

WO 2013/034299 A1

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

(19) Weltorganisation für geistiges

Eigentum

Internationales Büro



(43) Internationales

Veröffentlichungsdatum

14. März 2013 (14.03.2013)



(10) Internationale Veröffentlichungsnummer

WO 2013/034299 A1

(51) Internationale Patentklassifikation:

A61K 31/505 (2006.01) *A61P 11/00* (2006.01)
A61K 31/56 (2006.01)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2012/003757

(22) Internationales Anmeldedatum:

7. September 2012 (07.09.2012)

(25) Einreichungssprache:

Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache:

Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:

10 2011 113 059.8
9. September 2011 (09.09.2011) DE

(71) Anmelder (*für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US*): **BITOP AG [DE/DE]**; Stockumer Strasse 28, 58453 Witten (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (*nur für US*): **UNFRIED, Klaus** [DE/DE]; Ludgerusstr. 2, 40225 Düsseldorf (DE). **SYDLIK, Ulrich** [DE/DE]; Labbéstr. 16, 41169 Mönchengladbach (DE). **KRUTMANN, Jean** [DE/DE]; Rathausplatz 19, 41844 Wegberg (DE). **BILSTEIN, Andreas** [DE/DE]; Am Platz 2, 50129 Bergheim (DE).

(74) Anwalt: **SCHNEIDERS & BEHRENDT**; Huestrasse 23, 44787 Bochum (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (*soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart*): AE, AG, AL,

AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (*soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart*): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europäisches (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

- *mit internationalem Recherchenbericht (Artikel 21 Absatz 3)*
- *vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eingehen (Regel 48 Absatz 2 Buchstabe h)*

(54) Title: THERAPEUTIC USES OF ECTOIN

(54) Bezeichnung : THERAPEUTISCHE ANWENDUNGEN VON ECTOIN

(57) Abstract: The invention relates to a composition comprising ectoin, hydroxyectoin and/or a salt, ester or amide of these compounds for suppression of anti-apoptotic signals to neutrophilic granulocytes and other cells involved in inflammation. The retarded apoptosis of neutrophiles is a main component for various kinds of inflammation. Administration of ectoin achieves at least partial restoration of the normal apoptosis rate, which is associated with a corresponding improvement in the inflammation symptoms.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft eine Zusammensetzung enthaltend Ectoin, Hydroxyectoin und/oder ein Salz, Ester oder Amid dieser Verbindungen zur Unterdrückung von anti-apoptotischen Signalen auf neutrophile Granulozyten und andere an Entzündungen beteiligte Zellen. Die verzögerte Apoptose der Neutrophilen ist eine Hauptkomponente für verschiedene Arten von Entzündungen. Durch Verabreichung von Ectoin wird eine zumindest partielle Wiederherstellung der normalen Apoptoserate erreicht, was mit einer entsprechenden Verbesserung der Entzündungserscheinungen verbunden ist.

Therapeutische Anwendungen von Ectoin

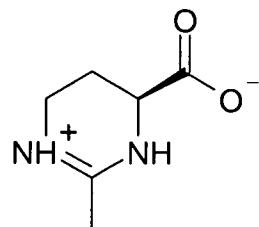
- 5 Die Erfindung betrifft Zusammensetzungen, enthaltend Ectoin, Hydroxyectoin oder entsprechende Salze, Ester und Amide.

