



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 601 04 288 T2** 2005.08.25

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 263 429 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **601 04 288.3**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/NL01/00222**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **01 917 979.5**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 01/068086**

(86) PCT-Anmeldetag: **19.03.2001**

(87) Veröffentlichungstag  
der PCT-Anmeldung: **20.09.2001**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **11.12.2002**

(97) Veröffentlichungstag  
der Patenterteilung beim EPA: **14.07.2004**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **25.08.2005**

(51) Int Cl.7: **A61K 31/22**

**A61P 31/12, A61P 31/18**

(30) Unionspriorität:

**00200991**      **17.03.2000**      **EP**

(73) Patentinhaber:

**Universitair Medisch Centrum Utrecht, Utrecht,  
NL; Universiteit Utrecht, Utrecht, NL**

(74) Vertreter:

**Lemcke, Brommer & Partner, Patentanwälte,  
76133 Karlsruhe**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,  
LI, LU, MC, NL, PT, SE, TR**

(72) Erfinder:

**NOTTET, Servatius, Johannes, NL-1095 DX  
Amsterdam, NL**

(54) Bezeichnung: **ANTIVIRALE THERAPIE**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

**Beschreibung**

**[0001]** Die Erfindung betrifft das Gebiet der antiviralen Mittel und genauer eine antivirale Therapie.

**[0002]** Eines der großen Paradoxa der Medizin ist, dass die einfachsten Organismen, die am schwersten Kontrollierbaren sind. Während große Fortschritte beim Kontrollieren von komplexeren Organismen, beispielsweise Bakterien, mit Hunderten von unterschiedlichen antibakteriellen, pharmazeutischen Zusammensetzungen oder Antibiotika gemacht wurden, gibt es sehr wenige pharmazeutischen Zusammensetzungen, vorgesehen oder angepasst für eine antivirale Therapie, die von nachgewiesener Wirksamkeit sind. Das größte Hindernis beim Entwickeln von antiviralen Mittel ist die Unfähigkeit gewesen, virale Replikationsmechanismen von Replikationsprozessen des Wirts zu unterscheiden.

**[0003]** Dennoch wurden während der letzten zwei Jahrzehnte Fortschritte bei der Entdeckung von Molekülen gemacht, die für die Virusreplikation notwendig sind, bei ihrer mechanistischen Charakterisierung und beim Entwickeln von antiviralen Mittel, um sie zu hemmen (siehe Übersichtsartikel Hirsch et al., In: Fields Virology, Kapitel 15, Lippincot-Raven Publishers, 1996). Gut bekannte antivirale Mittel sind zum Beispiel Amantadin und Rimantadin und andere anti-Influenza Mittel, Acyclovir, Gangcyclovir und verwandte Mittel, Foscarnet und andere anti-Herpesvirus Mittel, Ribavirin, und verschiedene antiretrovirale Mittel, wie unten diskutiert.

**[0004]** Fortschritt und Verstehen auf dem Gebiet der antiretroviralen Therapie ist in den vergangenen 3 Jahren dramatisch gewesen (siehe Übersichtsartikel Hammer und Yeni. AIDS, 12: S181–S188, 1998). Der Fortschritt wurde durch drei wichtige Verbesserungen angetrieben. Erstens hat ein wachsendes Wissen über Erkrankungspathogenese den Unterbau für gegenwärtige therapeutische Rationale bereit gestellt. Die proliferative Natur des viralen Replikationsprozesses (jeden Tag  $10^{10}$  Viruspartikel hergestellt und zerstört), der schnelle virale Umsatz (Halbwertszeit der Viruspartikel im Plasma 6 Std. oder weniger), und die Erkennung von zweiten und dritten Phasen des viralen Abbaus unter dem Einfluss einer starken antiretroviralen Therapie, die sich aus der Anwesenheit von längerlebigen Zellreservoirs ergeben, hat die gegenwärtigen Prinzipien der antiretroviralen Therapie geleitet. Die zweite Verbesserung war das sich erweiternde Aufgebot von therapeutischen Wahlmöglichkeiten, dargestellt durch die steigende Anzahl von Mittel, die Patienten und Klinikern zur Verfügung steht. Drittens hat die Verfügbarkeit von immer höher entwickelten Überwachungstechniken für Patienten, wie Bestimmungen der Virusbelastung, gleichzeitig die Werkzeuge zum Zergliedern der Erkrankungspathogenese von HIV und zum Überwachen der Wirkungen einer Behandlung in betroffenen Individuen geliefert. Zusammen genommen haben diese Entwicklungen zu dem allgemein akzeptierten Prinzip geführt, dass starke Kombinations-Behandlungsvorgaben die Behandlungen der Wahl sind (auch hoch-aktive antivirale Therapie oder HAART genannt), die so gestaltet sind, dass die HIV-RNA-Konzentration unter die Nachweisgrenze von gegenwärtig erhältlichen Tests getrieben und gehalten werden.

**[0005]** Es wurden jedoch eine Reihe von praktischen Einschränkungen dieses idealisierten Ansatzes verstärkt erkannt. Diese schließen ein: die Unbeständigkeit der anfänglichen virologischen Antwort, entsprechend dem Stadium der Erkrankung, insbesondere die hohe Versagensrate bei jenen mit fortgeschrittener HIV-Infektion; die Herausforderung der Patienten bei der Einhaltung von komplexen Behandlungsvorgaben; Versagen des Arzneimittels und die Gefahr der mehrfachen Arzneimittelresistenz; das Fehlen von vorhersagbar wirksamen Therapien, die eine Heilung bewirken; das Auftauchen von langfristigen Toxizitäten bei der Klasse von Proteaseinhibitoren der Verbindungen; und die sich verschärfende Trennung zwischen den Bevölkerungen der Welt, bezüglich der Kosten und dem Zugang zu wirksamen Mitteln.

**[0006]** In mehreren Ländern gibt es 11 Mittel, die zur Behandlung einer HIV-Infektion zugelassen sind, und es gibt die vernünftigen Erwartung, dass die Gesamtmenge in Kürze auf 15 ansteigen wird. Diese Mittel sind entweder Inhibitoren der reversen Transkriptase von HIV aus den Nukleosid-, Nicht-Nukleosid- oder Nukleotid-Unterklassen oder Mitglieder der Klasse der HIV-Protease-Inhibitoren. Obwohl die einfache Berechnung der Anzahl von Kombinationen aus zwei, drei und vier Arzneimitteln nahe legen würde, dass die Wahlmöglichkeiten an Behandlungsvorgaben für anfängliche und alternative Therapien riesengroß sind, sind sie in Wirklichkeit sehr viel begrenzter als Ergebnis von Kreuzresistenzen, Toxizitäten, Verträglichkeit, Arzneimittel- oder Nahrungsmittel-Wechselwirkungen und anderen praktischen Überlegungen. Obwohl es wahr ist, dass die Wahlmöglichkeiten für anfängliche, wirksame Kombinations-Behandlungsvorgaben steigen, wird man daher die eingeschränkten Wahlmöglichkeiten für langfristige virologische Unterdrückung erkennen, die gegenwärtig existieren, wenn man die Einschränkungen für nachfolgende Behandlungsvorgaben in Betracht zieht, die durch die anfängliche Wahl verliehen werden.

**[0007]** In Gebieten, in denen Zugang zu Arzneimitteln kein Problem darstellt, ist der gegenwärtig empfohlene

Standard für eine anfängliche Therapie ein wirksamer in vivo Protease-Inhibitor, kombiniert mit zwei Nukleosid-Analoga, wobei die erste Alternative ein nicht-Nukleosid-Inhibitor der reversen Transkriptase ist, kombiniert mit zwei Nukleosid-Analoga.

**[0008]** Das Auftauchen von Arzneimittelresistenz während der Behandlung und ihre Verbindung mit dem Versagen der Behandlung wurde jedoch bei nahezu all den antiretroviralen Mitteln beschrieben, die im Gebrauch oder in der Entwicklung sind. Daher könnte vom Testen auf Resistenzen vermutet werden, dass es die Wahl einer alternativen Behandlung im Rahmen eines Versagens der Behandlung logisch unterstützt und die Wahl der anfänglichen Behandlung unterstützt, wenn eine primäre Arzneimittelresistenz vermutet wird. Es gibt jedoch noch viele Fragen, die beantwortet werden müssen, bevor Testen auf Resistenz (entweder genotypisch oder phänotypisch) als routinemäßiges, klinisches Arbeitsmittel akzeptiert wird. In welchem Rahmen und zu welchem Ausmaß diese Technologie die Entscheidungsfindung verbessern wird, ist nicht klar und Arzneimittelresistenz ist nur einer von einer Reihe von Gründen für das Versagen einer Behandlung.

**[0009]** Ergebnisse des Testens auf Resistenz spiegeln am Besten den Selektionsdruck des gegenwärtigen Arzneimittels wieder, der bei einer neuen Behandlungsvorgabe schnell auftauchen kann.

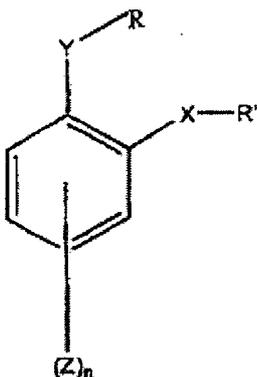
**[0010]** Außerdem kann man, wegen der Test-Sensitivität und den Wechselwirkungen zwischen Resistenzmutationen, nicht immer auf die phänotypische Empfänglichkeit eines viralen Stamms aus seinem Genotyp schließen. Kreuzresistenzen, insbesondere gegen Proteaseinhibitoren, können auch ein dynamischer Prozess sein, in dem Viren durch Mutationen, die durch eine vorherige Therapie selektioniert wurden, aktiviert werden, schneller Resistenz zu entwickeln, wenn sie einem neuen Mitglied der gleichen Arzneimittelklasse ausgesetzt werden.

**[0011]** Das Versagen einer bestimmten antiretroviralen Arzneimittel-Behandlungsvorgabe kann klinisch, immunologisch oder virologisch definiert werden. Zunehmend wird bei Individuen auf ihrer anfänglichen Arzneimittelkombination eine strikte Definition des Versagens angewandt, das heißt, nachweisbar vorhandene Viren nach vorheriger Unterdrückung unter die Nachweisgrenze des angewandten Tests. Mit dem Erscheinen von Plasma-HIV-RNA-Tests mit Nachweisgrenzen im ungefähren Bereich von 50 Kopien/ml, hat dies die Frage aufgeworfen, ob ein bestätigter Anstieg über diese Schwelle eine Änderung der Behandlung auslösen sollte, angesichts der immer noch begrenzten therapeutischen, medizinisch-technischen Ausstattung.

**[0012]** Die Fortschritte und Begrenzungen der gegenwärtig erhältlichen antiretroviralen Mittel machen klar, dass neue Mittel und Kombinationen dringend benötigt werden. Am unmittelbaren Horizont ist das Versprechen der weit verbreiteten Verfügbarkeit von vier neuen Mittel: Abacavir (ein Nukleosid-Analogen-Inhibitor der reversen Transkriptase), Efavirens (ein Nicht-Nukleosid-Inhibitor der reversen Transkriptase), Adefovir Dipivoxil (ein Nukleotid-Inhibitor der reversen Transkriptase) und Amprenavir (ein Protease-Inhibitor). Diese Mittel werden eine steigende Zahl von Wahlmöglichkeiten für Patienten und Kliniker mit sich bringen, aber werden sehr wahrscheinlich nur für antiretroviral naive oder minimal Arzneimittel-erfahrene Individuen von Nutzen sein. Ihre Rolle bei "Heilung bewirkenden" Behandlungsvorgaben wird gegenwärtig untersucht, aber die Möglichkeit der Kreuzresistenz mit gegenwärtig zugelassenen Mittel kann ihre Wirksamkeit unter diesen Umständen sehr wohl begrenzen.

**[0013]** Schließlich ist eine nächste Welle der Arzneimittelentwicklung nötig, die neue Klassen von antiviralen Mittel einschließt. Andere, mögliche, antivirale Mittel, die wirksam gegen virale Ziele sind, werden benötigt, um die therapeutischen Möglichkeiten der viralen Therapie zu verbreitern.

**[0014]** Die Erfindung stellt die Verwendung einer Verbindung mit der allgemeinen Formel



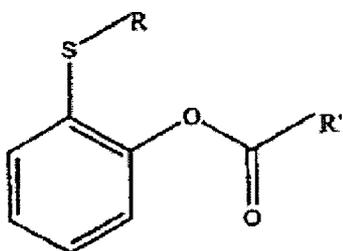
bereit,

dabei sind X und Y unabhängig O, S, SO, SO<sub>2</sub>, SO<sub>3</sub>, aber vorzugsweise O, S, SO<sub>2</sub>; dabei ist n 0, 1, 2, 3, 4, aber vorzugsweise 1 oder 2; darin sind R, R' unabhängig H mit der Bedingung, dass wenn R H ist, R' nicht H ist, eine C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>, verzweigte oder unverzweigte, substituierte oder unsubstituierte (vorzugsweise ist der Austauschstoff eines oder mehrere Halogene oder CF<sub>3</sub>), gesättigte oder (poly)ungesättigte, (Cyclo)alkyl, Alken, Alkyn, (Cyclo)aryl, Aryl(Cyclo)alkyl, (Cyclo)alkylaryl, Alkoxyaryl, Alkoxyalken, Alkoxyalkyn, Enyn, Dien, Diyn oder Alkoxyalkyl, vorzugsweise ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus H, CH<sub>3</sub>, CF<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>Cl, CH<sub>2</sub>Br, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, (CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CH<sub>3</sub>, (CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>3</sub>, (CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>CH<sub>3</sub>, (CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>CH<sub>3</sub>, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>, CH=C=CH<sub>2</sub>, (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>O(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>HC=CH(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>C≡C(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>C≡C(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>C≡C-HCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>C≡C-CH<sub>3</sub> and CH<sub>2</sub>C≡CH und Isomere oder Homologe davon, und dabei ist R' R, vorzugsweise ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus H, CH<sub>3</sub>; und wobei R oder R' Ether-Verbindungen enthalten oder Carbonyl- oder Thiocarbonyl-Funktionen an die Ringstruktur angehängt haben kann, wie Ring-(C=O/S)-R/R'

und Z ist unabhängig R, R', XR, XR', YR oder YR'

oder ein funktionelles Äquivalent davon, zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung für die Behandlung einer Vireninfektion.

