

Dieser Text wurde durch das DPMA aus Originalquellen übernommen. Er enthält keine Zeichnungen. Die Darstellung von Tabellen und Formeln kann unbefriedigend sein.

# DE 00010329874 B4

Anmeldeland: DE

Anmeldenummer: 10329874

Anmeldedatum: 02.07.2003

Veröffentlichungsdatum: 20.08.2009

Hauptklasse: C07D 493/04(2006.01,A)

Nebeklasse: A61K 31/35(2006.01,A)

Doppelstrichklasse: A61P 35/00(2006.01,A)

MCD-Hauptklasse: C07D 493/04(2006.01,A)

MCD-Nebeklasse: A61K 31/35(2006.01,A)

MCD-Nebeklasse: A61K 31/352(2006.01,A)

MCD-Nebeklasse: C07D 311/86(2006.01,A)

MCD-Doppelstrichklasse: A61P 35/00(2006.01,A)

CPC: A61K 31/352(2013.01)

CPC: C07D 311/86(2013.01)

CPC: C07D 493/04(2013.01)

ECLA: A61K 31/352

ECLA: C07D 311/86

ECLA: C07D 493/04

Entgegenhaltung (NPL):J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1: Organic and Bio-Organic Chem. (1972-1999) (1975), (6), S. 549-554

Entgegenhaltung (NPL):J. Nat. Prod. (2002), 65, S. 364-367

Erfinder: Bringmann, Gerhard, Prof. Dr., 97074 Würzburg, DE

Erfinder: Hentschel, Ute, Dr., 97070 Würzburg, DE

Erfinder: Kozitskaya, Svetlana, Dr., 97072 Würzburg, DE

Erfinder: Lang, Gerhard, 97072 Würzburg, DE

Erfinder: Müller, Werner Ernst Georg, Prof. Dr., 65203 Wiesbaden, DE

Erfinder: Schaumann, Karsten, Dr., 27578 Bremerhaven, DE

Erfinder: Steffens, Stefan, 52072 Aachen, DE

Erfinder: Ziebuhr, Wilma, Dr., 97209 Veitshöchheim, DE

Anmelder: Johannes-Gutenberg-Universität Mainz, 55122 Mainz, DE

Anmelder: Julius-Maximilians-Universität Würzburg, 97070 Würzburg, DE

Anmelder: Stiftung Alfred-Wegener-Institut für Polar- und Meeresforschung Stiftung des öffentlichen Rechts, 27570 Bremerhaven, DE

## [DE]Tajixanthonhydrat und dessen Verwendung zur Behandlung von Tumorerkrankungen

Seite 1 --- ()

Seite 2 --- ()

**[0001]** Die vorliegende Erfindung betrifft Tajixanthonhydrat und dessen Verwendung zur Behandlung von Tumorerkrankungen.

Hintergrund der Erfindung

**[0002]** Nach Aussagen des Weltgesundheitsberichtes 2002 der World Health Organization (WHO) sind Infektionskrankheiten weltweit nach wie vor die Todesursache Nr. 1. Besonders in den Entwicklungsländern sterben jährlich Millionen Menschen an den Folgen von Durchfallerkrankungen, Malaria, Tuberkulose, AIDS und anderen Infektionskrankheiten. Während in den Industrieländern die klassischen Infektionskrankheiten größtenteils zunächst besiegt schienen, tritt hier nunmehr jedoch eine neue Problematik zu Tage: Immer mehr Keime entwickeln Resistenzen gegenüber den gängigen Antibiotika. Dazu gehören die Grampositiven Erreger wie die Staphylokokken und Enterokokken, welche Septikämien und andere Infektionen auslösen, hauptsächlich bei immunsupprimierten Patienten. Als besondere Problemherde sind die Methicillin- und Oxacillin-resistenten Staphylokokken (MRSA, ORSA), die Vancomycin-resistenten Enterokokken sowie die multiresistenten Pseudomonaden zu nennen.

**[0003]** Eine weitere Herausforderung auf dem Gebiet der antibiotischen Wirkstoff-Findung stellt die Suche nach natürlich gebildeten, nichttoxischen Substanzen dar, die die Bildung von mikrobiellen Biofilmen potent verhindern. Unter Biofilmen versteht man eine Gemeinschaft von Mikroorganismen, die sich in eine extrazelluläre Polysaccharid-Matrix einhüllt, wodurch die Einzelzellen befähigt werden, aneinander und/oder an Oberflächen zu haften (J. W. Costerton, Z. Lewandowski, D. E. Caldwell, D. R. Korber, H. M Lappin-Scott, Annu Rev Microbiol 1995, 49, 711-745; P. Stoodley, K. Sauer, D. G. Davies, J. W. Costerton, Annu. Rev. Microbiol. 2002, 56, 187-209). Die mikrobielle Gemeinschaft kann dabei sowohl aus einer als auch aus mehreren Spezies bestehen. Die Organisation von planktonischen Zellen in einem Biofilm führt zu einer deutlich erhöhten Widerstandsfähigkeit der gesamten Population gegenüber Umwelteinflüssen. Biofilme sind daher nicht als eine Ansammlung von Einzelzellen zu verstehen. Sie ähneln vielmehr in ihrer Physiologie einem multizellulären Organismus, in dem unterschiedliche Genexpression und metabolische Aktivität, Dynamik und Arbeitsteilung herrschen.

**[0004]** Biofilme sind in der Natur weit verbreitet. Sie finden sich bevorzugt an den Grenzflächen zwischen fester und flüssiger Phase und stellen im aquatischen Milieu (Flüssen, Seen, Meeren etc.) möglicherweise die vorherrschende Lebensform von Mikroorganismen dar. Biofilme können aber auch zum Problemfall für den Menschen werden. So stellen Biofilm-bildende humanpathogene Bakterien eine bedeutende Ursache für chronische und rekurrende Infektionen in der Humanmedizin dar. Bekannte Beispiele hierfür sind die Plaquebildung auf Zähnen durch Streptokokken, die Alginatbildung von Pseudomonas aeruginosa bei Lungeninfektionen im Rahmen einer cystischen Fibrose und nicht zuletzt die Besiedlung von Kunststoff- und Metallimplantaten durch Biofilm-bildende Staphylokokken in der modernen Intensivmedizin.