Osmolyte bzw. kompatible Solute aus extremophilen Mikroorganismen bilden eine bekannte Gruppe niedermolekularer Schutzstoffe. Extremophile sind sehr außergewöhnliche Mikroorganismen, da sie optimal bzw. bei hohen 10 Salzkonzentrationen (bis 200 g NaCl/l) und hohen Temperaturen (60 bis 110°C) wachsen, die bei mesophilen (normalen) Organismen zu massiven Schädigungen zellulärer Strukturen führen würden. In den letzten Jahren wurde daher ein großer Forschungsaufwand betrieben, um die biochemischen 15 Komponenten zu identifizieren, die zu der bemerkenswerten Stabilisierung der Zellstrukturen führen. Obwohl viele Enzyme aus hyperthermophilen Mikroorganismen auch unter hohen Temperaturen stabil sind, gilt dies nicht generell für die zellulären Strukturen thermo- und hyperthermophiler Organismen. Zu der hohen Temperaturstabilität von Zellstrukturen tragen in erheblichem Maße niedermolekulare organische Substanzen (kompatible 20 Solute, Osmolyte) im intrazellulären Milieu bei. Verschiedene neuartige Osmolyte konnten in den letzten Jahren in extremophilen Mikroorganismen erstmals identifiziert werden. In einigen Fällen konnte der Beitrag dieser Verbindungen zum Schutz zellulärer Strukturen – vor allem Enzymen – gegenüber Hitze und Trockenheit bereits gezeigt werden (K. Lippert, E. A. 25 Galinski, *Appl. Microbiol. Biotech.* **1992**, 37, 61-65; P. Louis, H. G. Trüper, E. A. Galinski, *Appl. Microbiol. Biotech.* **1994**, 41, 684-688; Ramos et al., *Appl. Environm. Microbiol.* **1997**, 63, 4020-4025; Da Costa, Santos, Galinski, *Adv. in Biochemical Engineering Biotechnology*, **61**, 117-153).

Für eine Reihe von kompatiblen Soluten haben sich sinnvolle Anwendungsmöglichkeiten im medizinischen, kosmetischen und biologischen Bereich ergeben. Zu den wichtigsten kompatiblen Soluten zählen dabei das Ectoin (2-Methyl-1,4,5,6-tetrahydropyrimidin-4-carbonsäure) und seine Derivate.

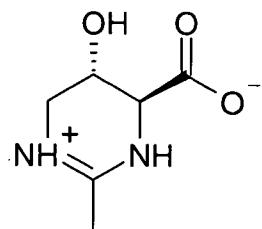
- 5 So wird beispielsweise in der EP 0 887 418 A2 die Verwendung von Ectoin und Hydroxyectoin (5-Hydroxy-2-methyl-1,4,5,6-tetrahydropyrimidin-4-carbonsäure) zur Behandlung von Hauterkrankungen oder als wirksamer Zusatz zur Kryoprotektion von biologischen Wirkstoffen und Zellen beschrieben. Die DE 10 10
10 2006 056 766 A1 zeigt die Verwendung von Ectoin zur Behandlung des Vascular Leak Syndroms (VLS). Weitere Beispiele sind die Stabilisierung von Vakzinen (DE 100 65 986 A1) oder die dermatologische Verwendung zur Behandlung von Neurodermitis (DE 103 30 243 A1).

Die Struktur des natürlichen L-Ectoins ((S)-2-Methyl-1,4,5,6-tetrahydropyrimidin-4-carbonsäure) ist im Folgenden dargestellt:



15

Auch das Hydroxyectoin wurde als für verschiedene Zwecke vorteilhaft beschrieben. Die Struktur des natürlichen Hydroxyectoins ((4S,5S)-5-Hydroxy-2-methyl-1,4,5,6-tetrahydropyrimidin-4-carbonsäure) wird im Folgenden wiedergegeben:



20

Die Behandlung von auf Schwebstaubeinwirkung beruhenden Lungenkrankheiten und kardiovaskulären Erkrankungen ist Gegenstand des europäischen Patents EP 1 641 442 B1. Hierin wird die Inhalation von Ectoin oder Hydroxyectoin enthaltenden Arzneimittelzubereitungen zur Bekämpfung derartiger Krankheiten beschrieben. Erkrankungen, die nicht auf Schwebstaubeinwirkung beruhen, sind jedoch nicht Gegenstand des Patents.

Bei vielen Entzündungserscheinungen spielen neutrophile Granulozyten, kurz Neutrophile, eine wichtige Rolle, insbesondere in der Bekämpfung von viralen und bakteriellen Pathogenen. Neutrophile werden in hoher Zahl im Knochenmark gebildet. Die Pathogene werden durch Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies und Enzymen wie Myeloperoxidase, Elastase oder Matrixmetalloproteininasen zerstört. Da diese Reaktionen jedoch mit Nebenwirkungen auf das beteiligte Gewebe verbunden sind, muss eine strikte Regulation erfolgen, so dass die neutrophile Entzündung nicht über die Bekämpfung der eigentlichen Pathogene hinaus andauert. Entsprechend wird eine Signalkaskade aktiviert, die zur Apoptose der neutrophilen Granulozyten führt. Entzündungsmediatoren bewirken jedoch, dass die Apoptose hinausgezögert wird und verlängern auf diese Weise die Lebenszeit der Neutrophile. Die Akkumulation von Neutrophilen und Monozyten am Infektionsort stellt eine der Hauptkomponenten einer Entzündung dar. Die dauerhafte Verzögerung der Apoptose kann bis zu chronischen Entzündungserscheinungen führen. Beispiele sind eine chronische Lungenentzündung oder eine chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD).