**[0015]** Die vorliegende Erfindung stellt auch die Verwendung von mindestens einer Verbindung oder Mischung von Verbindungen bereit, der allgemeinen Formel



oder eines funktionellen Äquivalents oder eines pharmazeutisch akzeptablen Salzes oder Hydrats davon, für die Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Behandlung einer Virusinfektion.

**[0016]** Ersetzungen oder Substitutionen der allgemeinen Formel umfassen zum Beispiel das Ersetzen von S durch O, Se oder Te, und/oder zusätzliches Substituieren des Rings mit einer oder mehreren Seitengruppen wie R oder R'. Funktionell äquivalente Verbindungen, bezüglich der antiviralen Aktivität (gezeigt, wie getestet) werden zum Beispiel unter jenen der [Fig. 9](#) gefunden. Bevorzugt werden die Kombinationen, wie in [Fig. 11](#) dargestellt, wobei Z = H, Y = S, E = CH<sub>2</sub>CEC(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CH<sub>3</sub>, X = O, B = -, D = -, und A entweder CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>CH<sub>3</sub>, oder CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>CH<sub>3</sub> ist, und die Buchstabenkombinationen worin Z = H, Y = S, E = C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>, X = O, A = C, B = O, und D = CH<sub>3</sub> und die Kombinationen worin Z = H, Y = S, E = C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>, X = -, A = C, B = O, and D = CH<sub>3</sub> und die Kombinationen worin Z = SC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>, Y = -, E = -, X = O, A = C, B = O, und D = CH<sub>3</sub> und die Kombinationen worin Z = SC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>, Y = -, E = -, X = -, A = C, B = O, und D = CH<sub>3</sub> und die Kombinationen worin Y = -, E = -, Z = SCH<sub>2</sub>CEC(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CH<sub>3</sub>, X = O, B = -, D = -, und A entweder CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>CH<sub>3</sub>, oder CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>CH<sub>3</sub> ist.

**[0017]** Außerdem zeigen die Ergebnisse der Verbindungen von [Fig. 9](#), gezeigt in [Fig. 10](#), einen Benzolring, der eine Ester-, Ether- oder Hydroxylgruppe umfasst, und eine lipophile Seitenkette umfasst, die an der antiviralen Aktivität beteiligt ist. Weiterhin ist LM-3155 ungefähr 100-fach weniger wirksam beim Hemmen der viralen Replikation, was zeigt, dass die Größe von Y-R in der allgemeinen Formel oder der funktionell äquivalenten Verbindung, wie durch die Erfindung bereit gestellt, im Allgemeinen lang sein sollte.

**[0018]** Durch Verringern der Größe von Y-R in der allgemeinen Formel wird die Verbindung stärker hydrophil. Daher sollte Y-R lang sein, um die lipophilen Eigenschaften der Verbindung und damit die antivirale Aktivität zu erhöhen. Es ist eine Alternative die Größe von Y-R kurz zu halten und lange Gruppen an die Z-Stelle in der allgemeinen Formel der Verbindung einzufügen. Obwohl die antivirale Aktivität von LM-3142 ungefähr 10-fach geringer ist, legt dieses Ergebnis außerdem nahe, dass die Estergruppe nicht absolut notwendig für dessen antivirale Aktivität ist. Der Grund dafür, dass LM-3142 eine geringere antivirale Aktivität aufweist, ist wahrscheinlich auf dessen verringerte Lipophilie zurückzuführen. Das anderweitige Erhöhen der Lipophilie wird dessen antivirale Aktivität wieder erhöhen. Außerdem hydrolysiert die Verbindung wegen der Acetylcyster von APHS schnell und die Lipophilie ist daher verringert. Daher werden Alternativen bereitgestellt, worin der Acetylcyster durch weniger leicht hydrolysierende Seitengruppen ersetzt wird, wie durch einen Ethylether, Propylether, Butylether, Pentylether, Hexylether, oder Heptylether. Die Halbwertszeiten dieser funktionell äquivalenten

Verbindungen ist viel länger und daher wird eine bessere antivirale Aktivität bereitgestellt.

**[0019]** Eine besonders nützliche Verbindung wird in Tabelle 3 identifiziert, die hiermit bereitgestellt wird, insbesondere eine Verbindung, die identifiziert wird als c2, c3 c5 oder c7 oder ein Derivat davon. Seitengruppe D (siehe [Fig. 9](#)) wird bevorzugt mit einer Elektronen-ziehenden Gruppe substituiert, verwendbar sind Gruppen wie  $\text{CF}_3$ ,  $\text{NO}_2$  oder CN.

**[0020]** Verbindungen der allgemeinen Formel sind beispielsweise bekannt aus Arnoldi et al., J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1 (1993), 12: 1359–1366; aus Poirier et al., Sulfur Lett. (1998) 10: 167–173; und aus Ohtsuka et al., Chem. Pharm. Bull. (1983) 31: 443–453. Außerdem ist aus Kalgutar et al., Science 280: 1268–1270, (1998) und WO 98/29382 bekannt, dass verschiedene Verbindungen der allgemeinen Formel Cyclooxygenase-2 (COX-2) kovalent inaktivieren und selektive Inhibitoren der Prostaglandin-Endoperoxidase-2 sind, und dass eine pharmazeutische Zusammensetzung, die eine solche Verbindung enthält, nützlich zum Bereitstellen von Schmerzlinderung sein kann, wie bei der Prophylaxe oder der therapeutischen Behandlung von Entzündungsantworten, wie Ödemen, Fieber, Schmerzempfindlichkeit, neuromuskulärem Schmerz, Kopfschmerz, Krebschmerz oder arthritischen Schmerz.

**[0021]** Überraschenderweise wird jetzt herausgefunden, dass eine pharmazeutischen Zusammensetzung, welche die Verbindung enthält, bei antiviraler Therapie verwendbar ist. Ohne an diese Theorie gebunden sein zu wollen, wird hierbei angenommen, dass eine Verbindung der allgemeinen Formel oder ein funktionelles Äquivalent davon Aktivitäten von Transkriptionsfaktoren wie AP-1, STAT und NF $\kappa$ B entgegenwirkt, vermutlich mit der Wirkung, dass virale Funktionen wie die Virustranskription und/oder die Expression viraler Gene funktionell inhibiert werden, wie beispielsweise durch Testen der Wirkung einer solchen Verbindung auf virale Promoteraktivität (siehe z. B. [Fig. 1](#)) nachgewiesen werden kann. Als Alternative wird die Wirkung auf die virale Proteinexpression durch Testen der viralen Proteinproduktion in Zellkultur (siehe z. B. [Fig. 2](#), [Fig. 4a](#) und [Fig. 4b](#)) nachgewiesen.

**[0022]** Eine bevorzugte Ausführungsform stellt die erfindungsgemäße Verwendung einer Verbindung der allgemeinen Formel, wie oben, oder eines pharmazeutisch akzeptablen Salzes oder Hydrats davon bereit, wobei R H,  $\text{CF}_3$  oder ein  $\text{C}_1$ - $\text{C}_{10}$  ist (aber wegen dessen erhöhter Lipophilie bevorzugt ein  $\text{C}_4$ - $\text{C}_{10}$ ) verzweigte oder unverzweigte, substituierte oder unsubstituierte (vorzugsweise ist der Austauschstoff ein Halogen), gesättigte oder (poly)ungesättigte, (Cyclo)alkyl, Alken, Alkyn, (Cyclo)aryl, Aryl(Cyclo)alkyl, (Cyclo)alkylaryl, Alkoxyaryl, Alkoxyalken, Alkoxyalkyn, Enyn, Dien, Diyn oder Alkoxyalkyl, vorzugsweise ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus H,  $\text{CH}_3$ ,  $\text{CF}_3$ ,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ,  $(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$ ,  $(\text{CH}_2)_3\text{CH}_3$ ,  $(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$ ,  $(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$ ,  $(\text{CH}_2)_6\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ,  $\text{CH}(\text{CH}_3)_3$ ,  $\text{CH}=\text{C}=\text{CH}_2$ ,  $(\text{CH}_2)_2\text{O}(\text{CH}_2)_3\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_2\text{HC}=\text{CH}(\text{CH}_2)_3\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{C}(\text{CH}_2)_3\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{C}(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{C}-\text{HCH}_2\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{C}-\text{CH}_3$  und Isomere oder Homologe davon, und dabei ist R' R, vorzugsweise ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus H,  $\text{CH}_3$ ,  $\text{CF}_3$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}$  und  $\text{CH}_2\text{Br}$ .

**[0023]** Die vorliegende Erfindung stellt außerdem eine pharmazeutische Zusammensetzung bereit, die zur Behandlung einer viralen Infektion vorgesehen oder angepasst ist (hierin auch antivirales Mittel genannt), umfassend mindestens eine Verbindung oder eine Mischung von Verbindungen gemäß der allgemeinen Formel und einen pharmazeutisch akzeptablen Trägerstoff oder Verdünnungsmittel. Um eine Verbindung gemäß der allgemeinen Formel oder ein pharmazeutisch akzeptables Salz oder Hydrat davon bei einer Therapie zu verwenden, wird sie normalerweise zu einer pharmazeutischen Zusammensetzung formuliert, entsprechend pharmazeutischer Standardverfahrensweise. Diese Erfindung betrifft daher auch eine pharmazeutische Zusammensetzung für die Behandlung einer Virusinfektion, umfassend eine wirksame Menge einer Verbindung gemäß der allgemeinen Formel, oder ein pharmazeutisch akzeptables Salz oder Hydrat davon, und einen pharmazeutisch akzeptablen Trägerstoff oder Verdünnungsmittel. Eine pharmazeutische Zusammensetzung, wie sie durch die Erfindung bereitgestellt wird, ermöglicht eine Behandlung in einem geeignet großem therapeutischem Fenster, Toxizität für Zellen, wie beispielsweise ermittelt mit dem Grad der Zell-Lebensfähigkeit, wie in [Fig. 3](#) und [Fig. 5](#) gezeigt, wird nicht oder nur in Bereichen nachgewiesen, in den signifikante antivirale Aktivität gefunden wird (siehe [Fig. 2](#), [Fig. 4a](#) und [Fig. 4b](#)).

**[0024]** In einer bevorzugten Ausführungsform stellt die Erfindung eine erfindungsgemäße Verwendung bereit, wobei die Virusinfektion durch einen Virus bewirkt wird, der zumindest teilweise resistent ist gegen eine Behandlung mit einem anderen antiviralen Mittel, wie beispielsweise in der detaillierten Beschreibung gezeigt, worin die Verwendung bei einer Infektion bereitgestellt wird, die durch ein Retrovirus bewirkt wird, das zumindest teilweise resistent ist gegen eine Behandlung mit einem anderen antiviralen Mittel, wie einem Inhibitor für die reverse Transkriptase oder einem Proteaseinhibitor.

**[0025]** In einer bevorzugten Ausführungsform stellt die Erfindung eine erfindungsgemäße Verwendung bereit, wobei die Virusinfektion eine Retrovirusinfektion umfasst. Solch eine Retrovirusinfektion kann zum Beispiel eine Leukämievirusinfektion umfassen, wie durch Rinderleukämievirus oder menschliches T-Zell-Leukämievirus verursacht. Andere Retrovirusinfektionen, die im Stand der Technik bekannt sind, sind beispielsweise Schaf-Lentivirusinfektionen oder Spumaretrovirusinfektionen. Solch eine Retrovirusinfektion kann auch eine Infektion mit einem rekombinanten Virus umfassen, der beispielsweise zur Verwendung in Gentherapie konstruiert wird. Vorzugsweise stellt die Erfindung eine erfindungsgemäße Verwendung bereit, wobei die Retrovirusinfektion durch ein Immunschwächevirus, wie menschliches oder Affen-Immunschwächevirus (HIV oder SIV). Als ein Beispiel wird HIV-1-Infektion von T-Zellen und Makrophagen durch CD4 und die kürzlich entdeckten Chemokinrezeptoren wie CCR-5, CXCR-4, CCR2b und CCR-3 vermittelt. Nach dem Binden von HIV-1 gp120 an diese Rezeptoren findet eine Fusion von viralen und zellulären Membranen statt, die zur Freisetzung des viralen Präintegrationskomplexes in das Cytoplasma führt. Nachfolgend vermittelt die Matrixdomäne des HIV-1 gag Proteins die Verlagerung des HIV-1 Präintegrationskomplexes in den Nukleus. Bildung von HIV-1 DNA findet bereits innerhalb des Präintegrationskomplexes statt und kann sogar innerhalb des intakten Viruspartikels gebildet werden. Vollständige HIV-1 DNA besteht in mehreren Formen, der entscheidende Schritt bei der Infektion ist jedoch die Integration von viraler DNA in die chromosomale DNA des Wirts. In diesem Stadium des viralen Lebenszyklus wird die Zelle lebenslang infiziert. Gegenwärtige anti-HIV-Verbindungen sind gegen verschiedene Stadien im Lebenszyklus von HIV-1 gerichtet. Zum Beispiel sind die Nukleosid- und Nicht-Nukleosidanaloga gegen reverse Transkriptase gerichtet, dem Enzym, das die virale RNA in DNA umwandelt. Auf diese Weise sind Viruspartikel, die von HIV-infizierten Zellen freigesetzt werden, nicht für andere Zielzellen infektiös, sofern nicht Mutationen in der reversen Transkriptase auftreten, die Resistenz gegen diese Klasse von anti-HIV-Arzneimitteln verleihen.

**[0026]** Eine andere Klasse von anti-HIV-Verbindungen, die Teil aller neuen dreifach anti-HIV-Therapie-Behandlungsvorgaben ist, sind die Proteaseinhibitoren. Diese Verbindungen verhindern wahrscheinlich die Bildung von vollständigen Viruspartikeln durch HIV-infizierte Zellen und sind daher dafür vorgesehen, die Verbreitung von HIV-1 auf neue Zielzellen zu verhindern. Hierin wird beispielsweise in [Fig. 2](#), [Fig. 4a](#) und [Fig. 4b](#) gezeigt, dass eine pharmazeutische Zusammensetzung, die eine Verbindung gemäß der allgemeinen, durch die Erfindung bereitgestellten Formel enthält, ebenfalls anti-HIV-Aktivität bereitstellt, was eine neue antivirale Therapie ermöglicht, bereitgestellt durch die Erfindung.

