Zeile 12 - Zeile 17 ---	14-16, 22,23, 26-29
X,P	CUESTA-RUBIO OSMANY ET AL: "Polyisoprenylated benzophenones in Cuban propolis;biological activity of nemorosone." ZEITSCHRIFT FUER NATURFORSCHUNG SECTION C JOURNAL OF BIOSCIENCES, Bd. 57, Nr. 3-4, März 2002 (2002-03), Seiten 372-378, XP009008412 ISSN: 0939-5075 Verbindung 2 Tabelle 2 ---	1-29
X,P	DIAZ-CARBALLO DAVID ET AL: "Isolation and characterization of the novel antitumoral compound FB1, a potent telomerase- and topoisomerase-I-inhibitor." PROCEEDINGS OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH ANNUAL, Bd. 43, März 2002 (2002-03), Seite 250 XP001146555 93rd Annual Meeting of the American Association for Cancer Research;San Francisco, California, USA; April 06-10, 2002, March, 2002 ISSN: 0197-016X Zusammenfassung ---	1-29
P,X	CHATURVEDULA V S P ET AL: "New cytotoxic coumarins and prenylated benzophenone derivatives from the bark of Ochrocarpos punctatus from the Madagascar rainforest" JOURNAL OF NATURAL PRODUCTS 2002 UNITED STATES, Bd. 65, Nr. 7, 2002, Seiten 965-972, XP002236051 ISSN: 0163-3864 Verbindung 8 Seite 969, rechte Spalte, Absatz 5 -----	1-16, 22-25, 27,28

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

ıationales Aktenzeichen
PCT/EP 02/12967

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. [X] Ansprüche Nr. –
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich

siehe Zusatzblatt WEITERE ANGABEN PCT/ISA/210

2. [ ] Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich

3. [ ] Ansprüche Nr.
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. [ ] Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.

2. [ ] Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchengebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.

3. [ ] Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.

4. [ ] Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

[ ] Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.

[ ] Die Zahlung zusätzlicher Recherchengebühren erfolgte ohne Widerspruch.

WEITERE ANGABEN **PCT/ISA/ 210**

Fortsetzung von Feld I.1

Obwohl die Ansprüche 11, 22 und 24-26 sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers beziehen, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindungen.

Fortsetzung von Feld I.1

Regel 39.1(iv) PCT - Verfahren zur therapeutischen Behandlung des menschlichen oder tierischen Körpers