Der Schwerpunkt bei der Bekämpfung von chronischen Entzündungen liegt daher in der Bekämpfung der Entzündung, die auf die Akkumulation der Neutrophile zurückzuführen ist. Problematisch macht sich hierbei bemerkbar, dass Neutrophile, anders als andere an einer Entzündung beteiligte Zellen, auf Corticosteroide nur unbefriedigend ansprechen. Wünschenswert wären daher Medikamente, die die anti-apoptotische Wirkung von Entzündungsmediatoren, Corticosteroiden und anderen Stoffen einschränken.

Überraschend hat sich nunmehr herausgestellt, dass die Behandlung mit Ectoin oder Hydroxyectoin die anti-apoptotische Wirkung der Entzündungsmediatoren,

Corticosteroide und anderen Stoffen zumindest teilweise aufhebt und auf diese Weise die natürliche Apoptoserate von neutrophilen Granulozyten restauriert, ohne jedoch alleine eine pro-apoptotische Wirkung zu zeigen. Die Erfindung betrifft daher eine Zusammensetzung enthaltend Ectoin, Hydroxyectoin und/oder ein Salz, Ester oder Amid dieser Verbindungen zur Unterdrückung von anti-apoptotischen Signalen auf neutrophile Granulozyten und andere an Entzündungen beteiligte Zellen wie Makrophagen, eosinophile Granulozyten, basophile Granulozyten, Mastzellen, Lymphozyten, Epitheloidzellen und dendritische Zellen. Die Unterdrückung der anti-apoptotischen Signale steht 5 normalerweise im Zusammenhang mit der Behandlung oder Prävention von Entzündungen, wobei chronische Entzündungen hier eine besondere Rolle spielen. Besondere Bedeutung hat die Bekämpfung von Entzündungen, die die Atemwege und die Lunge betreffen, insbesondere Lungenentzündungen, 10 Asthma, chronisch obstruktive Lungenerkrankungen (COPD), ARDS, zystische Fibrose, 15 Lungenfibrose, Silikose, Sarkoidose, Allergien und bronchiale Hyperreagibilität.

Die Hemmung der Apoptose der neutrophilen Granulozyten bei den untersuchten Entzündungsreaktionen wird auf eine membranvermittelte Aktivierung von membrangekoppelten Signalwegen über PI3-K 20 (Phosphatidylinositol-3-kinase) zurückgeführt. Diese führen zu einer Aktivierung der Proteinkinase B (AKT) und letztlich zu einem Anstieg des Mcl-1-Levels, eines anti-apoptotisch wirkenden Proteins. Es wird vermutet, dass Ectoin die AKT-Aktivierung reduziert.

Die neutrophile Entzündungsreaktion wurde bei Ratten untersucht, denen 25 intratracheal Kohlenstoffnanopartikel zugeführt wurden. Dies geschah sowohl zusammen mit als auch ohne Ectoin. Anschließend wurden die Ratten zu verschiedenen Zeitpunkten untersucht, wobei man nach zwei Tagen eine signifikante Reduzierung der Zahl an Neutrophilen in der Ectoin-Gruppe im Vergleich zur Placebo-Gruppe beobachten konnte. Die Wirksamkeit nach zwei 30 Tagen ist in Übereinstimmung mit der beobachteten Reduzierung der cinc-1-Freisetzung, eines Chemokins, das bei Entzündungen eine wichtige Rolle spielt. Zunächst erfolgt die Freisetzung des cinc-1 in erster Linie durch Epithelzellen und Makrophagen, während zu späteren Zeitpunkten die Freisetzung durch die

letztlich in hoher Zahl vorhandenen Neutrophile dominiert. Die Reduzierung der cinc-1-Freisetzung nach zwei Tagen bei Ectoin-Verabreichung zeigt, dass zu diesem Zeitpunkt die Zahl der Neutrophile abgenommen hat.