**[0027]** Die Erfindung stellt außerdem eine erfindungsgemäße Verwendung bereit, wobei die Behandlung zusätzlich eine Behandlung mit einer anderen pharmazeutischen Zusammensetzung umfasst. Beispielsweise wird nun eine kombinatorische Therapie zur Behandlung von Virusinfektionen bereitgestellt, wie das oft der Fall ist, wenn HIV-infizierte Individuen behandelt werden, wobei die andere pharmazeutische Zusammensetzung mindestens ein antivirales Mittel enthält, wie beispielsweise Amantadin und Rimantadin oder ein anderes anti-Influenza-Mittel, Acyclovir, Gangcyclovir oder ein verwandtes Mittel, Foscarnet oder ein anderes anti-Herpesvirus-Mittel, Ribavirin oder ein anderes antiretrovirales Mittel, oder ein antivirales Mittel, wie durch die Erfindung bereitgestellt. Natürlich werden auch Kombinationstherapien bereitgestellt, die ein erfindungsgemäßes antivirales Mittel einschließen und zusätzlich mehr als ein zusätzliches antivirales Mittel umfassen, wie Kombinationen des antiviralen Mittels, das durch die Erfindung bereitgestellt wird, mit Nukleosidanaloga-Inhibitoren der reversen Transkriptase und/oder mit Nicht-Nukleosidanaloga-Inhibitoren der reversen Transkriptase und/oder mit Nukleotidanaloga-Inhibitoren der reversen Transkriptase und/oder mit Proteaseinhibitoren, auch weil ein antivirales Mittel, wie durch die Erfindung bereitgestellt, besonders wirksam gegen anderenfalls Arzneimittel-resistente Viren ist.

**[0028]** Zusätzlich stellt die Erfindung eine erfindungsgemäße Verwendung bereit, wobei die Behandlung zusätzlich die Behandlung von Entzündungsantworten umfasst, wie Ödemen, Fieber, Schmerzempfindlichkeit, neuromuskulärem Schmerz, Kopfschmerz, Krebs- oder Arthritissschmerz, Virusinfektion-bedingte oder -verbundene Demenzen, oder andere körperliche Gebrechen.

**[0029]** Außerdem stellt die Erfindung eine pharmazeutische Zusammensetzung bereit, die für eine antivirale Therapie vorgesehen und angepasst ist, welche eine Verbindung der allgemeinen Formel oder ein funktionelles Äquivalent davon umfasst. Vorzugsweise umfasst die pharmazeutische Zusammensetzung, die für eine antivirale Therapie vorgesehen oder angepasst ist, eine Verbindung der allgemeinen Formel, worin R und R' wie oben definiert sind. Vorzugsweise enthält ein antivirales Mittel, wie durch die Erfindung bereitgestellt, 2-Acetoxythioanisol, 2-(Trifluor-methylacetoxy)-thioanisol, 2-(□-Chloracetoxy)-thioanisol, 2-(□-bromacetoxy)-thioanisol, 2-Acetoxyphenylbenzylsulfid, 2-Acetoxyphenyl-2-Phenylethylsulfid, 2-Acetoxyphenylethylsulfid, 2-Acetoxyphenylpropylsulfid, 2-Acetoxyphenyl-Butylsulfid, 2-Acetoxyphenylpentylsulfid, 2-Acetoxyphenylhexylsulfid, 2-Acetoxyphenylheptyl-sulfid, 2-Acetoxyphenyl-2-Butoxyethylsulfid, Acetoxyphenyl-2-trans-heptenyl-sulfid,

2-Acetoxyphenylhept-2-ynylsulfid, 2-Acetoxyphenylbut-2-ynylsulfid, 2-Acetoxyphenylprop-2-ynylsulfid, oder o-(Acetoxyphenyl)-hept-2-ynylsulfid (APHS), oder ein pharmazeutisch akzeptables Salz oder Hydrat davon. Geeignete, pharmazeutisch akzeptable Salze sind dem Fachmann gut bekannt und schließen basische Salze von anorganischen und organischen Säuren ein, wie Salzsäure, Bromwasserstoffsäure, Sulfonsäure, Phosphorsäure, Methansulfonsäure, Ethansulfonsäure, Essigsäure, Hydroxybernsteinsäure, Weinsäure, Maleinsäure, Benzoesäure, Salicylsäure, Phenylessigsäure und Mandelsäure. Zusätzlich können pharmazeutisch akzeptable Salze einer Verbindung gemäß der allgemeinen Formel auch mit einem pharmazeutisch akzeptablen Kation gebildet werden, zum Beispiel wenn eine Substituentengruppe eine Carboxykomponente umfasst. Geeignete, pharmazeutisch akzeptable Kationen sind im Stand der Technik gut bekannt und schließen alkalische, Erdalkali-Ammonium- und quartäre Ammoniumkationen ein.

**[0030]** Zusätzlich stellt die Erfindung eine pharmazeutische Zusammensetzung bereit, die für eine antivirale Therapie vorgesehen und angepasst ist, welche eine Verbindung der allgemeinen Formel oder ein funktionelles Äquivalent davon umfasst, wobei die Verbindung mindestens kombiniert, vorzugsweise gemischt ist, mit einer pharmazeutischen Zusammensetzung, die mindestens ein anderes, antivirales Mittel enthält, wie beispielsweise Amantadin und Rimantadin oder ein anderes anti-Influenza-Mittel, Acyclovir, Gangcyclovir oder ein verwandtes Mittel, Foscarnet oder ein anderes anti-Herpesvirus-Mittel, Ribavirin oder ein antiretrovirales Mittel, oder ein antivirales Mittel, wie durch die Erfindung bereitgestellt. Solch eine Zusammensetzung, wie durch die Erfindung bereitgestellt, kann vorteilhafterweise bei kombinatorischer, antiviraler Therapie verwendet werden.

**[0031]** Die Erfindung stellt auch ein Verfahren zum Behandeln einer Virusinfektion eines Tieres bereit, umfassend dem Tier ein erfindungsgemäßes, antivirales Mittel zu verabreichen oder das Tier einer Behandlung mit einem erfindungsgemäßen, antiviralen Mittel auszusetzen. Ein antivirales Mittel, das eine Verbindung gemäß der allgemeinen Formel, ein pharmazeutisch akzeptables Salz davon enthält und eine pharmazeutische Zusammensetzung, die solches beinhaltet, kann in geeigneter Weise durch jeden der Wege verabreicht werden, die herkömmlicherweise zur Verabreichung von Arzneimitteln verwendet werden, z. B. oral, oberflächlich, parenteral, oder durch Inhalation. Eine Verbindung gemäß der allgemeinen Formel kann in herkömmlichen Dosierungsformen verabreicht werden, die durch Kombinieren einer Verbindung gemäß der allgemeinen Formel mit einem pharmazeutischen Standard-Trägerstoff mit herkömmlichen Verfahren hergestellt wurde.

**[0032]** Ein antivirales Mittel, das eine Verbindung gemäß der allgemeinen Formel umfasst, kann parenteral verabreicht werden, d. h. durch intravenöse, intramuskuläre, subkutane, intranasale, intrarektale, intravaginale oder intraperitoneale Verabreichung. Subkutane oder intramuskuläre Formen der parenteralen Verabreichung werden im Allgemeinen bevorzugt. Angemessene Dosierungsformen und Dosierungsvorgaben für eine solche Verabreichung können durch herkömmliche Techniken hergestellt werden oder durch Dosisbestimmungsstudien erlangt werden. Verbindungen können auch durch Inhalation verabreicht werden, z. B. intranasale oder orale Inhalationsverabreichung. Angemessene Dosierungsformen und Behandlungsvorgaben für eine solche Verabreichung, wie Aerosolformulierung oder Dosieraerosol können durch herkömmliche Techniken, die dem Durchschnittsfachmann bekannt sind, hergestellt werden.

**[0033]** Ein antivirales Mittel der vorliegenden Erfindung kann auch in Kombination mit einer bekannten, zweiten, therapeutisch aktiven Verbindung oder Zusammensetzung verabreicht werden.

**[0034]** Diese Verfahren können Mischen, Granulieren und Zusammenpressen oder Auflösen der Bestandteile einschließen, wie für die gewünschte Präparation angemessen. Es ist klar erkennbar, dass die Form und das Wesen des pharmazeutisch akzeptablen Trägerstoffes oder Verdünnungsmittels diktiert wird durch die Menge des aktiven Bestandteils mit dem es kombiniert werden soll, dem Weg der Verabreichung und anderen, gut bekannten Variablen. Der (die) Trägerstoff(e) müssen "akzeptabel" sein, im Sinne von verträglich mit den anderen Bestandteilen der Formulierung und nicht nachteilig für deren Empfänger.

**[0035]** Insbesondere stellt die Erfindung ein Verfahren zum Behandeln einer Virusinfektion eines Tieres bereit, umfassend dem Tier ein erfindungsgemäßes antivirales Mittel zu verabreichen oder das Tier einer Behandlung mit dem Mittel auszusetzen, wobei die Virusinfektion eine Retrovirusinfektion ist. Insbesondere stellt die Erfindung ein Verfahren zum Behandeln einer Virusinfektion bereit, wobei das Tier menschlich ist. Im Fall von Virusinfektionen wird es als besonders vorteilhaft betrachtet, die Behandlung einer Virusinfektion mit einem erfindungsgemäßen, antiviralen Mittel zu kombinieren mit einer Behandlung mit mindestens einem anderen, antiviralen Mittel, wodurch die mögliche Anzahl von Kombinationen stark vergrößert wird, die verwendet werden können, um zum Beispiel Patienten mit Retrovirusinfektionen wie AIDS oder AIDS-bezogene Infektionen zu behandeln, wodurch die therapeutischen Möglichkeiten für kombinatorische oder hoch-aktive antivirale Therapie (HAART) vergrößert werden, besonders unter jenen Umständen, wobei Virusulturen auftauchen

oder schon im Patienten vorhanden sein können, die anderenfalls zumindest teilweise gegen andere Virusarzneimittel, wie einem Inhibitor der reversen Transkriptase oder Proteaseinhibitor, resistent sind.

## Material und Methoden

### 1. Materialien und Methoden, die Zellen betreffen

#### 1.a. Isolierung und Kultur von mononukleären Zellen aus peripherem Blut

**[0036]** Fraktionen von mononukleären Zellen aus peripherem Blut (PBMC) werden aus heparinisierem Blut von HIV-1-, HIV-2- und Hepatitis B-seronegativen Spendern (Blutbank, Utrecht, Die Niederlande) durch Ficoll-Isopaque Gradientenabtrennung isoliert. Zellen werden zweimal gewaschen, mit 4 µg/ml Phytohemagglutinin (PHA) stimuliert, und in RPMI-1640 Medium, ergänzt mit 5 mM Hepes, 19 mM Natriumbicarbonat, 10 µg/ml Gentamicin, und 10% Hitze-inaktiviertem, fötalen Kälberserum in einer Konzentration von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml kultiviert.

#### 1.b. Isolierung und Kultur von Makrophagen, die von Monocyten abgeleitet sind (MDM)

**[0037]** PBMC werden aus heparinisierem Blut von HIV-1-, HIV-2-, und Hepatitis B-seronegativen Spendern isoliert und auf Ficoll-Hypaque Dichtegradienten gewonnen. Zellen werden zweimal gewaschen und Monocyten durch Elutriation mittels Gegenstromzentrifugation aufgereinigt. Zellen sind zu mehr als 98 Monocyten, nach Kriterien der Zellmorphologie auf May-Grünwald-Giemsa-gefärbten Zellabstrichen und nach unspezifischer Esterase-Färbung unter Verwendung von alpha-Naphtylacetat (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) als Substrat. Monocyten werden in Suspension in einer Konzentration von  $2 \times 10^6$  Zellen/ml in Teflonflaschen (Nalgene, Rochester, NY) kultiviert, für 7 Tage in Iscove's modifiziertem Dulbecco's Medium (IMDM) mit 10% Hitze-inaktiviertem, menschlichem AB Serum, das negativ für anti-HIV Antikörper ist, 10 mg/ml Gentamicin, and 10 mg/ml Ciprofloxacin (Sigma).

#### 1.c. Isolierung von Lymphocyten aus peripheren Blut

**[0038]** PBMC Fraktionen werden aus heparinisierem Blut von HIV-1-, HIV-2- und Hepatitis B-seronegativen Spendern (Blutbank, Utrecht, Die Niederlande) durch Ficoll-Isopaque Gradiententrennung isoliert. Nachdem die Zellen zweimal gewaschen werden, erlaubt man den Monocyten sich an Fibronectin-beschichtete Flaschen anzuheften, bevor die PBL-Fraktion abgeerntet wird. Die gesammelten PBL-Fraktionen sind von > 85%iger Reinheit, wie durch May-Grünwald-Giemsa-Färbung bestimmt. Isolierte PBL werden für 3 Tage zur Teilung mit 4 µg/ml Phytohemagglutinin (PHA; Sigma) stimuliert. PBL werden in RPMI-1640 (Life Technologies Ltd.) Medium, ergänzt mit 10% Hitze-inaktivierten, fötalen Kälberserum (Life Technologies Ltd.) und 10 mg/ml Gentamicin, (Life Technologies Ltd.) kultiviert. Nach PHA-Stimulation werden die Zellen bis zur Verwendung in Medium kultiviert, das 10 U/ml menschliches, rekombinantes IL-2 (Boehringer) enthält.

**[0039]** Die Lebensfähigkeit ist > 95% zum Zeitpunkt des Beginns des Experiments, wie durch Trypan-Blau Ausschluss bestimmt.

#### 1.d. Bestimmung der Zell-Lebensfähigkeit unter Verwendung des MTT-Tests

**[0040]** Die Zell-Lebensfähigkeit wird durch den MTT-Test bewertet.

**[0041]** Kurz gesagt werden Zellen mit MTT 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (Sigma) für 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Während dieser Zeit setzen lebensfähige Zellen MTT zu Wasser um, wobei unlösliche Formazanfarbstoffe gebildet werden. Danach werden Kristalle mit einer Isopropanol-enthaltenden Lösung löslich gemacht.

**[0042]** Die OD des Überstands wird bei 550 nm gemessen.

#### 1.e. Bestimmung der Zell-Lebensfähigkeit unter Verwendung des WST-1-Tests

**[0043]** Die Zell-Lebensfähigkeit wird durch den WST-1-Test bewertet. Zellen werden mit dem Tetrazoliumsalz WST-1 (4-[3-(4-Iodphenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzol-disulfonat) für 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Während dieser Zeit setzen lebensfähige Zellen WST-1 zu wasserlöslichen Formazanfarbstoffen um. Die OD des Überstands wird bei 550 nm gemessen.