**[0005]** Ein weiteres wirtschaftlich bedeutendes Problemfeld außerhalb der Medizin ist die Biofilmbildung auf den im Wasser befindlichen Teilen von Schiffen. Biofilme bilden hier die organische Matrix für den Aufwuchs von Muscheln oder Bryozoen. Dieser Sekundäraufwuchs auf Schiffsrümpfen kann mehrere Dezimeter dick werden. Die Folge ist eine drastische Erhöhung des Wasserwiderstandes und damit eine Reduktion der Beweglichkeit und der Fahrtgeschwindigkeit der Schiffe. Der auf beiden Gebieten, (i) Biofilm-Bildung auf Materialien, die in Haushalt oder Klinik benutzt werden, und (ii) Biofilm-Bildung auf Fahrzeugen im aquatischen Milieu, eintretende wirtschaftliche Schaden ist beträchtlich und beträgt weltweit die Größenordnung von mehreren 100 Millionen EUR. Deshalb wird intensiv nach Substanzen gesucht, die die Biofilm-Bildung hemmen.

**[0006]** Eine rationale Suche nach potenten bioaktiven Substanzen setzt an der Erforschung derjenigen Prozesse an, die im aquatischen Milieu eine Biofilm-Bildung verhindern. Es ist bekannt, daß Organismen, die im Süß- oder im Meerwasser vorkommen, meist jahrelang ohne Aufwuchs leben können. Eine Strategie dieser Organismen (meist Tiere) ist es, durch Schleimabsonderung die Biofilm-bildenden Mikroorganismen von ihrer Oberfläche wegzuspülen. Weiterhin beherbergen diese aquatischen Tiere Mikroorganismen, die bioaktive Substanzen bilden und diese an die Oberfläche der Tiere abgeben. Somit wird die Primärbesiedelung durch Biofilm-bildende Mikroorganismen unterdrückt; infolge dessen wird auch eine Besiedelung mit Sekundärorganismen verhindert.

**[0007]** Solche bioaktiven Substanzen, die eine inhibierende Wirkung auf Primär- und Sekundärbesiedelung ausüben, werden Antifouling-Wirkstoffe genannt. Bisher sind noch keine Substanzen aus lebenden Organismen, die eine solche Antifouling-Aktivität besitzen, bekannt.

### Seite 3 --- ()

**[0008]** Ziel der Forschung auf diesem Gebiet muß es deshalb sein, derartige Mikroorganismen zu identifizieren, die bioaktive Substanzen mit Antifouling-Wirksamkeit produzieren. Zur wirtschaftlichen Nutzung solcher Antifouling-Substanzen muß auch gewährleistet sein, daß diese Produzenten kultivierbar sind. Einen solcher Organismus ist der Pilz der Spezies *Emericella varicolor*, der Wirkstoffe aus der Klasse der Tajixanthonhydrate produziert. Im Folgenden wird die Anwendung von Tajixanthonhydrat und verwandten Diolen als potente Wirkstoffe zur Verhinderung der Biofilm-Bildung beschrieben.

**[0009]** Im Hinblick auf die wachsende Bedeutung von nosokomialen Infektionen haben die Erfinder ihre Bestrebungen auf die Identifizierung von Biofilm-inhibierenden Wirkstoffen gegen multiresistente *Staphylococcus aureus*- und *S.-epidermidis*-Erreger konzentriert. Diese Bakterien treten hauptsächlich im Zusammenhang mit der Verwendung von Kunststoff- und Metallimplantaten auf und lösen besonders bei immunsupprimierten Patienten schwere Allgemeininfektionen aus. *Staphylococcus epidermidis* und *Staphylococcus aureus* sind gegenwärtig die häufigste Ursache für Krankenhausinfektionen überhaupt. Beide Spezies bilden auf künstlichen Oberflächen (z. B. auf Venenkathetern, Herzschrittmachern oder auf Gelenkersatz) Biofilme aus, die aus den Bakterien selbst und einer Polysaccharidmatrix bestehen. Diese Matrix, die auch als Polysaccharid-Interzelluläres-Adhäsion (PIA) bezeichnet wird, besteht aus  $\alpha$ -1,6-verknüpften Glucosaminoglycan-Untereinheiten, die mit unterschiedlichen Seitengruppen substituiert sind (D. Mack, W. Fischer, A. Krokotsch, K. Leopold, R. Hartmann, H. Egge, R. Laufs, J. Bacteriol. 1996, 178, 175&ndash;83). Die Substanz vermittelt die Adhärenz der Zellen untereinander und ist damit für das dreidimensionale, mehrschichtige Wachstum eines Staphylokokken-Biofilms verantwortlich. Bisher konnte man vier Proteine, IcaA, IcaD, IcaB und IcaC, identifizieren, die in die PIA-Synthese involviert sind (C. Heilmann, O. Schweitzer, C. Gerke, N. Vanittanakom, D. Mack, F. Götz, Mol. Microbiol. 1996, 20, 1083&ndash;91; C. Gerke, A. Kraft, R. Süßmuth, O. Schweitzer, F. Götz, J. Biol. Chem. 1998, 29, 18586&ndash;93). Die Gene, die für diese Enzyme kodieren, sind im so genannten icaADBC-Operon organisiert, das bisher in allen getesteten *S.-aureus*-Isolaten und in 70 bis 80 Prozent aller *S.-epidermidis*-Stämme aus Fremdkörper-assoziierten Infektionen nachgewiesen wurde (W. Ziebuhr, C. Heilmann, F. Götz, P. Meyer, K. Wilms, E. Straube, J. Hacker, Infect. Immun. 1997, 65, 890&ndash;6; S. E. Cramton, C. Gerke, N. F. Schnell, W. W. Nichols, F. Götz, Infect Immun. 1999, 67, 5427&ndash;33).