Ebenso konnte gezeigt werden, dass die Gabe von Ectoin in zwei Dosen 1 und
5 2 Tage nach Auslösung der Entzündungsreaktion praktisch denselben Effekt hat
wie die Verabreichung des Ectoins bei Auslösung der Entzündungsreaktion.
Ectoin kann somit nicht nur präventiv, sondern auch zur Behandlung einer
bereits vorliegenden Entzündung eingesetzt werden. Auch bei wiederholter
10 Gabe von Ectoin nach mehrfacher Auslösung einer Entzündungsreaktion konnte
eine Reduzierung der Zahl an Neutrophilen sowie eine Absenkung des cinc-1-
Niveaus beobachtet werden, was die Anwendbarkeit bei der Behandlung von
chronischen Entzündungen unterstreicht.

Entsprechende Untersuchungen wurden auch mit isolierten humanen
neutrophilen Granulozyten durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass die
15 Absenkung der Apoptoserate durch pro-entzündliche Faktoren wie
Kohlenstoffnanopartikel (CNP), LTB₄ oder GM-CSF durch Gabe von Ectoin
konzentrationsabhängig zumindest partiell kompensierbar ist. Die Gabe von
Ectoin allein zu den Neutrophilen ohne vorherige Behandlung mit pro-
entzündlichen Faktoren führte nicht zu einer Erhöhung der Apoptoserate. Dies
20 zeigt, dass Ectoin nicht grundsätzlich pro-apoptotisch wirkt, sondern vielmehr
die bei einer Entzündung ablaufenden anti-apoptotischen Mechanismen
unterdrückt.

Die anti-anti-apoptotische Wirksamkeit wurde zwar anhand von Versuchen *in vivo* und *in vitro* nachgewiesen, bei denen eine Entzündungsreaktion mithilfe
25 von Kohlenstoffnanopartikeln ausgelöst wurde, sie ist jedoch hierauf nicht
beschränkt, vielmehr betrifft die vorliegende Erfindung explizit gerade auch
solche Entzündungen, die nicht auf Schwebstaubeinwirkung zurückzuführen
sind. Während die EP 1 641 442 B1 noch davon ausging, dass Ectoin nur direkt
30 die schädlichen Auswirkungen von Schwebstäuben bekämpft, konnte nunmehr
gezeigt werden, dass die Behandlung von Entzündungen mit Ectoin bei der
Restoration der natürlichen Apoptoserate von Neutrophilen ansetzt.

Als besonders vorteilhaft hat sich darüber hinaus eine Kombination von Ectoin/Hydroxyectoin bzw. entsprechender Derivate mit Corticosteroiden erwiesen, insbesondere mit Glucocorticoiden wie Dexamethason, Budesonid, Betamethason, Triamcinolon, Fluocortolon, Methylprednisolon, Deflazacort,

- 5 Prednisolon, Prednison, Cloprednol, Cortison, Hydrocortison, Fluocortin, Clocortolon, Clobetasol, Alclomethason, Flumethason, Fluoprednidien, Fluorandrenolon, Prednicarbat, Mometason, Methylprednisolon, Fluticasone, Halomethason, Fluocinolon, Diflorasan, Desoximethason, Fluocinonid, Fludrocortison, Deflazacort, Rimexolon, Cloprednol, Amcinonid, Halcinonid, 10 Diflucortolon, Clobetasol oder Salzen, Estern, Amiden, Solvaten oder Hydraten dieser Verbindungen.

Obgleich Corticosteroide als wirksame Mittel gegen Entzündungen bekannt sind, spielen sie bei der Bekämpfung von neutrophilen Entzündungen eine zweischneidige Rolle, da sie die natürliche neutrophile Apoptose herabsetzen.