2. Materialien und Methoden, die die Virusinfektion betreffen

2.a. Herstellung von viralen Stammlösungen

**[0044]** Der HIV-1 Stamm Ba-L wird bis zu einem hohen Titer in MDM wachsen gelassen. Die 50% Gewebekultur-Infektionsdosis (TCID<sub>50</sub>) der Virusstammlösung wird durch Endpunktverdünnung mit seriellen vierfach-Verdünnungen in einer 96-well Microtiterplatte auf MDM bestimmt. Der HIV-1 Stamm AT wird bis zu einem hohen Titer in PHA-stimulierten PBMC wachsen gelassen. Die TCID<sub>50</sub> der Virusstammlösung wird durch Endpunktverdünnung mit seriellen vierfach-Verdünnungen in einer 96-well Microtiterplatte auf PBMC bestimmt.

2.b. HIV-1 Infektion von Zellen (wie durch ELISA bestimmt)

**[0045]** MDM und PBMC wurden mit HIV bei einer Infektions-Multiplizität von 0,02, und 0,006 beziehungsweise 0,001 infiziert.

**[0046]** Nach zwei Stunden werden die Zellen gewaschen, um nicht gebundenes Virus zu entfernen, und für 4 bis 7 Tage in unterschiedlichen Konzentrationen des untersuchten Arzneimittels kultiviert. Am Tag 4, 5 und 7 werden 0,01 ml Überstand von der Kultur entfernt und das Virus im Überstand wird in einer Endkonzentration von 0,05% Empigen (Calbiochem-Novabiochem Co., La Jolla, CA) inaktiviert. Das Vorhandensein von HIV-1 im inaktivierten Überstand wird durch Überprüfen des p24 core-Antigens überwacht, unter Verwendung des Enzym-gekoppelten Immunosorbenttest-(ELISA)Systems von John Moore.

3. Nachweistests zum Testen der Arzneimittelwirkung im HIV-Lebenszyklus

3.a. HIV-1 Infektion von Zellen, die mit unterschiedlichen Chemokinrezeptoren transfiziert sind, um die Wirkung auf den Eintritt von HIV-1 in die Zelle zu studieren

**[0047]** Die Zelllinie HOS-CD4 und die Zelllinien, die von HOS-CD4 abgeleitet sind, nämlich HOS-CD4-CCR2b, HOS-CD4-CCR3, HOS-CD4-CCR5 und HOS-CD4-CXCR4 sind durch das AIDS Research and Reference Reagent Programm erhältlich. Diese Zelllinien exprimieren die Chemokinrezeptoren, die von den unterschiedlichen HIV-Stämmen verwendet werden, und die verwendet werden für eine Untersuchung der Wirkung von Verbindungen mit der oben identifizierten allgemeinen Formel und verwandten Verbindungen, auf ihre antivirale Wirkung bei unterschiedlichen HIV-Stämmen und auf Modulierung dieser Chemokinrezeptoren. Kurz gesagt, werden Zellen mit einem geeigneten Virusstamm infiziert und die antivirale Wirkung der Verbindungen wird durch HIV p24 Antigen ELISA gemessen.

**[0048]** Außerdem werden die Zellen mit einem monoklonalen Antikörper inkubiert, der gegen den studierten Chemokinrezeptor gerichtet ist. Dann werden die Zellen zweimal mit Phosphat-gepufferter Salzlösung gewaschen und in einem FACStar Durchflußzytometer (Beckton Dickinson und Co., Mountainview, CA) analysiert.

3.b. RNA-PCR Nachweis der HIV-1 Infektion, um die Wirkung auf der transkriptionalen Ebene zu studieren

**[0049]** Die HIV-infizierten Zellen werden in 1 ml TRIzol (Life Technologies Gaithersburg, MD) lysiert und RNA wird gemäß der Anleitung des Herstellers isoliert. Gesamt-RNA wird in mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandeltem Wasser gelöst und 1 mg RNA wird für die Synthese von komplementärer DNA verwendet. Die RNA wird vorher für 5 Minuten auf 70°C erhitzt, auf Eis abgekühlt und zu einer Mischung zugefügt, die 1 × reverse Transkriptase(RT)-Puffer (Promega, Madison, WI), 200 U reverser Transkriptase, 0,1 M Dithiothreitol (DTT, Gibco, Grand Island, NY), 2,5 mM Desoxynukleotidtriphosphat (dNTP's, Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN), 80 U Zufallshexamer Oligonukleotide (Boehringer Mannheim) und 10 U RNAsin (Promega) enthält. Die vollständige Mischung wird nun für 60 Minuten bei 37°C inkubiert und dann für 5 Minuten bei 90°C erhitzt. Das Endvolumen der Reaktion wird durch Zugabe von destilliertem Wasser 1 : 8 verdünnt. Vermehrung der cDNA wird unter Verwendung eines Primers erzielt, der am 5'-Endnukleotid biotinyliert ist, um späteres Einfangen unter Verwendung von Streptavidin zu fördern. Zur PCR-Reaktionsmischung werden die folgenden Bestandteile zugefügt: 0,25 mM dNTP mix (Boehringer Mannheim), 1 × PCR Puffer (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>; Promega), 0,2 mM des biotinylierten HIV-1 tat/rev Sense-Primers 5'-GGC TTA GGC ATC TCC TAT GGC-3' oder des GAPDH Sense-Primers 5'-CCA TGG AGA AGG CTG GGG-3' und des HIV-1 tat/rev Antisense-Primers 5'-TGT CGG GTC CCC TCG TTG CTG G-3' oder des GAPDH Antisense-Primers 5'-CAA AGT TGT CAT GGA TGA CC-3', 5 ml cDNA und 1 U Taq Polymerase (Promega).

**[0050]** Denaturierungs-, Anlagerungs-, und Verlängerungstemperaturen für die PCR sind 94°C, 60°C, und

72°C für jeweils 1, 1, und 2 Min, unter Verwendung eines DNA Thermalcyclers (Perkin-Elmer, Norwalk, CT). Negative Kontrollen werden in jedem Test eingeschlossen, um zu bestätigen, dass keines der Reagens mit cDNA oder vorherigen PCR-Produkten kontaminiert war. PCR wird auch an RNA-Proben durchgeführt, um Kontamination mit genomischer DNA auszuschließen.

**[0051]** Um einzelne Banden zu bestätigen, werden Produkt-positive Reaktionen 40 Vermehrungszyklen und Elektrophorese ausgesetzt, gefolgt von Ethidiumbromid-Färbung. Dann wird für eine Halb-Quantifizierung jedes Primer-Paar mit unterschiedlichen Zykluszahlen getestet, um den linearen Bereich zu bestimmen. GAPDH mRNA-Spiegel sind hoch und 25 Zyklen sind genug, um das PCR Produkt in seinem linearen Bereich zu messen, während HIV-1 tat/rev cDNA 38 Zyklen ausgesetzt wird, um, wenn gebraucht, im linearen Bereich zu sein. 5 ml Aliquots des biotinylierten PCR Produkts werden semiquantitativ analysiert, unter Verwendung eines Fluoreszenz-Digoxigenin ELISA Nachweiskits (Boehringer Mannheim) gemäß des Hersteller-Protokolls. Kurz gesagt, wird der biotinylierte Strang des denaturierten PCR Produkts durch immobilisiertes Streptavidin eingefangen. Dann wird eine mit Digoxigenin markierte Sonde (die Sonde für HIV-1 tat/rev ist 5'-CTT TGA TAG AGA AAC TTG ATG AGT CTG-3' und die Sonde für GAPDH ist 5'-CTG CAC CAC CAA CTG CTT AGC-3') zugefügt, gefolgt von einem mit alkalischer Phosphatase markiertem Antikörper gegen Digoxigenin. Nach Zugabe des Substrats wird die Fluoreszenz in relativen Fluoreszenzeinheiten (RFU) in einem multiwell-Plattenlesegerät (Perspective biosystems, Framingham, MA) gemessen, bei Exzitation 450 nm/Emission 550 nm. Alle Daten werden auf GAPDH mRNA-Spiegel normalisiert, was als interner Standard verwendet wird.

### 3.c. DNA PCR Nachweis der HIV-I Infektion, um die Wirkung auf die frühesten Prozesse der proviralen DNA-Bildung zu studieren

**[0052]** Trizol-Reagenz wird zur DNA Isolierung gemäß des Protokolls des Herstellers verwendet. Kurz gesagt werden DNA und RNA von Zellproben in Trizol durch Chloroform isoliert. DNA wird aus der unteren Chloroformphase durch 100% Ethanol präzipitiert und die ausgefällte DNA wird zweimal in 0,1 M Natriumcitrat in 10% Ethanol gewaschen. Das Pellet wird in Wasser aufgelöst und auf Reinheit überprüft, durch Messen des OD260/280 Verhältnisses. Die frühesten Prozesse der proviralen DNA-Bildung werden durch Überprüfen der Bildung des HIVR/U5 Produkts analysiert, das andeutet, dass der Prozess der reversen Transkription stattgefunden hat. Das R/U5 Primer-Paar flankiert Sequenzen innerhalb der ersten Region der viralen DNA, die als Folge der reversen Transkription synthetisiert wird, dieses erste DNA-Fragment wird als "strong-stop minus DNA" bezeichnet. Der Primersatz, den wir verwenden, weist die frühen Schritte in der reversen Transkription nach und bestimmt, ob irgendwelche virale DNA in infizierten Zellen in der Gegenwart von APHS und Derivaten synthetisiert wird. Das Verfahren und die Bedingungen der PCR Reaktion sind im Wesentlichen die gleichen, wie in Abschnitt 3.a. beschrieben. Die R/U5 Primer-Paare (Zack et al, 1990): Sense 5'-GGCTAACTAGGGAAC-CCACTG-3' und Antisense 5'-TGTGTGCCCGTCTGTTGTGTG-3' (5'-Ende biotinyliert) ergeben ein 132 bp Fragment. Die mit Digoxigenin markierte Sonde 5'-TGTGTGCCCGTCTGTTGTGTG-3' wird verwendet, um das Fragment zu quantifizieren. PCR Vermehrungsbedingungen sind Denaturierung bei 94°C für 5 Min, gefolgt von 38 Zyklen der Denaturierung bei 94°C für 1 Min, Anlagerung bei 60°C für 1 Min und Verlängerung bei 72°C für 2 Min. Das DNA Produkt wird schließlich bei 72°C für 10 Min verlängert. 5 ml des vermehrten Produkts werden quantifiziert, unter Verwendung der Digoxigenin-markierten Sonde, mittels eines DIG-Nachweis ELISAs (Boehringer-Mannheim, Mannheim, Deutschland).

### 3.d. HIV-LTR getriebene Luciferase-Genexpression, um die Wirkung auf die HIV-Promoteraktivität zu studieren

**[0053]** pHIV-CAT Konstrukte wurden vom NIH AIDS Research and Reference Reagent Programm erhalten (National Institute of Allergy and Infectious diseases, Rockville, MD, USA). Die HIV-CAT-Plasmide enthielten HindIII und BamHI Restriktionsschnittstellen, die das CAT-Gen flankierten. Die HIV-long terminal repeat(LTR)-Sequenz wird stromaufwärts von diesem Gen gefunden. Das CAT-Gen wird aus dem Plasmid herausgeschnitten und das Luciferase(LUC)-Gen, enthalten in einem pGL3-Basisvektor (bereitgestellt durch Promega, Madison, USA) wird nach HindIII und BamHI Verdau erhalten. Das LUC-Gen wird dann die leeren HIV-Vektoren ligiert, was HIV-LUC-Plasmide mit LTR-getriebener Luciferase-Aktivität ergibt.

**[0054]** Das Basisplasmid, das keine Bindungsstelle für eukaryotische Transkriptionsfaktoren enthält, ist pCD54, welches nur die 3'-HIV-1 LTR Region enthält, enthaltend die TATA Box und die TAR Region (an die HIV-1 tat binden kann) stromabwärts des LUC-Gens.

**[0055]** Zusätzlich sind die folgenden Plasmide erhältlich:

p3NF-kB, das 3 NF-kB Bindungsstellen stromabwärts von pCD54 enthält; pCD52, das eine Bindungsstelle für SP1 stromabwärts von pCD54 enthält; pCD23, das 3 SP1 Bindungsstellen und zwei NF- $\kappa$ B Bindungsstellen

stromabwärts von pCD54 enthält; pCD16, das eine USF-, eine TCF-Ia-, zwei NF $\kappa$ B-, und drei SP-1-Bindungsstellen stromabwärts von pCD54 enthält; pCD7, das eine NF-AT-, eine USF-, eine TCF-Ia-, zwei NF $\kappa$ B-, und drei SP-1-Bindungsstellen stromabwärts von pCD54 enthält; pHIV-LUC, das die vollständige HIV-1 LTR-Region stromabwärts von pCD54 enthält. Der HIV-1 LTR besteht aus einer AP-1 COUP-, einer NF-AT-, einer USF-, einer TCF-Ia-, zwei NF $\kappa$ B-, und drei SP-1-Bindungsstellen. [Fig. 1](#) zeigt die Sammlung von Plasmiden, die zur Verfügung steht.

**[0056]** E. coli DH5aF' wurden durch CaCl<sub>2</sub> kompetent gemacht, und wurden nachfolgend transformiert mit dem pHIV-LUC Vektor und den anderen Plasmiden, die oben beschrieben wurden. Die Plasmide werden aus diesen Transformanten nach einer Über-Nacht Inkubation isoliert. Zellen ( $5 \times 10^6$  Zellen/ml) werden durch Elektroporation mit 1 mg eines Plasmids transformiert, das das LUC-Reportergen unter der Kontrolle des HIV-LTR exprimiert. Zusätzlich zu diesem Plasmid werden die Zellen co-transfiziert mit 1 mg tat Plasmid, als ein extra Transkriptionsstimulus, und mit 1 mg  $\beta$ -gal Plasmid als Kontrolle für die Transfektionseffizienz. Nach der Transfektion werden die Zellen bei 37°C für 2 Stunden inkubiert, in Medium, das 10% FKS und 10 mg/ml Gentamicin enthält. Die transfizierten Zellen werden nachfolgend mit verschiedenen Konzentrationen des untersuchten Arzneimittels inkubiert und dann durch 20 ng/ml Phorbol-12-myristat-13-acetat (für PBMC und PBL) oder 10 mM N-acetyl-L-cystein (für MDM) stimuliert. 16 Stunden nach Stimulation und Inkubation mit einer Verbindung, wird die Glühwürmchen Luciferase-Aktivität gemessen, unter Anwendung des Single-Luciferase™ Reporter-Testsystems (Promega, Madison, USA).  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität wird 16 Stunden nach Stimulation und Zugabe der Verbindung gemessen. Die Menge der Aktivität korreliert mit der Lichtemission, gemessen durch einen LUMACBiocounter M2500 bei 562 nm. Zellen, die in Abwesenheit des Arzneimittels stimuliert wurden, dienen als Kontrollzellen.