**[0010]** Obwohl das PIA nach allen bisherigen Erkenntnissen der wichtigste Faktor für den Aufbau eines Biofilms bei Staphylokokken ist, sind daran aber auch noch weitere Komponenten beteiligt. So konnte nachgewiesen werden, daß die Etablierung eines Biofilms in zwei Phasen abläuft. Die erste Phase erfordert zunächst die Adhärenz der Staphylokokken auf der Oberfläche, an die sich in der zweiten Phase die PIA-vermittelte Akkumulation des Biofilms anschließt. Die erste Phase der Biofilmbildung, die auch als initiale Adhärenz bezeichnet wird, wird bei *S. epidermidis* durch ein Oberflächenprotein vermittelt, das als AtlE bekannt ist (C. Heilmann, M. Hussain, G. Peters, F. Götz, Mol. Microbiol. 1997, 24, 1013&ndash;24). AtlE übt neben der initialen Adhärenz noch eine weitere Funktion in der Staphylokokkenzelle aus. Es ist als Autolysin-Protein an der Separation der Zellwand bei der Zellteilung beteiligt. Mutationen im atlE-Gen führten daher zur Hemmung der Biofilmbildung auf Oberflächen und zur Entstehung von Zellaggregaten im Kulturüberstand (C. Heilmann, M. Hussain, G. Peters, F. Götz, Mol. Microbiol. 1997, 24, 1013&ndash;24).

**[0011]** Beschichtungen von z. B. Kathetern mit antimikrobiell wirksamen Substanzen wie Minocyclin oder Rifampicin oder die Instillation von Antibiotika in das Katheterlumen sind eine von mehreren Möglichkeiten, Biofilmbildung zu verhindern oder zu unterdrücken. In der Mehrzahl der im medizinischen Bereich auftretenden Biofilmen wird lediglich eine therapeutische Behandlung mit konventionellen Bioziden durchgeführt, eine effiziente Prophylaxe ist bislang noch nicht erzielt worden.

**[0012]** Chexal, Kuldip K.; Holker, John S. E.; Simpson, Thomas J. "Biosynthesis of fungal metabolites. VI. Structures and biosynthesis of minor metabolites from variant strains of *Aspergillus varicolor*. Robert Robinson Lab., Univ. Liverpool, Liverpool, UK Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1: Organic and Bio-Organic Chemistry (1972&ndash;1999) (1975), (6), 549&ndash;54. beschreiben die Bildung von Tajixanthonhydrat (Formel 1) durch Hydrolyse von Tajixanthon (dem Epoxid). Biologische Aktivitäten werden nicht erwähnt.

**[0013]** Malmstrom et al. (Malmstrom J, Christophersen C, Barrero AF, Oltra JE, Justicia J, Rosales A. "Bioactive metabolites from a marine-derived strain of the fungus *Emericella varicolor*." J Nat Prod 2002 Mar; 65(3): 364&ndash;7) beschreiben die Isolierung der Stoffe Varitriol, Varioxiran, Dihydroterrein und Varixanthon aus dem Pilz *Emericella varicolor*. Varixanthon zeigte eine antimikrobielle Aktivität.

**[0014]** Malmstrom et al. beschreiben weiterhin die antimikrobielle Aktivität von Tajixanthonhydrat gegenüber *E. coli*, *E. faecalis*, *B. subtilis* und *S. aureus*.

### Seite 4 --- ()

Formel 1:

**[0015]** Es ist somit eine Aufgabe des vorliegenden Erfindung, neuartige Verwendungen von Tajixanthonhydrat zur Verfügung zu stellen.

**[0016]** Durch die Anwendung eines einfachen Screening-Assays zur Biofilmbildung bei Staphylokokken (G. D. Christensen, W. A. Simpson, J. J. Younger, L. M. Baddour, F. F. Barrett, D. M. Melton, E. H. Beachey, J. Clin. Microbiol. 1985, 22, 996&ndash;1006) konnte aus dem marinen Pilz *Emericella varicolor* die bioaktive Verbindung isoliert werden, die als Tajixanthonhydrat 1 identifiziert wurde. Diese Substanz greift beispielsweise in die Biofilmbildung von Staphylokokken ein, ohne den Erreger abzutöten.

**[0017]** Die Aufgabe wird erfindungsgemäß durch die Verwendung von Tajixanthonhydrat (Formel 1) zur Behandlung von Tumorerkrankungen gelöst.

**[0018]** Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von Tajixanthonhydrat, gegebenenfalls als eine pharmazeutische Zusammensetzung, umfassend eine therapeutisch wirksame Menge einer Verbindung gemäß der vorliegenden Erfindung, gegebenenfalls zusammen mit geeigneten Zusatz- oder Hilfsstoffen. Diese Stoffe sind dem Fachmann gut bekannt und können der einschlägigen Literatur entnommen werden. Bevorzugt ist eine erfindungsgemäße Verwendung, bei der die Verbindung in Form einer Depotsubstanz oder als Vorläufer, gegebenenfalls zusammen mit einer geeigneten, pharmazeutisch verträglichen Verdünnungslösung oder Trägersubstanz vorliegt. Besonders bevorzugt liegt diese als Oberflächenbeschichtung, als Zusatz von Werkstoffen oder Spüllösungen vor. Weiter bevorzugt ist eine pharmazeutische Zusammensetzung oder Verwendung gemäß der vorliegenden Erfindung, die weitere Chemotherapeutika enthält. Diese Chemotherapeutika können alle für den Fachmann üblichen Chemotherapeutika im Rahmen einer Krebstherapie umfassen (z. B. Taxol oder andere).