- 15 Durch Kombination eines Corticosteroids mit Ectoin/Hydroxyectoin wird daher die vorteilhafte antientzündliche Wirkung des Steroids mit der Restauration der natürlichen Apoptoserate und somit Reduktion der unerwünschten anti-apoptotischen Wirkung des Corticosteroids durch Ectoin/Hydroxyectoin kombiniert. Beispiele sind Kombinationen von Ectoin oder entsprechenden 20 Derivaten mit Dexamethason und/oder Budesonid. Alternative vorteilhafte Kombinationen sind Ectoin/Hydroxyectoin mit GM-CSF, Leukotrienen wie LTB₄, Theophyllin (1,3-Dimethyl-xanthin), Leukotrienantagonisten, Phosphodiesterase-Hemmer (PDE-Hemmer, insbesondere PDE4-Hemmer), Muskarinrezeptor-Antagonisten, Anticholinergika wie Ipratropiumbromid oder Tiotropiumbromid 25 oder anderen Arzneistoffen, bei denen die natürliche neutrophile Apoptoserate unerwünscht herabgesetzt wird.

Besondere Bedeutung hat auch bei einer Kombination von Corticosteroiden mit Ectoin/Hydroxyectoin die Behandlung von Lungenerkrankungen, insbesondere Lungentzündungen, Asthma (Asthma bronchiale), chronisch obstruktiven

- 30 Lungenerkrankungen (COPD), ARDS, zystischer Fibrose, Lungenfibrose, Silikose, Sarkoidose, Allergien und bronchialer Hyperreagibilität. Sinnvoll ist es dabei, die Zusammensetzung als inhalierbare Zusammensetzung vorzusehen. Die Zusammensetzung kann dabei flüssig als Lösung oder fest vorliegen, wobei

die Zusammensetzung zweckmäßigerweise bei Bedarf mit Hilfe einer Inhalationsvorrichtung als Aerosol zerstäubt und eingeatmet wird.

Die Verabreichung von Corticosteroiden und Ectoin/Hydroxyectoin muss nicht in jedem Fall aus derselben Zusammensetzung heraus erfolgen, wichtig ist jedoch

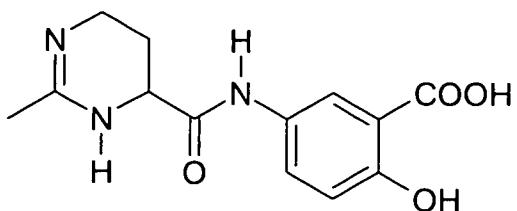
- 5 die gleichzeitige oder zeitnahe Verabreichung, so dass die Wirkstoffe funktionell in der oben beschriebenen Weise zusammenwirken. Entsprechend betrifft die Erfindung auch ein Kombinationspräparat, das zumindest zwei einzelne Zusammensetzungen umfasst, nämlich eine Zusammensetzung enthaltend Ectoin, Hydroxyectoin und/oder ein Salz, Ester oder Amid dieser Verbindungen
10 sowie eine weitere Zusammensetzung, die ein Corticosteroid enthält. Das Kombinationspräparat stellt somit ein Kit of parts aus zwei Zusammensetzungen dar, die erst gemeinsam ihre volle Wirksamkeit entfalten. Bei dem Corticosteroid kann es sich insbesondere um eines der oben genannten Glucocorticoide handeln.

- 15 Als pharmakologisch verträgliche Salze des Ectoins/Hydroxyectoins kommen die Alkali- oder Erdalkalosalze, insbesondere die Salze des Kaliums, Natriums, Magnesiums und Calciums, aber auch Salze mit organischen Basen wie z. B. mit nicht toxischen aliphatischen oder aromatischen Aminen in Frage.

- 20 Durch Umsetzung der Carboxylgruppe des Ectoins/Hydroxyectoins mit Alkoholen oder Aminen, können entsprechende Ester oder Amide erhalten werden, die ebenfalls erfindungsgemäß einsetzbar sind. Im Falle eines Amids kann das Stickstoffatom wiederum gesättigte oder ungesättigte, geradkettige oder verzweigte Alkylgruppen aufweisen. Beim Hydroxyectoin kann auch die Hydroxygruppe mit einer Carbonsäure zu einem entsprechenden Ester
25 umgesetzt sein.