#### Beschreibung des Experiments mit [Fig. 6](#)

**[0057]** (A, B) mononukleären Zellen aus peripherem Blut (PBMC) wurden aus heparinisierem Blut von HIV-1-, HIV-2- und Hepatitis B-seronegativen Spendern isoliert und durch Ficoll-Hypaque Dichtegradienten erhalten. Zellen werden zweimal gewaschen, mit 5  $\mu$ g/ml Phytohemagglutinin (PHA) stimuliert, und in RPMI-1640 Medium, ergänzt mit 5 mM HEPES, 19 mM Natriumbicarbonat, 10  $\mu$ g/ml Gentamicin, und 10% Hitze-inaktiviertem, fötales Kälberserum (PBMC Kulturmedium) in einer Konzentration von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml kultiviert. Nach 3 Tagen Inkubation wurden stimulierte PBMC aus den Flaschen zurückgewonnen und mit HIV-I<sub>BAL</sub> für 2 Stunden mit einer Infektions-Multiplizität von 0,01 infiziert. Danach wurden HIV-infizierte und schein-infizierte PBMC zweimal gewaschen, um nicht gebundenes Virus zu entfernen.

**[0058]** (A) PBMC wurden in einer Dichte von  $6 \times 10^5$  Zellen/Vertiefung mit unterschiedlichen Konzentrationen von APHS kultiviert und nach 5 Tagen Inkubation wurden Proben des Kulturüberstands gesammelt.

**[0059]** (B) PBMC wurden in Suspension in einer Konzentration von  $2 \times 10^6$  Zellen/ml in Teflonflaschen in PBMC Kulturmedium kultiviert. Nach 5 Tagen Inkubation wurden die PBMC aus den Teflonflaschen zurückgewonnen, zweimal gewaschen, um nicht gebundenes Virus zu entfernen und in einer Dichte von  $6 \times 10^5$  PBMC/Vertiefung mit unterschiedlichen Konzentrationen von APHS kultiviert. Nach 2 Tagen Inkubation wurden Proben des Kulturüberstands gesammelt. p24-core Antigenproduktion wurde unter Verwendung des Enzymgekoppelten Immunosorbenttest-(ELISA)Systems von John Moore quantifiziert. Während APHS die HIV-1 Produktion von chronisch infizierten PBMCs (B) nicht inhibiert, inhibieren APHS Konzentrationen über 3  $\mu$ M die HIV-I<sub>BAL</sub> Replikation und 30  $\mu$ M APHS inhibieren die HIV-I<sub>BAL</sub> Replikation sogar um 100% (A).

**[0060]** (C, D) PBMC wurden aus heparinisierem Blut von HIV-1-, HIV-2-, und Hepatitis B-seronegativen Spendern isoliert und auf Ficoll-Hypaque Dichtegradienten gewonnen. PBMC wurden zweimal gewaschen und Monocyten durch Elutriation mittels Gegenstromzentrifugation aufgereinigt. Zellen waren > 98% Monocyten, nach Kriterien der Zellmorphologie auf May-Grünwald-Giemsa-gefärbten Zellabstrichen und nach unspezifischer Esterase-Färbung unter Verwendung von alpha-Naphtylacetat als Substrat. Monocyten wurden in Suspension in einer Konzentration von  $2 \times 10^6$  Zellen/ml in Teflonflaschen kultiviert, in Iscove's modifiziertem Dulbecco's Medium (IMDM) mit 10% Hitze-inaktiviertem, menschlichen AB Serum, das negativ für anti-HIV Antikörper war, 10 mg/ml Gentamicin, and 10 mg/ml Ciprofloxacin.

**[0061]** Nach 7 Tagen Inkubation wurden nicht-anheftende, von Monocyten abgeleitete Makrophagen (MDM) aus den Teflonflaschen zurückgewonnen, gewaschen und mit HIV-I<sub>BAL</sub> für zwei Stunden mit einer Infektions-Multiplizität von 0,02 infiziert.

**[0062]** Danach wurden HIV-infizierte und schein-infizierte MDM zweimal gewaschen, um nicht gebundenes

Virus zu entfernen (C). MDM wurden in Suspension in einer Dichte von  $3 \times 10^5$  Zellen/Vertiefung mit unterschiedlichen APHS Konzentrationen kultiviert, und nach 4 Tagen Inkubation wurden Proben des Kulturüberstands gesammelt. (D) MDM wurden in Suspension in einer Konzentration von  $2 \times 10^6$  Zellen/ml in Teflonflaschen in MDM Medium kultiviert. Nach 5 Tagen Inkubation wurden MDM aus den Teflonflaschen zurückgewonnen, zweimal gewaschen, um nicht gebundenes Virus zu entfernen und in einer Dichte von  $3 \times 10^5$  Zellen/Vertiefung mit unterschiedlichen APHS Konzentrationen kultiviert. Nach 2 Tagen Inkubation wurden Proben des Kulturüberstands gesammelt. p24-core Antigenproduktion wurde unter Verwendung des Enzym-gekoppelten Immunosorbenttest-(ELISA)Systems von John Moore quantifiziert. Während APHS die HIV-1 Produktion von chronisch infizierten MDM (D) nicht inhibiert, inhibieren APHS Konzentrationen über  $3 \mu\text{M}$  die p24 Produktion durch akut infizierte MDM.  $30 \mu\text{M}$  APHS inhibieren die HIV-Replikation um 88% (C).

**[0063]** Die Ergebnisse, die in A–D gezeigt werden, sind repräsentativ für drei unabhängige PBMC Spender. Diese Ergebnisse legen nahe, dass APHS die frühen Schritte des HIV-1 Lebenszyklus inhibiert und dass es beispielsweise kein Proteaseinhibitor ist.

Beschreibung des Experiments mit [Fig. 7](#)

**[0064]** Von Monocyten abgeleitete Makrophagen (MDM) wurden wie oben beschrieben gewonnen. MDM wurden dann zweimal gewaschen und für 4 bis 7 Tage in unterschiedlichen Konzentrationen von APHS kultiviert. Nach 4 Tagen Inkubationszeit wurde die zelluläre Lebensfähigkeit durch einen MTT-Cytotoxizitätstest ermittelt, wo lebensfähigen Zellen MTT in einen farbigen Formazan-Farbstoff umsetzen, der spektrophotometrisch gemessen werden kann.

Beschreibung des Experiments mit [Fig. 8](#)

**[0065]** U1 Zellen, chronisch infizierte U937 Zellen, die zwei Kopien des Genoms des HIV-1 III-Stamms in ihrem zellulären Genom beherbergen und keine viralen Partikel produzieren, wurden mit  $100 \text{ ng/ml}$  Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) für 30 Min. stimuliert. Von der PMA Behandlung von U1 Zellen ist bekannt, dass sie die Transkription des HIV-1 Genoms und daher die Produktion von infektiösen Partikeln auslöst. Danach wurden die Zellen gewaschen und in einer Dichte von  $1 \times 10^6$  Zellen/Vertiefung mit unterschiedlichen APHS Konzentrationen und verwandten Verbindungen (LM-3142, LM-3155 and LM-3189) kultiviert. Als eine negative Kontrolle wurden einige Zellen mit  $30 \mu\text{M}$  N-acetyl-L-cystein (NAC) kultiviert, von dem bekannt ist, dass es die PMA Wirkung blockiert (Daten nicht gezeigt).

**[0066]** Außerdem wurde die APHS Aktivität mit Arzneimittel-resistenten HIV Stämmen getestet (Tabelle 2). Überraschenderweise war die inhibitorische Aktivität gegenüber anderenfalls Arzneimittel-resistenten Stämmen hoch, manchmal sogar zwei- bis vierfach höher als die Aktivität gegenüber einem sensitiven Stamm.

Tabelle 1: Antiretrovirale Mittel (zugelassen oder in fortgeschrittener Entwicklung)

## Nukleosidanaloga-Inhibitoren der reversen Transkriptase

Zidovudin (ZDV, AZT)

Didanosin (ddI)

Zalcitabin (ddC)

Stavudin (d4T)

Lamivudin (3TC)

Abacavir (1592U89)

## Nicht-Nucleosid- Inhibitoren der reversen Transkriptase

Nevirapin

Delavirdin

Efavirenz (DMP-266)

## Nukleotidanaloga-Inhibitoren der reversen Transkriptase

Adefovirdipivoxil

## Proteaseinhibitoren

Saquinavir

Ritonavir

Indinavir

Nelfinavir

Amprenavir (141W94, VX-478)

Tabelle 2  
IC50-Werte von APHS für Arzneimittel-resistente HIV-1 Stämme

Virus	Resistenz	IC50 von APHS (in M)
HXB2*	-	12,6 +/-2,3
41 + 215Y**	AZT	5,1 +/-1,9
184V***	3TC	4,5 +/-1,1
3096****	High*****	4,1 +/-1,0
4602*****	Ritonavir	5,2

\*HXB2 ist der molekulare Klon der ersten Laboraufreinigung von HIV-1. Die Gene, die die Arzneimittelresistenz-Mutationen enthalten, werden aus dem klinischen Aufreinigungen ausgeschnitten und in den genetischen Hintergrund von HXB2 kloniert. Somit haben alle getesteten HIV-1 Stämme den gleichen genetischen Hintergrund.

\*\*41 + 215Y ist ein AZT-resistenter HIV-1 Stamm (1).

\*\*\*184V ist ein 3TC-resistenter HIV-1 Stamm, wie beschrieben durch Schuurman et al (2).

\*\*\*\*Stamm 3096 ist ein RT-Inhibitor-resistenter HIV-1 Stamm, wie beschrieben durch de Jong et al (3). Dieser Stamm enthält eine Insertion von zwei Aminosäuren zwischen den Codons 68 und 69 der RT sowie einen Aminosäureaustausch am Codon 67.

\*\*\*\*\*Phänotypische Resistenzanalyse zeigte hohe Grade an Resistenz gegenüber Zidovudin, Lamivudin und Stavudin (in allen getesteten Patienten) und gemäßigte Grade an Resistenz gegenüber Didanosin und Zalcitabin (in zwei Patienten).

\*\*\*\*\*Stamm 4602 ist ein HIV-Protease-resistenter HIV-1 Stamm, wie beschrieben durch Nijhuis et al. Er enthält die folgenden Mutationen: 36I, 54V, 71V, and 77M (4).

Tabelle 3. IC50 und Toxizitätsbestimmungen eines antiviralen Mittels, wie hier bereitgestellt. Seitengruppenbezugszeichen sind wie in Figur 9.

	X	Y	Z	A	B	D	Y	E	IC50*	nicht tox.
APHS	O	S	H	C	O	CH <sub>3</sub>	S	CH <sub>2</sub> CC(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CH <sub>3</sub>	10	30
BPHS		S	O	H	CH <sub>2</sub>	-	CC(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CH <sub>3</sub>	O (CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CH <sub>3</sub>	40	30
c1	O	S	H	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	-	-	S	CH <sub>2</sub> CC(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CH <sub>3</sub>	40	30
c2	O	S	H	C	O	CH <sub>3</sub>	S	(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> CO <sub>2</sub> H	15	30
c3	O	S	H	C	O	CH <sub>3</sub>	S	(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> O(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	0,3	30
c4	O	S	H	H	-	-	S	(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> CO <sub>2</sub> H	30	10
c5	O	S	H	H	-	-	S	(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> O(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	10	10
c7	O	S	H	C	O	CF <sub>3</sub>	S	(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> O(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	0,3	10

\*alle Konzentrationen sind in mikromolar

#### Literaturangaben

1. Differences in resistance contribute more strongly to the evolution of zidovudine resistance in HIV-1 infected patients than differences in replication capacity.

2. Schuurman R, Nijhuis M, van Leeuwen R, Schipper P, de Jong D, Collis P, Danner SA, Mulder J, Loveday C, Christopherson C, Kwok S, Sninsky J, Boucher CA. Rapid changes in human immunodeficiency virus type 1 RNA load and appearance of drug-resistant virus populations in persons treated with lamivudine (3TC). *J. Infect. Dis.* 1995; 171: 1411–1419.
3. de Jong JJ, Goudsmit J, Lukashov W, Hillebrand ME, Baan E, Huismans R, Danner SA, ten Veen JH, de Wolf F, Jurriaans S. Insertion of two amino acids combined with changes in reverse Transcriptase containing tyrosine-215 of HIV-1 resistant to multiple nucleoside analogs. *AIDS* 1999; 13: 75–80.
4. Nijhuis M, Schuurman R, de Jong D, Erickson J, Gustchina E, Albert J, Schipper P, Gulnik S, Boucher CA. Increased fitness of drug resistant HIV-1 protease as a result of acquisition of compensatory mutations during suboptimal therapy. *AIDS* 1999; 13: 2349–59.

#### Figurlegenden

**[0067]** [Fig. 1](#) – Plasmide, die für Studien der Wirkung von Verbindungen auf HIV-Promoteraktivität verwendet werden.

**[0068]** [Fig. 2](#) – Mononukleäre Zellen aus peripherem Blut wurden aus heparinisierem Blut von HIV-1-, HIV-2-, und Hepatitis B-seronegativen Spendern isoliert und auf Ficoll-Hypaque Dichtegradienten gewonnen. PBMC wurden zweimal gewaschen und Monocyten durch Elutriation mittels Gegenstromzentrifugation aufgereinigt. Zellen sind zu mehr als 98% Monocyten, nach Kriterien der Zellmorphologie auf May-Grünwald-Giemsagefärbten Zellabstrichen und nach unspezifischer Esterase-Färbung unter Verwendung von alpha-Naphtylacetat als Substrat. Monocyten wurden in Suspension bei einer Konzentration von  $2 \times 10^6$  Zellen/ml in Teflonflaschen kultiviert, in Iscove's modifiziertem Dulbecco's Medium (IMDM) mit 10% Hitze-inaktiviertem, menschlichen AB Serum, negativ für anti-HIV Antikörper, 10 mg/ml Gentamicin, and 10 mg/ml Ciprofloxacin.