**[0019]** Erfindungsgemäß kann Tajixanthonhydrat bevorzugt mit den üblichen Lösungsmitteln, Hilfs- und Trägerstoffen zu Tabletten, Dragees, Kapseln, Tropflösungen, Suppositorien, Injektions- und Infusionszubereitungen verarbeitet werden, um therapeutisch zur peroralen, rektalen oder parenteralen Applikation Verwendung zu finden.

[0020] In Vergleichsbeispielen wurden Biofilm-inhibierende Aktivitäten durch Nachweis des Wachstums und

## Seite 5 --- ()

Anheftung von *S. epidermidis* (Klinikisolat) auf Polystyrol-Platten mit oder ohne Zugabe von Tajixanthonhydrat (gereinigter Extrakt) getestet. Dabei konnte gezeigt werden, daß nach 24 h schon eine Konzentration von 10 µg/ml die Biofilmbildung um 81% reduziert hat (80 µg/ml &ndash; 91%) Weiterhin konnte festgestellt werden, daß die Substanz die Bakterien weder abtötet, noch die Wachstumsrate inhibiert ist. Ungeklärt ist allerdings, wo im Stoffwechsel der Bakterien das Tajixanthonhydrat eingreift, damit die Biofilmbildung inhibiert wird.

[0021] Ein weiterer Vergleichs-Test zur Bestimmung der Wirkung von Tajixanthonhydrat bei Biofilmen war der Nachweis der Biofilm-Inhibition an Polystyrolplatten von Bakterien aus Salzwasser (isoliert aus dem Meeresschwamm *Suberites domuncula*) nach Anzucht dieser auf verschiedenen Materialien.

[0022] Danach wurden die Kolonien isoliert und reine Bakterienkolonien hergestellt, die anschließend für 72 h mit (verschiedene Konzentrationen) oder ohne Zusatz von Tajixanthonhydrat inkubiert wurden. Der entstandene Biofilm wurde nach Anzahl der Bakterien (CFU) analysiert und eine Reduktion, in Abhängigkeit der getesteten Bakterienstämme, bei einer Konzentration von 1 µg/ml zwischen 30% und 65% festgestellt, bei einer Konzentration von 10 µg/ml zwischen 70% und 90%.

[0023] Für die erfindungsgemäße Anwendung wurde die Substanz auf ihre Wirkung auf Tumorzellen getestet. Unter Benutzung von Nager- und humanen Tumorzelllinien konnte *in vitro* gezeigt werden, daß Tajixanthonhydrat eine zytostatische Aktivität ausübt.

[0024] Die vorliegende Erfindung betrifft somit die Verwendung von Tajixanthonhydrat zur Behandlung von Tumorerkrankungen. Diese Verwendung kann zum Beispiel in Form einer Depotsubstanz oder als Vorläufer zusammen mit einer geeigneten, pharmazeutisch verträglichen Verdünnungslösung oder Trägersubstanz erfolgen. Im Falle der Behandlung von Tumorerkrankungen ist eine Behandlung in einem Konzentrationsbereich zwischen 0,3 und 30,0 µg/ml bevorzugt. Die Herstellung solcher Medikamente kann analog zu der oben beschriebenen Weise erfolgen.

[0025] Die vorliegende Erfindung beschreibt weiterhin ein Verfahren zur Behandlung einer Erkrankung, ausgewählt aus Tumor- und/oder bakteriellen Erkrankungen und/oder Entzündungszuständen, die das Verabreichen einer erfindungsgemäßen Verbindung, etwa in Form einer erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zusammensetzung, umfaßt. Die Verabreichung kann erfindungsgemäß in Form einer Depotsubstanz oder als Vorläufer zusammen mit einer geeigneten, pharmazeutisch verträglichen Verdünnungslösung oder Trägersubstanz erfolgen.

[0026] Im Rahmen der vorliegenden Erfindung soll unter einem "Derivat" eine Verbindung der Tajixanthon-Klasse verstanden werden, die aus anderen (z. B.) marinen Organismen isoliert werden kann, als den hier (beispielhaft) erwähnten.

[0027] Unter einem "Vorläufer" einer Substanz soll im Rahmen der vorliegenden Erfindung zum einen eine Substanz verstanden werden, die im Laufe ihrer Verabreichung zur Behandlung durch die Bedingungen im Körper (z. B. pH im Magen, oder ähnliches) so verändert wird, oder aber durch den Körper nach Aufnahme so metabolisiert wird, daß sich als wirksame Substanz die erfindungsgemäße Verbindung oder deren Derivate bilden. Zum anderen werden als Vorläufer aus Organismen isolierte Derivate von Tajixanthon verstanden, die als Ausgangsprodukte zur Synthese der Verbindung in dem jeweiligen Organismus dienen und bereits die hierin angegebenen Eigenschaften des Tajixanthon aufweisen.

[0028] Die Erfindung soll nun im folgenden weiter in den Beispielen unter bezug auf die beigefügte Figur beschrieben werden, ohne jedoch auf diese begrenzt zu sein. Es zeigt

[0029] **Fig. 1.** Die Wachstumskurve eines Biofilm-negativen *S. epidermidis* 196 nach Zugabe von Tajixanthonhydrat (cfu: Colony-forming units) (Vergleichsbeispiel).