**[0069]** Nach 7 Tagen Inkubation wurden nicht-anheftende, von Monocyten abgeleitete Makrophagen (MDM) aus den Teflonflaschen zurückgewonnen, gewaschen und mit HIV-I<sub>BaL</sub> für zwei Stunden mit einer Infektions-Multiplizität von 0,02 infiziert.

**[0070]** HIV-infizierte und schein-infizierte MDM wurden zweimal gewaschen, um nicht gebundenes Virus zu entfernen, und für 4 bis 7 Tage in unterschiedlichen APHS Konzentrationen inkubiert. Nach 4 und 5 Tagen Inkubation wurden Proben des Kulturüberstands gesammelt, und die p24-core Antigenproduktion unter Verwendung des Enzym-gekoppelten Immunosorbenttest-(ELISA)Systems von John Moore wurde quantifiziert.

**[0071]** Konzentrationen über 0,3  $\mu$ M APHS inhibieren die p24 Produktion. 30  $\mu$ M APHS inhibiert die HIV-Replikation um 88%.

**[0072]** [Fig. 3](#) – von Monocyten abgeleitete Makrophagen (MDM) wurden gewonnen, wie beschrieben in der Legende zu [Fig. 2](#). MDM wurden dann zweimal gewaschen und für 4 bis 7 Tage in unterschiedlichen Konzentrationen von APHS kultiviert. Nach 4 Tagen Inkubationszeit wurde die zelluläre Lebensfähigkeit durch einen MTT-Cytotoxizitätstest ermittelt, wo lebensfähigen Zellen MTT in einen farbigen Formazan-Farbstoff umsetzen, der spektrophotometrisch gemessen werden kann. Keine der getesteten APHS Konzentrationen wurde für cytotoxisch befunden.

**[0073]** [Fig. 4](#) – Mononukleäre Zellen aus peripherem Blut (PBMC) wurden aus heparinisierem Blut von HIV-1-, HIV-2- and Hepatitis B-seronegativen Spendern isoliert und durch Ficoll-Hypaque Dichtegradienten erhalten. Zellen wurden zweimal gewaschen, mit 5 mg/ml Phytohemagglutinin (PHA) stimuliert, und in RPMI-1640 Medium, ergänzt mit 5 mM Hepes, 19 mM Natriumbicarbonat, 10  $\mu$ g/ml Gentamicin, und 10% Hitze-inaktiviertem, fötalen Kälberserum in einer Konzentration von  $2 \times 10^6$  Zellen/ml kultiviert. Nach 3 Tagen Inkubation wurden stimulierte PBMC aus den Flaschen zurückgewonnen und für 2 Stunden mit (a) HIV-I<sub>AT</sub> mit einer Infektions-Multiplizität von 0,001, (b) HIV-I<sub>BaL</sub> mit einer Infektions-Multiplizität von 0,006 und (c) HIV-I<sub>BaL</sub> oder HIV-I<sub>AT</sub> mit einer Infektions-Multiplizität von 0,01 beziehungsweise 0,001 infiziert. HIV-infizierte und schein-infizierte PBMC wurden zweimal gewaschen, um nicht gebundenes Virus zu entfernen und für 4 bis 7 Tage in unterschiedlichen APHS Konzentrationen kultiviert. Nach 4 und 5 Tagen Inkubation wurden Proben des Kulturüberstands gesammelt, und die p24-core Antigenproduktion unter Verwendung des Enzym-gekoppelten Immunosorbenttest-(ELISA)Systems von John Moore wurde quantifiziert.

**[0074]** APHS Konzentrationen über 1  $\mu$ M inhibieren die HIV1 Produktion. 30  $\mu$ M APHS inhibieren die HIV-I<sub>BaL</sub> Replikation um 100%. Wenn die Infektivität geringer ist ([Fig. 4c](#)) inhibiert 1  $\mu$ M APHS die HIV-I<sub>BaL</sub> Replikation um 50%.

[0075] **Fig. 5** – PBMC wurden gewonnen und stimuliert, wie beschrieben in der Legende zu **Fig. 4**. 3 Tage nach Inkubation wurden PBMC aus den Flaschen zurückgewonnen, gewaschen und für 4 bis 7 Tage in unterschiedlichen Konzentrationen von APHS kultiviert. Nach 5 Tagen Inkubationszeit wurde die zelluläre Lebensfähigkeit durch einen WST-1-Cytotoxizitätstest ermittelt, wo lebensfähigen Zellen WST-1 in einen farbigen Formazan-Farbstoff umsetzen, der spektrophotometrisch gemessen werden kann. Für Konzentrationen von oder über 100  $\mu\text{M}$  wurde gefunden, dass sie die Lebensfähigkeit verringern.

[0076] **Fig. 6**: Wirkung von APHS auf die HIV-1<sub>BaL</sub> Replikation in PBMC (A, B) oder MDM (C, D) in einem akuten (A, C) oder chronischen (B, D) Modell der HIV-1 Infektion.

[0077] **Fig. 7**: Lebensfähigkeit der von Monocyten abgeleiteten Makrophagen nach APHS Behandlung.

[0078] **Fig. 8**: Wirkung von APHS auf die HIV-1 Produktion von U1 Zellen.

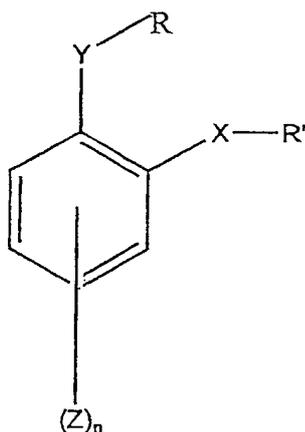
[0079] **Fig. 9**: Bezugsfigur für **Fig. 11**.

[0080] **Fig. 10**: Die 50% Inhibitionskonzentration ( $\text{IC}_{50}$ ) der Verbindungen APHS, LM-3177, LM-3189, LM-3142, LM-3155 und Aspirin, die die HIV-1 Replikation in primären, menschlichen, mononukleären Zellen aus peripherem Blut unterdrücken. Die Infektion wurde wie mit **Fig. 6A** beschrieben, durchgeführt. Die  $\text{IC}_{50}$ -Werte sind in Mikromolaren dargestellt. Die Buchstaben X, Y, Z, A, B, D, E in der ersten Reihe (obere Linie) beziehen sich auf die gleichen Buchstaben in der allgemeinen Formel der Verbindung in **Fig. 9**.

[0081] **Fig. 11**: Ausgewählte chemische Strukturen für die Buchstaben X, Y, Z, A, B, D, E in der allgemeinen Formel der Verbindung in **Fig. 9**. Von besonderem Interesse sind die Kombinationen dieser Buchstaben, wobei Z = H ist, Y = S, E =  $\text{CH}_2\text{CEC}(\text{CH}_2)_3\text{CH}_3$ , X = O, B = -, D = -, und A entweder  $\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_2(\text{CH}_2)_3\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_2(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_2(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$ , oder  $\text{CH}_2(\text{CH}_2)_6\text{CH}_3$ , die Buchstabenkombinationen, wobei Z = H, Y = S, E =  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ , X = O, A = C, B = O, und D =  $\text{CH}_3$  und die Kombinationen, wobei Z = H, Y = S, E =  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ , X = -, A = C, B = O, und D =  $\text{CH}_3$  und die Kombinationen, wobei Z =  $\text{SC}(\text{CH}_3)_3$ , Y = -, E = -, X = O, A = C, B = O und D =  $\text{CH}_3$  und die Kombinationen, wobei Z =  $\text{SC}(\text{CH}_3)_3$ , Y = -, E = -, X = -, A = C, B = O, und D =  $\text{CH}_3$  und die Kombinationen, wobei Y = -, E = -, Z =  $\text{SCH}_2\text{CEC}(\text{CH}_2)_3\text{CH}_3$ , X = O, B = -, D = -, und A entweder  $\text{CH}_2$ ,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_2(\text{CH}_2)_3\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_2(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_2(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$ , oder  $\text{CH}_2(\text{CH}_2)_6\text{CH}_3$  ist.

## Patentansprüche

### 1. Gebrauch einer Zusammensetzung der generellen Formel



dabei sind X und Y unabhängig O, S, SO, SO<sub>2</sub>, SO<sub>3</sub>; dabei ist n 0, 1, 2, 3, 4; dabei sind R, R' unabhängig H, mit der Bedingung, dass wenn R H ist, R' nicht H ist, eine C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>, verzweigte oder unverzweigte, substituierte oder unsubstituierte, gesättigte oder (poly)ungesättigte, (Cyklo)Alkyl, Alken, Alkyn, (Cyklo)Aryl, Aryl(Cyklo)Alkyl, (Cyklo)Alkylaryl, Alkoxyaryl, Alkoxyalken, Alkoxyalkyn, Enyn, Dien, Diyn oder Alkoxyalkyl; und dabei ist R' R; und dabei können R oder R' Ether-Verbindungen enthalten oder Carbonyl oder Thiocarbonyl-Funktionen an die Ringstruktur angehängt haben wie eine Ring-(C=O/S)-R/R' und Z ist unabhängig R, R', XR, XR', YR oder YR' oder ein funktionelles Äquivalent davon zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung für die Behandlung einer Vireninfektion.

2. Gebrauch eines pharmazeutisch akzeptablen Salzes oder Hydrats einer Zusammensetzung gemäß Anspruch 1 für die Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung für die Behandlung einer Vireninfektion.

3. Gebrauch gemäß Anspruch 1 oder 2, dabei sind X und Y O, S, SO<sub>2</sub>.

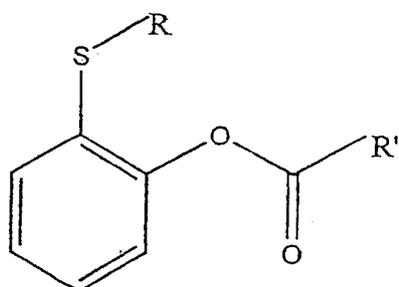
4. Gebrauch gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3, dabei ist n 1 oder 2.

5. Gebrauch gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4, dabei werden R, R' substituiert mit einem oder mehreren der Halogene oder CF<sub>3</sub>.

6. Gebrauch gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei R gewählt wird aus der Gruppe die besteht aus H, CH<sub>3</sub>, CF<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>Cl, CH<sub>2</sub>Br, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, (CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CH<sub>3</sub>, (CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>3</sub>, (CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>CH<sub>3</sub>, (CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>CH<sub>3</sub>, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>, CH=C=CH<sub>2</sub>, (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>O(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>HC=CH(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>C≡C(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>C≡C(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>C≡CCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>C≡CCH<sub>3</sub> und Isomeren und Homologen davon.

7. Gebrauch gemäß einer der Ansprüche 1 bis 6, dabei ist R' R und ausgewählt aus der Gruppe, die besteht aus H, CH<sub>3</sub>.

8. Gebrauch einer Zusammensetzung der generellen Formel



oder einem funktionellen Äquivalent davon für die Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung für die Behandlung einer Vireninfektion.

9. Gebrauch gemäß Anspruch 8, wobei R gewählt wird aus der Gruppe, die besteht aus H, CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, (CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CH<sub>3</sub>, (CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>3</sub>, (CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>CH<sub>3</sub>, (CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>CH<sub>3</sub>, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>, CH=C=CH<sub>2</sub>, (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>O(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>HC=CH(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>C≡C(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>C≡C(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>C≡CCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>C≡CCH<sub>3</sub> und CH<sub>2</sub>C≡CH sowie Isomeren und Homologen davon und R' wird ausgewählt aus der Gruppe, die besteht aus H, CH<sub>3</sub>, CF<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>Cl und CH<sub>2</sub>Br.

10. Gebrauch gemäß einem der Ansprüche 1 bis 9, wobei die genannte Vireninfektion eine retrovirale Infektion umfasst.

11. Gebrauch gemäß Anspruch 10, wobei die genannte retrovirale Infektion verursacht wird durch einen Retrovirus, das wenigstens teilweise resistent ist gegen eine Behandlung mit einem anderen Antivirenmittel.

12. Gebrauch gemäß einem der Ansprüche 1 bis 11, wobei die Behandlung zusätzlich die Behandlung mit einer anderen pharmazeutischen Zusammensetzung umfasst.

13. Gebrauch gemäß einem der Ansprüche 1 bis 12, wobei die genannte andere pharmazeutische Zusammensetzung wenigstens ein Antivirenmittel umfasst.

14. Gebrauch gemäß einem der Ansprüche 1 bis 13, wobei die genannte Behandlung zusätzlich die Behandlung von entzündlichen Reaktionen umfasst.

15. Teile-Set zum Gebrauch bei der Behandlung einer Vireninfektion enthaltend die Zusammensetzung einer Formel gemäß einem der Ansprüche 1 bis 14 oder einem pharmazeutisch akzeptablen Salz oder Hydrats davon und eine pharmazeutische Zusammensetzung, die wenigstens ein anderes Antivirenmittel enthält.

Es folgen 13 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

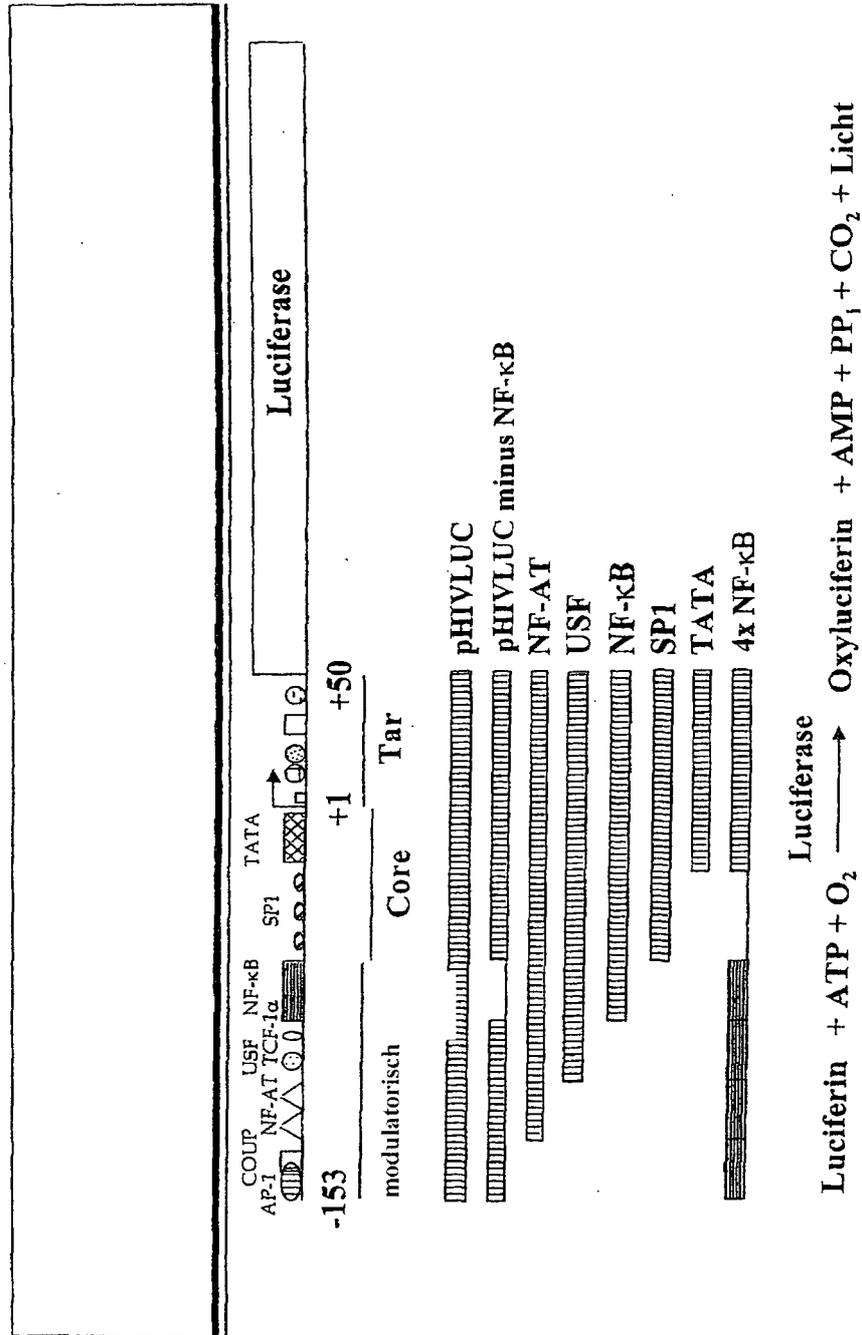


Fig. 1

**Dosis-abhängige Inhibition der HIV-1<sub>BaL</sub> Replikation  
durch APHS  
in von Monocyten abgeleiteten Makrophagen**