Beispiel 1: Beschreibung des allgemeinen Verfahrens der Pilzanzucht und der Isolierung der bioaktiven Substanz

[0030] Der vorliegende Pilzstamm der Spezies *Emericella varicolor* wurde am 16.05.2000 aus dem marinen Schwamm *Haliclona valliculata*, welcher vor der Capo di Fonza auf Elba, Italien, gesammelt wurde, isoliert. Der Schwamm wurde sofort nach der Entnahme mit Hilfe einschlägiger marin-mykologischer Methoden auf seinen Pilzbesatz hin untersucht. Die vorliegende Isolation wurde durch Auslegen kleiner Gewebestückchen des se

## Seite 6 --- ()

zierten Schwammes auf einer Nähragarplatte folgender Zusammensetzung (CYAS-Medium; J. I. Pitt, *Mycologia* 1973, 65, 1135&ndash;1157) gewonnen:

Czapek-Yeast Extract-Agar + Seawater:

30 g Saccharose 5 g Yeast Extract 3 g NaNO<sub>3</sub> 1 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 ml Mineral-Lösung: 5 g KCl, 5 g MgSO<sub>4</sub> + 7H<sub>2</sub>O, 0,1 g FeSO<sub>4</sub> + 7H<sub>2</sub>O/100 ml H<sub>2</sub>O 1 ml Spurenmetall-Lösung: 1 g ZnSO<sub>4</sub> + 7H<sub>2</sub>O, 0,5 g CuSO<sub>4</sub> + 5H<sub>2</sub>O/100 ml H<sub>2</sub>O Antibiotika 1000 ml Meerwasser (30&ndash;33 PSU)

[0031] Durch mehrere Reinigungsstufen wurde die primäre Rohkultur zu einer axenischen Reinkultur weitergezüchtet. Die Stammkultur erfolgte auf Schrägagarröhrchen folgender Zusammensetzung (GPYNS-Medium; K. Schaumann, *Mar. Biol.* 1974, 28, 221&ndash;235):

Glucose-Pepton-Hefeextrakt-Ammoniumnitrat-Meerwasser-Agar:

1,0 g Glucose 0,5 g Pepton 0,1 g Hefeextrakt 1,0 g Ammoniumnitrat 15,0 g Agar 1000 ml Meerwasser (30&ndash;33 PSU) P<sub>H</sub> 7,2&ndash;7,4

[0032] Die Anzucht der Pilzkultur für die Gewinnung des Naturstoffes Tajixanthonhydrat erfolgte in 1-L-Erlenmeyerkolben, die mit je 300 ml Nährlösung folgender Zusammensetzung (WS-Medium; L. J. Wickerham, *US Dept. Tech. Bull.* 1951, 1029, 1&ndash;56) beschickt wurden:

Wickerham-Meerwasser-Medium:

3,0 g Hefeextrakt 3,0 g Malzextrakt 5,0 g Pepton 10,0 g Glucose 1000 ml Meerwasser (30&ndash;33 PSU) P<sub>H</sub> 7,2&ndash;7,4

[0033] Die Sterilisation der Nährlösung erfolgte durch Autoklavieren bei 121°C/1 bar, 15 Minuten. Als Inokulum für die experimentelle Pilzkultur dienten zehn Stück Mycelscheibchen (Durchmesser 5 mm) je Kolben. Diese wurden aus einer 7 Tage alten Vorkultur auf WS-Agar mit Hilfe eines Korkbohrers ausgestanzt und in die Nährlösung (300 ml je Kolben) übertragen. Die Inkubation der beimpften Kolben erfolgte über einen Zeitraum von 14 Tagen bei Raumtemperatur oder auch konstant 20°C in statischer Kultur im Dunkeln. Anschließend wurde das gewachsene Mycel einschließlich der Kulturbrühe abgeerntet, mit 40 ml Ethylacetat pro 300 ml Kulturbrühe versetzt und bei &ndash;86°C tiefgefroren.

[0034] Von insgesamt 30 300-ml-Kulturansätzen wurde das Mycel vom Kulturmedium durch Filtration getrennt und das Kulturfiltrat dreimal mit je einem Liter Essigester extrahiert. Die Essigesterphasen wurden vereinigt und im Vakuum zur Trockne eingeengt. Dieser Extrakt wurde in 200 ml Methanol + 3% Wasser aufgenommen und dreimal mit je 100 ml Petrolether extrahiert. Die Petroletherphasen wurden vereinigt im Vakuum eingeengt und einer präparativen HPLC-Trennung unterzogen:

Säule: Waters SymmetryPrep C18, 19 x 300 mm

Eluent: Wasser, Acetonitril + 0.05% TFA

Gradient: von 70% Acetonitril auf 94% Acetonitril in 20 min, 30 min halten auf 94% Acetonitril

Fluss: 12 ml/min

## Seite 7 --- ()

Detektion: 254 nm

**[0035]** Zwischen 18 und 19 min eluierte eine Vorstufe, welche sich beim Einengen und Trocknen vollständig zu Tajixanthonhydrat umwandelte. Durch einen weiteren präparativen HPLC-Lauf wurde die Verbindung weiter aufgereinigt:

Säule: Waters SymmetryPrep C18, 19 x 300 mm

Eluent: Wasser, Acetonitril + 0.05% TFA

Gradient: von 10% Acetonitril auf 100% Acetonitril in 30 min

Fluss: 12 ml/min

Detektion: 254 nm

**[0036]** Tajixanthonhydrat eluierte zwischen 24 und 25 min und ergab nach dem Trocknen 12 mg eines gelben, kristallinen Feststoffs (mp 195°C;  $[\alpha]_D^{25}$  -58.6° (CHCl<sub>3</sub>; c = 0.33)). Die NMR-Daten stimmten gut mit früher veröffentlichten (J. S. D. Holker, R. D. Lapper, T. J. Simpson, J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1 1974, 2135-2140) überein.

MS (70 eV): m/z (%) 440 (46) [M<sup>+</sup>], 372 (44), 371 (45), 333 (86), 283 (28), 255 (36).

## Seite 8 --- ()

Tabelle 1 NMR-Daten von Tajixanthonhydrat

Position  $\delta_{\text{H}}$  (ppm)  $\delta_{\text{C}}$  (ppm)

1	7.22 d	119.34
2	138.81	
3	149.84	
4	121.15	
5	117.08	
6	152.21	
7	184.58	
8	109.49	
9	160.67	
10	6.76 d	110.21
11	7.52 d	138.41
12	116.31	
13	153.36	
14	5.40 dd	63.52
15	2.74 d	45.07
16	4.34 ddd/4.42 dd	64.81
17	142.70	
18	1.85 s	22.72
19	4.58 dd/4.81 dd	112.54
20	2.35 d	17.59
21	2.70 dd/3.19 dd	32.13
22	3.74 dd	77.99
23	73.31	
24	1.42 s	26.74
25	1.37 s	23.77

Beispiel 2: (Vergleichsbeispiel) Biologische Aktivitäten

**[0037]** Wirkung des Tajixanthonhydrates im quantitativen Staphylokokken-Biofilmmassay Anwendungsgebiet: Verhinderung des Entstehens eines Staphylokokken-Biofilmes auf Kunststoff- und Metalloberflächen

Biofilm-Assay (S.-epidermidis-Klinik-Isolate)

**[0038]** Eine Übernachtskultur des Biofilm-bildenden Stammes S. epidermidis RP62A wird 1:200 in TSB (Tryptic Soy Broth) verdünnt. 96-Loch-Gewebekultur-Platten (Greiner, Nürtingen, Deutschland) werden mit jeweils 200  $\mu$ l der Bakteriensuspension pro Vertiefung angeimpft und mit dem zu testenden Extrakt (in DMSO) versetzt. Nach 24 Stunden Inkubation bei 37°C wird die optische Dichte des Überstandes bei 600 nm gemessen; anschließend wird aus den Vertiefungen abpipettiert. Der Überstand wird 1:10<sub>6</sub> mit frischem TSB-Medium verdünnt und zur Lebendzellzahlbestimmung (CFU, Colony Forming Unit) auf TSB-Agarplatten ausplattiert. Die Gewebekulturplatte wird 3x mit PBS (Phosphat-gepufferte Saline) gewaschen, bei 37°C vollständig getrocknet und anschließend mit einer gesättigten Kristallviolett-Lösung (je 200  $\mu$ l pro Vertiefung für 5 Minuten) gefärbt. Nach erneutem Waschen und Trocknen bei 37°C wird die Absorption des anhaftenden Biofilms bei 490 nm mit Hilfe eines ELISA-Platten-Readers bestimmt. Eine Absorption von < 0.12 gilt als negativ, eine Absorption

## Seite 9 --- ()

von 0.12-0.24 gilt als schwach positiv und eine Absorption von > 0.24 gilt als Biofilm-positiv.

Ergebnis:

**[0039]** Es wurden verschiedene Extrakte in Konzentrationen von 10, 20, 50, 100  $\mu$ g/ml getestet. Die Substanz Tajixanthonhydrat reduzierte die Biofilmbildung von S. epidermidis RP62A um bis zu 91%, ohne jedoch die Wachstumsrate der Bakterien zu beeinträchtigen oder die Keime zu töten (Tab. 2, 3; Fig.). Die Daten hinsichtlich der Biofilminhibierung konnten durch Elektronenmikroskopie (REM) und konfokale Mikroskopie (CLSM) bestätigt und abgesichert werden. Damit übt Tajixanthonhydrat einen deutlich hemmenden Effekt auf die Biofilmbildung von S. epidermidis aus, wobei an dieser Stelle noch offen bleibt, ob die Substanz die initiale Adhärenz der Staphylokokken beeinträchtigt und/oder eher in die akkumulative Phase der Biofilmbildung (PIA-Synthese) eingreift. Tabelle 2 Effekt des Tajixanthonhydrates auf die Biofilmbildung von S. epidermidis RP62A

Konzentration ( $\mu$ g/ml)  $A_{490\text{ nm}}$  % Biofilm-Reduzierung CFU im Kulturüberstand

0	1.029 ± 0.14	1.51E+7
10	0.192 ± 0.04	81 2.85E+7
20	0.167 ± 0.06	84 5.77E+7
30	0.166 ± 0.04	84 3.05E+7
40	0.159 ± 0.04	84 4.37E+7
50	0.119 ± 0.01	88 4.9E+7
60	0.11 ± 0.02	89 1.3E+7
70	0.1 ± 0.03	90 3.31E+7

80 0.091 ± 0.02 91 1.06E+8  
90 0.09 ± 0.03 91 2.92E+7  
100 0.092 ± 0.03 91 3.37E+7

Tabelle 3: Wachstumsrate und Generationszeit des Biofilm-negativen *S. epidermidis*-Stammes 196 nach Zugabe von Tajixanthonhydrat  
Experiment Spezifische Wachstumsrate (&mgr;) Generationszeit (G)  
Kontrolle 0.64 hr<sup>-1</sup> 1.14 hr  
20 &mgr;g/ml 0.68 hr<sup>-1</sup> 1.17 hr  
100 &mgr;g/ml 0.60 hr<sup>-1</sup> 1.46 hr

Beispiel 3: (Vergleichsbeispiel) Wirkung des Tajixanthonhydrates im Biofilmmassay (Anwendungsgebiet: Beispielsweise Verhinderung des Aufwuchses auf Schiffsrümpfen): (a) Gewinnung von Bakterien, die Biofilme produzieren, aus dem aquatischen Milieu

**[0040]** Solide Platten wurden etwa ein bis drei Tage lang im Wasser aufgestellt, im hier vorliegenden Beispiel in Seewasser-Aquarien. Entsprechend können die Platten zur Biofilm-Bildung auch in Süßwasser gelegt werden. Als Material (Dicke bis zu 3 cm) wurden Platten z. B. aus Aluminium, Polyacryl, Glas oder anderem Material ausgewählt. Nach der submersen Verweilzeit in Seewasser siedelten sich Biofilm-produzierende Mikro

## Seite 10 --- ()

organismen auf den Platten an. In dem hier aufgeführten Beispiel wurden Bakterienkolonien isoliert und auf Agarplatten weiter gezüchtet. Diese Vereinzelungsschritte, die zur Herstellung von reinen Bakterien-Kolonien führen, sind Stand der Technik; deshalb braucht hier nicht auf die Methodik eingegangen zu werden. Die Biofilm-produzierenden Bakterien wurden zusammen mit kommensalistischen/symbiontischen Bakterien aus dem Meeresschwamm *Suberites domuncula* isoliert. Die Methode ist beschrieben (N. L. Thakur, U. Hentschel, A. Krasko, C. T. Pabel, A. C. Anil, W. E. G. Müller, *Aquatic Microbial. Ecol.* 2003, 31, 77-83). Als Kultivierungsmedium für die Bakterien wurde Agar benutzt, der wie folgt zusammengesetzt war: 0,25% Pepton, 0,15% Hefe-Extrakt, 0,15% Glycerol, 1,6% Agar (in 100% Seewasser). Die "Fouling-Bakterien"-Stämme wurden als FB1, FB2 und FB3 bezeichnet