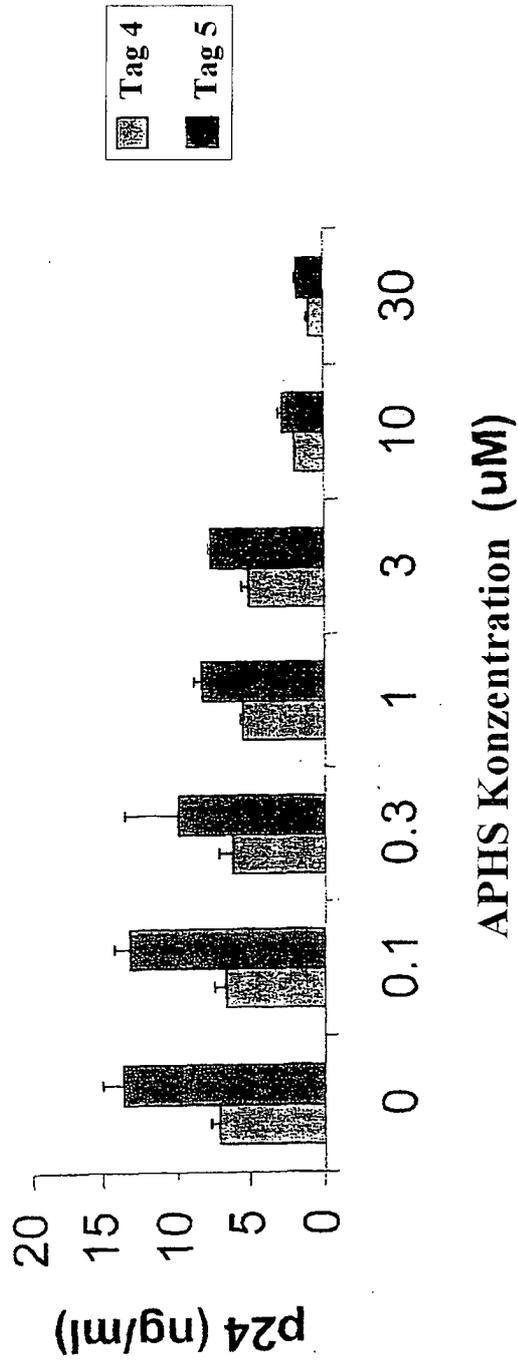


Fig. 2

**Lebensfähigkeit der von Monocyten abgeleiteten  
Makrophagen, die für 4 Tage mit APHS behandelt wurden**

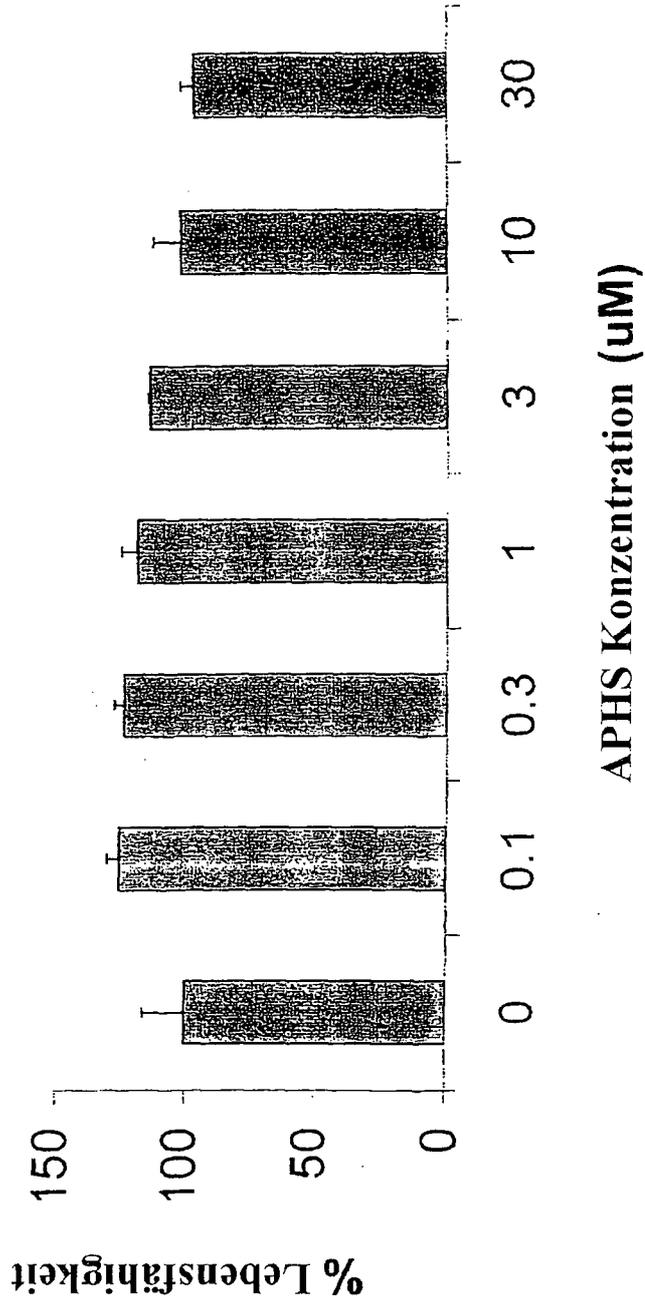


Fig. 3

**Dosis-abhängige Inhibition der HIV-1<sub>AT</sub> Replikation in mononukleären Zellen durch APHS**

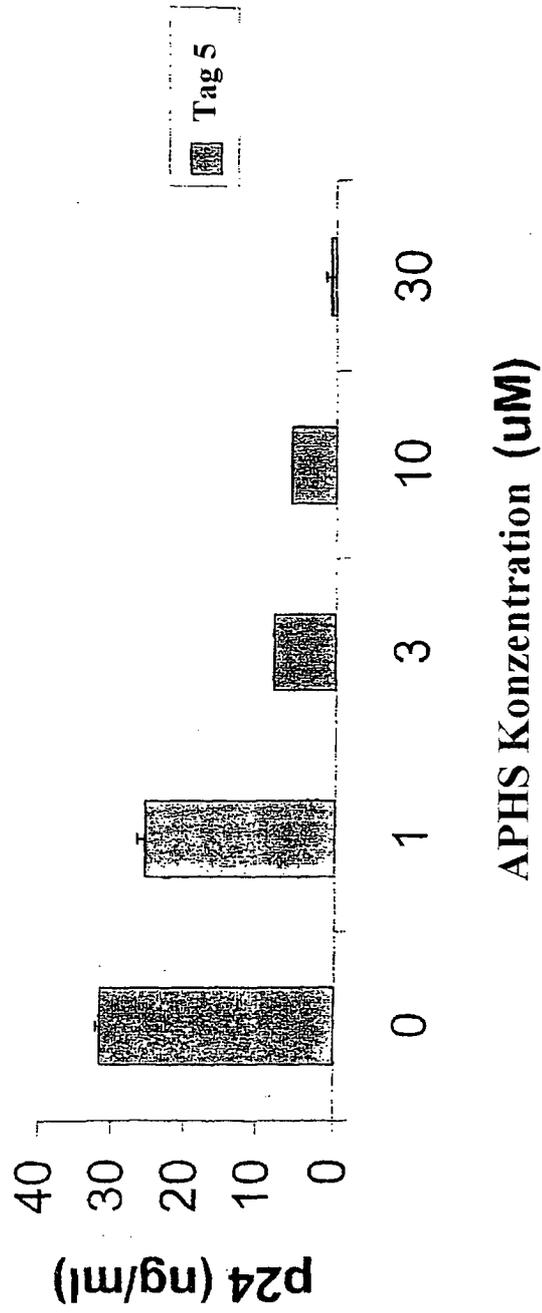


Fig. 4A

**Dosis-abhängige Inhibition der HIV-1<sub>BaL</sub> Replikation in mononukleären Zellen durch APHS**

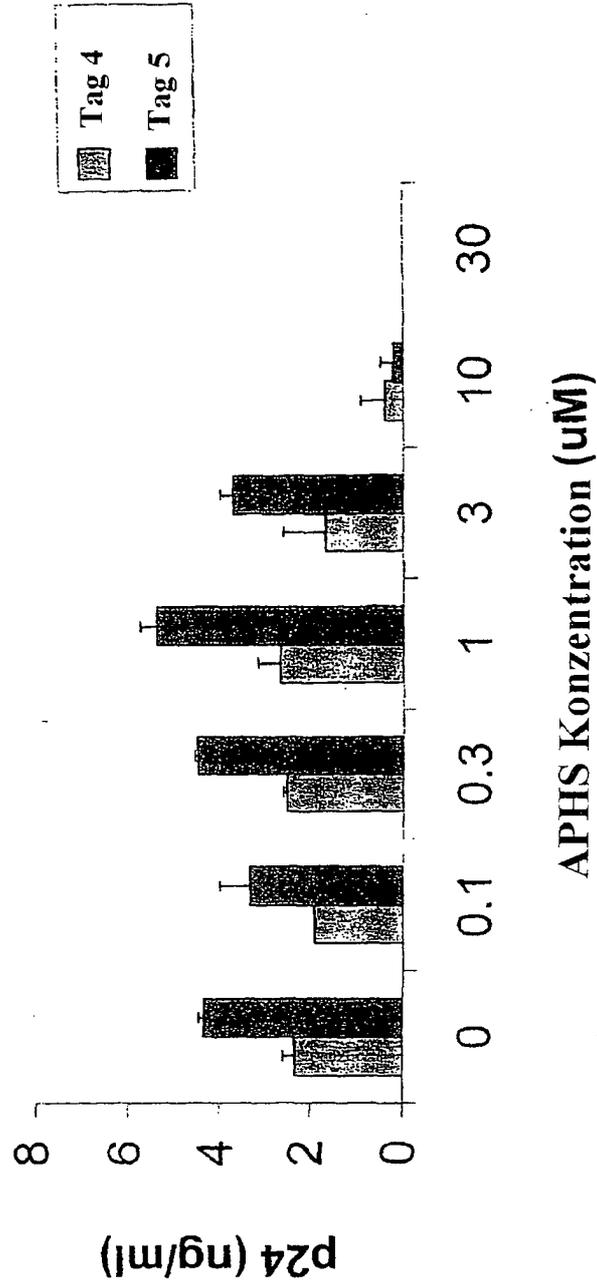


FIG. 4B

**Dosis-abhängige Inhibition der HIV-1 Replikation in mononukleären Zellen, die für 4 Tage mit APHS behandelt wurden**

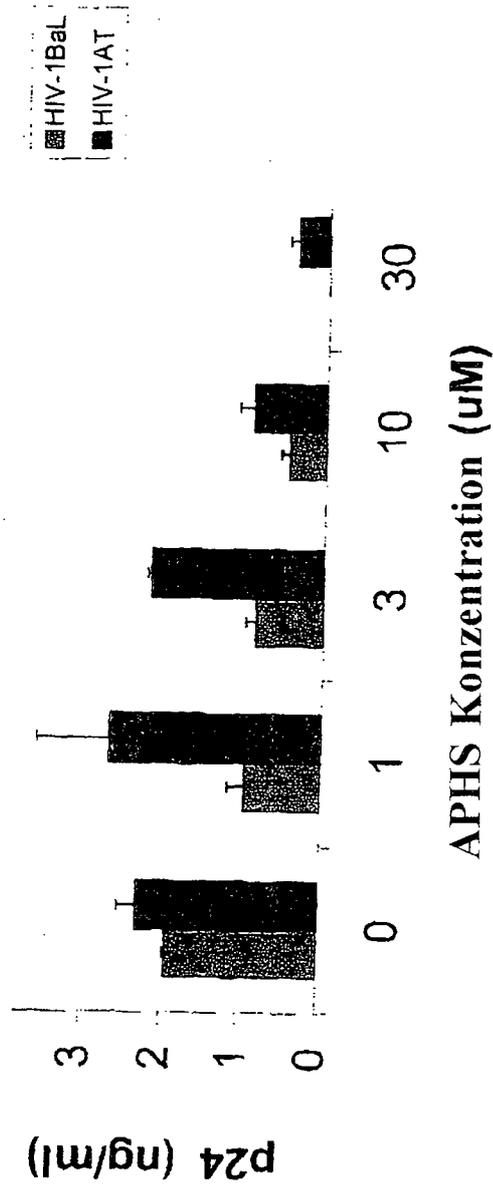


Fig. 4C

**Lebensfähigkeit von mononukleären Zellen, die für 5 Tage mit APHS behandelt wurden**

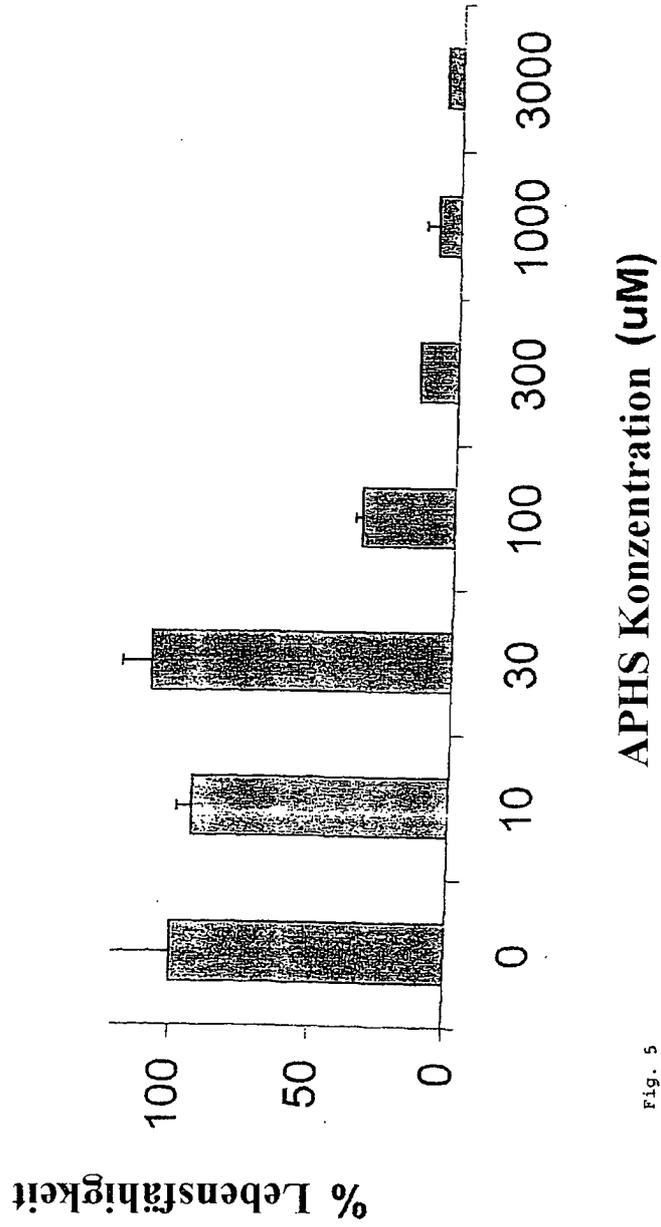


Fig. 5

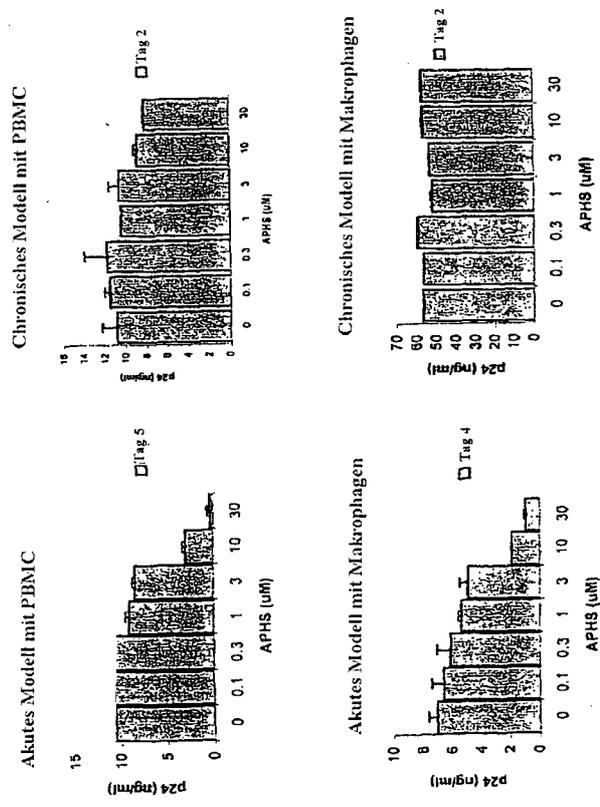


Fig. 6

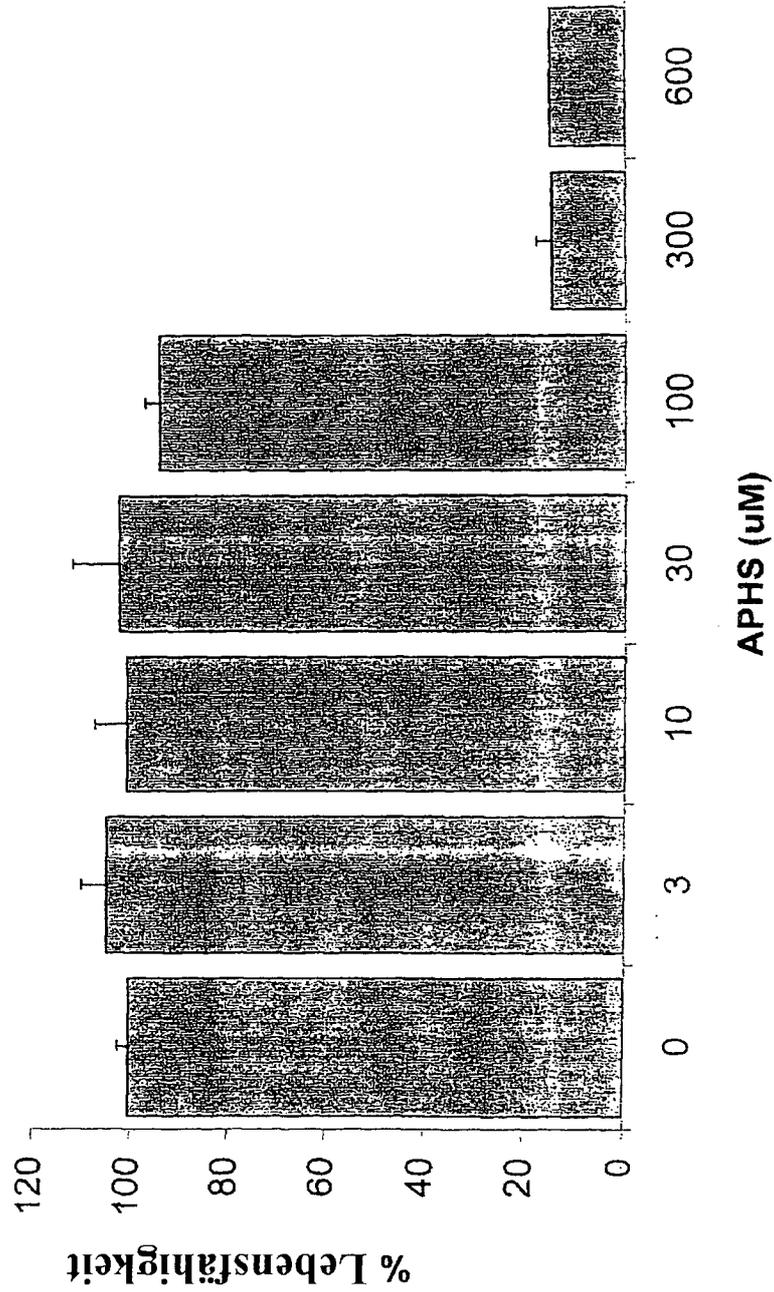
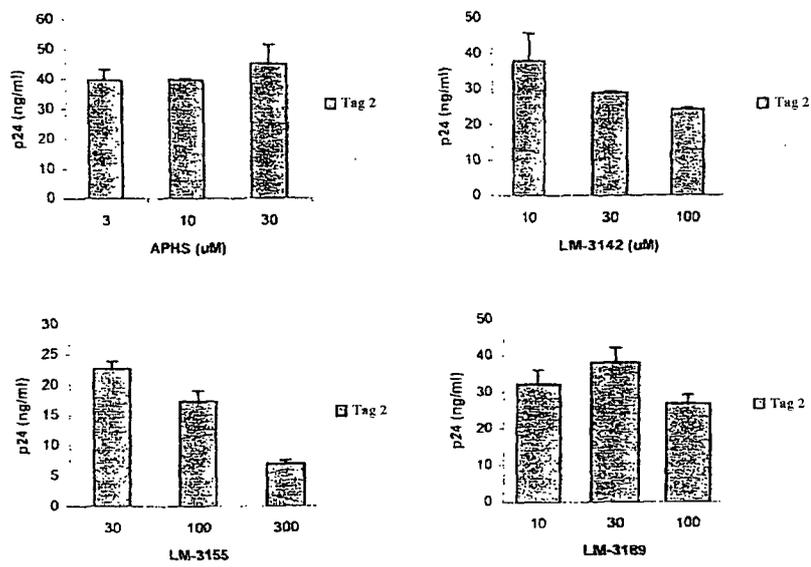


Fig. 7

Fig. 8



Kontrollen (pg/100ul)		
U1	0	0
U1+PMA	3172	2715
U1+PMA+NAC	0	0

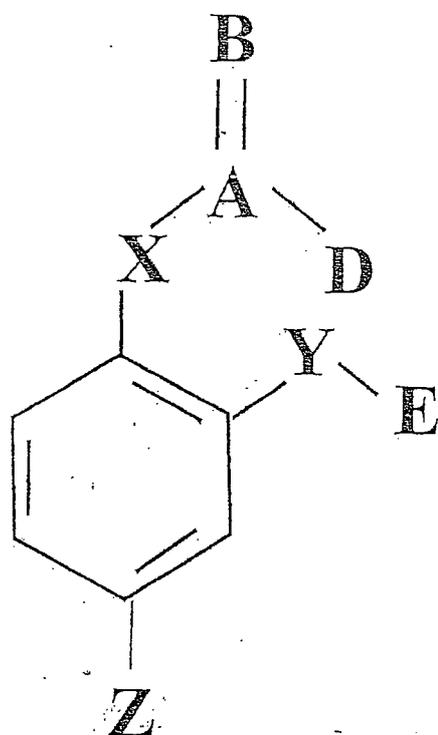


Fig. 9

	X	Y	Z	A	B	D	E	IC <sub>50</sub>
APHS	O	S	H	C	O	CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> C≡C(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CH <sub>3</sub>	3.73
LM-3177	O	SO <sub>2</sub>	H	C	O	CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> C≡C(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CH <sub>3</sub>	4.09
LM-3189	O	S	H	C	O	CH <sub>3</sub>	(CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> CH <sub>3</sub>	4.92
LM-3142	O	S	H	H	—	—	CH <sub>2</sub> C≡C(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CH <sub>3</sub>	27.46
LM-3155	O	S	H	C	O	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	222.64
Aspirin	C	C	H	C	O	CH <sub>3</sub>	CO <sub>2</sub> H	526.51

Fig. 10

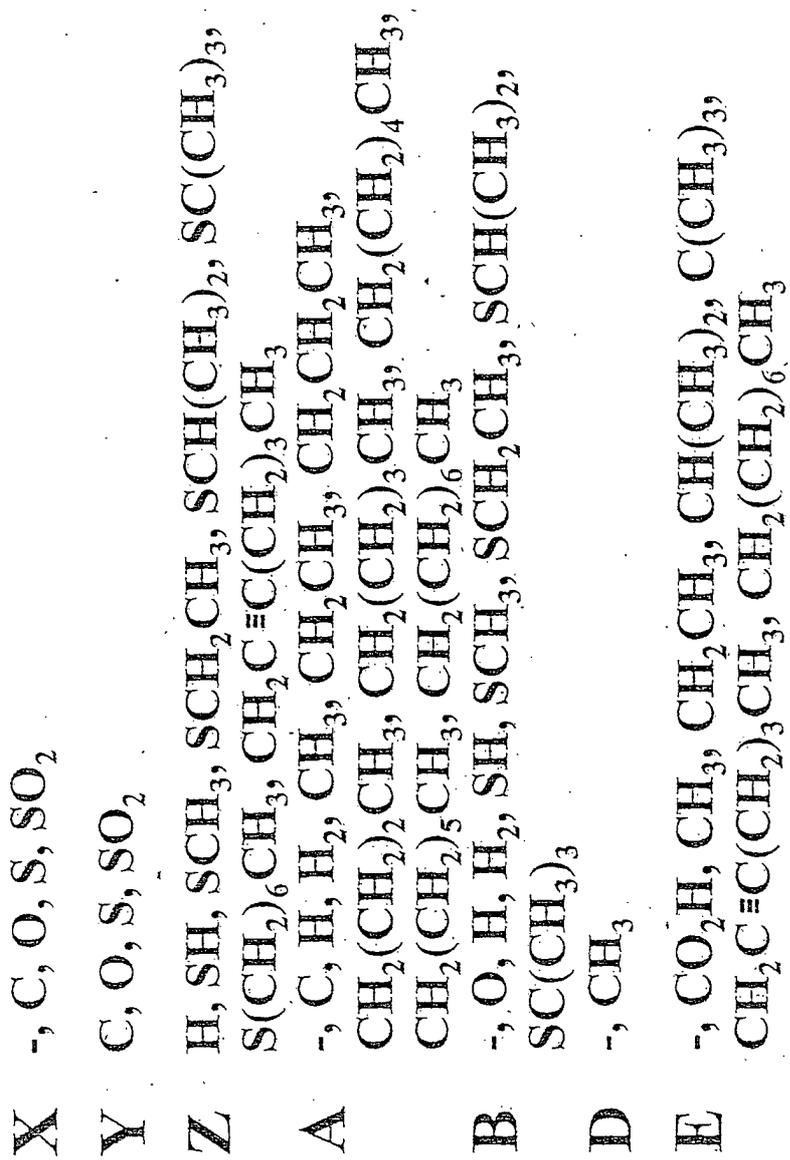


Fig. 11