(b) Methode zur Bestimmung der Antifouling-Aktivität

**[0041]** Die Bakterien, Stämme FB1, FB2 und FB3, wurden in dem Medium B-1 (0,25% Pepton, 0,15% Hefe-Extrakt, 0,15% Glycerin in 100% Seewasser) vermehrt; die Inkubation geschah in Schüttelkulturen bei 30°C. Nach der Anzüchtung wurden 5 &mgr;l dieser Übernachtskultur von Bakterien zu 2 ml B-1-Medium gegeben. Diesem Ansatz wurde nun in steigenden Konzentrationen Tajixanthonhydrat zugegeben. Als Konzentration wurde der Bereich 0,1 bis 30 &mgr;g/ml (Endkonzentration) ausgewählt. In den Kontrollen wurden die Bakterien (Stämme FB1, FB2 und FB3) nur in Medium mit dem Lösungsmittel für die Testsubstanz Tajixanthonhydrat (< 1% DMSO), sowie in den gleichen Testgefäßen inkubiert.

**[0042]** Zur Durchführung der Bebrütung wurden nun die jeweiligen 2-ml-Ansätze in 6-Well-Platten aus Polystyrol gegeben (Falcon no. 3836). Eine Inkubation bei 30°C für eine Dauer von 72 Stunden schloß sich an. Während dieser Inkubation bildeten die Bakterien an der angrenzenden Festphase, dem Plastikmaterial, einen Biofilm.

**[0043]** Nach der Inkubation wurde das Medium mit den in diesem sich befindlichen Bakterien aus den Wells abpipetiert; die Wells wurden anschließend noch zweimal mit sterilem Seewasser ausgespült, um leicht-adhärierende Bakterien zu entfernen. Diejenigen Bakterien, die den Biofilm während dieser Bebrütung produziert hatten, blieben nach dieser Behandlung noch auf den Plastikwandungen der Inkubationsgefäße.

**[0044]** Auswertung: Es wurde die Anzahl der fest-adhärierenden Bakterien, die sich in der Biofilm-Matrix befanden, wie folgt bestimmt. Ein autoklavierter/sterilisierter Wattebausch (Durchmesser des stumpfen Endes: 3 mm) wurde benutzt, um unter stets standardisierten Bedingungen Aliquots an adhärennten Biofilm-Bakterien zu gewinnen. Der Wattebausch wurde anschließend unter Schütteln 2 Minuten lang in 10 ml steriles Seewasser überführt. Danach wurden 100-&mgr;l-Aliquots dieses Bakterien/Seewasser-Ansatzes entnommen und auf Agar-Platten mit B-1-Medium ausgestrichen. Die Ansätze wurden 24 Stunden lang bei 30°C inkubiert. Die Anzahl der Kolonien pro 1-cm<sup>2</sup>-Fläche wurde bestimmt. In einem Vorversuch war die Konzentration der Bakterien im Seewasser derart eingestellt worden, dass sich in den Kontrollansätzen ohne Tajixanthonhydrat im Durchschnitt 2 × 10<sup>2</sup> Bakterienkolonien pro cm<sup>2</sup> auf den Agarplatten ausbildeten. Die Kolonien wurden unter einem Binokular ausgezählt. Die Anzahl dieser Kolonien ist in "Colony-Forming Units (CFU)" angegeben.

**[0045]** Die Ergebnisse sind in der nachfolgenden Tabelle 4 dargestellt.

## Seite 11 --- ()

Bakterien-Stamm	Kontrolle	Tajixanthonhydrat
(10 <sup>2</sup> CFU/cm <sup>2</sup> )	Konzentration (&mgr;g/ml)	(10 <sup>2</sup> CFU/cm <sup>2</sup> )
FB1	3,4 ± 0,5	
FB1	0,1	3,9 ± 0,6
FB1	1	1,8 ± 0,4
FB1	10	0,6 ± 0,3
FB1	30	0,2 ± 0,2
FB2	3,1 ± 0,6	
FB2	1	2,1 ± 0,6
FB2	10	0,9 ± 0,3
FB3	3,9 ± 0,5	
FB3	1	1,4 ± 0,3
FB3	10	0,4 ± 0,3

Tabelle 4: Anzahl an Biofilm-produzierenden Bakterien in Abhängigkeit von der Zugabe an Tajixanthonhydrat. Die Quantifizierung erfolgte durch Angabe von Colony-Forming Units (CFU). Die Anzahl der Parallelversuche war 5.

**[0046]** Ergebnis: Wie in der Tabelle zusammengefaßt, enthielt der Abstrich der Kulturgefäß-Wände (Wells), die mit Biofilm-produzierenden Bakterien in Abwesenheit der Substanz (Kontrolle) inkubiert wurden, eine Konzentration an Bakterien, die mit 3,4 ± 0,5 × 10<sup>2</sup> CFU/cm<sup>2</sup> angegeben wird. Wird Tajixanthonhydrat in steigenden Konzentrationen zu dem Inkubationsmedium hinzugegeben, kommt es zu einer konzentrationsabhängigen Abnahme an Bakterien. Bereits bei einer Konzentration von 1 &mgr;g/ml beträgt die Menge an Bakterien nur noch 1,8 ± 0,4 × 10<sup>2</sup> CFU/cm<sup>2</sup> (bei Bakterienstamm FB1). Diese Abnahme ist signifikant (P < 0.001 - T-Test; nach: L. Sachs, *Angewandte Statistik*. Springer, Berlin; 1984). Die starke inhibierende Wirkung von Tajixanthonhydrat ist Bakterienstamm-abhängig etwas unterschiedlich. Der Stamm FB2 wird mit einer Reduktion auf 2,1 ± 0,6 × 10<sup>2</sup> CFU/cm<sup>2</sup> etwas geringer inhibiert; dafür ist die Reduktion des Stammes FB2 nach Inkubation mit Tajixanthonhydrat (1 &mgr;g/ml) mit 1,4 ± 0,3 × 10<sup>2</sup> CFU/cm<sup>2</sup> vergleichsweise stärker. Bei der höheren Tajixanthonhydrat-Konzentration von 10 &mgr;g/ml ist die Abnahme der Besiedelung an Biofilm-produzierenden Bakterien noch stärker und beträgt bei dem Stamm FB1 0,6 ± 0,3 × 10<sup>2</sup> CFU/cm<sup>2</sup>.

**[0047]** Aus diesem Befund muß geschlossen werden, daß die Antifouling-Aktivität von Tajixanthonhydrat unter den hier angegebenen Testbedingungen hoch ist, wie an der signifikante Reduktion an Biofilm-produzierenden Bakterien abzulesen ist.

Beispiel 4:(3) Wirkung des Tajixanthonhydrates auf Tumorzellen(a) Methode zur Bestimmung der antitumorale Wirkungen

**[0048]** Die Antitumorwirkung wurde u. a. am L5178y-Mäuse lymphomzellensystem nachgewiesen (ATCC CRL 1722). Diese Zellen wurden in Suspensionskultur gehalten, wie bereits früher beschrieben (W. E. G. Müller, R. K. Zahn, Cancer Res. 1979, 39, 1102&ndash;1107). Die ED<sub>50</sub>-Konzentrationen für Tajixanthonhydrat und andere Wirkstoffe wurden wie folgt bestimmt. Die Zellen wurden in RPMI-Medium, dem 10% fötales Kälberserum zugesetzt worden war, kultiviert. Als Inokulumkonzentration wurden 10.000 Zellen/ml gewählt. Zum Startzeitpunkt wurde die ausgewählte Substanz zugegeben und die Kultur 72 Stunden lang bebrütet. Danach wurde die Anzahl der lebenden Zellen mittels des kolorimetrischen XTT-Ansatzes bestimmt und mit einem ELISA-Reader ausgewertet (siehe: D. A. Scudiero, R. H. Shoemaker, K. D. Paull, A. Monks, S. Tierney, T. H. Nofziger, M. J. Currens, D. Seniff, M. R. Boyd, Cancer Res. 1988, 48, 4827&ndash;4833; T. Daum, J. Engels, M. Mag, J. Muth, S. Lücking, H. C. Schröder, E. Matthes, W. E. G. Müller, Intervirology 1992, 33, 65&ndash;75). In analoger Weise wurden die Tumorzell-Linien PC-12 (adrenaler, phaeochromocytomaler Tumor [Ratte]; ATCC CRL 1721), Sarcoma 180 (Sarkom [Maus]; ATCC TIB 66) sowie HeLa S3 (epitheloides Carcinom [Cervix; Mensch]; ATCC CCL 2.2) eingesetzt.

## Seite 12 --- ()

**[0049]** Die ED<sub>50</sub>-Konzentrationen wurden nach Durchführung des kolorimetrischen XTT-Tests durch lineare Regression bestimmt (L. Sachs, Angewandte Statistik. Springer, Berlin, 1984 1&ndash;168). Die jeweiligen Mittelwerte mit der dazugehörigen Standardabweichung wurden aus 10 unabhängigen Experimenten ermittelt.

(b) Ergebnis

**[0050]** Wie oben erwähnt, führte man die biologische Testung mit Tumorzellen durch und ermittelte die ED<sub>50</sub>-Konzentrationen für Tajixanthonhydrat. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle 5 zusammengefaßt. Tabelle 5

Tumor-Zelllinie	ED <sub>50</sub> -Konzentration (&mgr;g/ml)
L5178y-Lymphomzellen	9,7 ± 1,0
PC-12-Zellen	16,2 ± 1,4
HeLa S3-Zellen	14,2 ± 1,2

**[0051]** Es wird deutlich, daß Tajixanthonhydrat eine zytostatische Aktivität auf Tumorzellen ausübt. Die Hemmkonzentration liegt bei den verwandten L5178y-Lymphomzellen bei 9,7 ± 1,0; im etwa gleichen Bereich werden auch die PC-12-Zellen und weiterhin die HeLa-S3-Zellen gehemmt.

**[0052]** Diese Hemmwirkung zeigt, daß Tajixanthonhydrat neben der ausgeprägten Hemmung des Stoffwechsels der Mikroorganismen auch inhibierend auf das Wachstum von tierischen/menschlichen Tumorzellen wirkt. Dieser Effekt erhöht den beschriebenen Biofilm-hemmenden (anwendungsbezogenen) Wert der Substanz. Als Erklärung sei aufgeführt, daß häufig nach Besiedelung von Biofilmen mit Mikroorganismen auch ein weiterer Aufwuchs mit tierischen Zellen eintritt.

**[1]** Verwendung von Tajixanthonhydrat zur Behandlung von Tumorerkrankungen.

**[2]** Verwendung gemäß Anspruch 1, wobei Tajixanthonhydrat in Form einer Depotsubstanz oder als Vorläufer vorliegt.

**[3]** Verwendung gemäß einem der Ansprüche 1 oder 2 in Form einer Oberflächenbeschichtung, als Zusatz von Werkstoffen oder als Spüllösung.

**[4]** Verwendung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3 in Form von Tabletten, Dragees, Kapseln, Tropflösungen, Suppositorien, Injektions- oder Infusionszubereitungen zur peroralen, rektalen oder parenteralen Verwendung.

## Seite 13 --- ()