Als vorteilhaft hat sich u. a. die Verwendung des Ectoinamids der 2-Hydroxy-5-aminobenzoesäure herausgestellt. Die Strukturformel ist im folgenden wiedergegeben:

8



- Es handelt sich somit um das 2-Methyl-1,4,5,6-tetrahydropyrimidin-4-carbonsäureamid der 2-Hydroxy-5-aminobenzoësäure. Bevorzugt handelt es sich um das entsprechende Amid des L-Ectoins: (S)-2-Methyl-1,4,5,6-tetrahydropyrimidin-4-carbonsäureamid. Die Verbindung wurde getestet und zeigte eine vergleichbare Wirksamkeit mit Ectoin selbst (vgl. Fig. 7). Möglich ist auch die Verwendung des entsprechenden Amids von Hydroxyectoin (5-Hydroxy-2-methyl-1,4,5,6-tetrahydropyrimidin-4-carbonsäure), bevorzugt von L-Hydroxyectoin ((4S,5S)-5-Hydroxy-2-methyl-1,4,5,6-tetrahydropyrimidin-4-carbonsäure), d. h. das Hydroxyectoinamid der 2-Hydroxy-5-aminobenzoësäure. Auch das jeweilige Amid kann in ionischer oder zwitterionischer Form vorliegen. Die Erfindung betrifft somit auch die genannten Verbindungen bzw. Salze, Ester oder Amide dieser Verbindungen und Zusammensetzungen, die diese Verbindungen bzw. Salze, Ester oder Amide enthalten. Die Zusammensetzungen können der Verwendung als Arzneimittel dienen, insbesondere der Unterdrückung von anti-apoptotischen Signalen auf neutrophile Granulozyten, Makrophagen, eosinophile Granulozyten, basophile Granulozyten, Mastzellen, Lymphozyten, Epitheloidzellen, dendritische Zellen oder andere an Entzündungen beteiligte Zellen.
- Allgemein können die erfindungsgemäßen Wirkstoffe ggf. auch mit weiteren Wirkstoffen unter Einsatz von pharmakologisch unbedenklichen Hilfs- und Zusatzstoffen zu vorzugsweise inhalierbaren Arzneimitteln verarbeitet werden. Solche Zusätze sind bei inhalierbaren flüssigen Zubereitungen in erster Linie Wasser, ggf. unter Zusatz von weiteren Lösungsmitteln, Stabilisatoren, Konservierungsmitteln, Emulgatoren, Antioxidantien, Füllstoffen oder Lösungsvermittlern. Als weitere Wirkstoffe sind Antiasthmata, Broncholytika, nichtsteroidale antientzündliche Stoffe (NSAIDs) oder Expektorantia denkbar. Als Konservierungsmittel kommen in Frage: Benzalkoniumchlorid, Chlorbutanol, Thiomersal, Methylparaben, Propylparaben, Sorbinsäure und deren Salze,

Natriumedetat, Phenylethylalkohol, Chlohexidinhydrochloridacetat, -digluconat, Cetylpyridiniumchlorid, -bromid, Chlorkresol, Phenylquecksilberacetat, Phenylquecksilbernitrat, Phenylquecksilberborat, Phenoxyethanol.

Die Formulierungen der Erfindung können ebenfalls geeignete Puffersysteme oder andere Hilfsstoffe zur pH-Einstellung beeinhalten, um einen pH-Wert einzustellen und aufrechtzuerhalten in der Größenordnung von 4-8, vorzugsweise von 5 bis 7,5. Geeignete Puffersysteme sind Citrat, Phosphat, Trometamol, Glycin, Borat, Acetat. Diese Puffersysteme können hergestellt werden aus Substanzen wie Citronensäure, Mononatriumphosphat, Dinatriumphosphat, Glycin, Borsäure, Natriumtetraborat, Essigsäure oder Natriumactat.

Die Konzentration des Ectoins/Hydroxyectoins bzw. entsprechenden Derivats bezogen auf die Zusammensetzung beträgt typischerweise 0,001 bis 50 Gew.-%, bevorzugt 0,05 bis 20 Gew.-%, insbesondere 0,1 bis 10 Gew.-%.

Im Fall der Verabreichung in fester Form, bspw. mittels Pulverinhalatoren, ist es sinnvoll, nur leicht resorbierbare nichtreizende Trägerstoffe wie mikronisierte Lactose einzusetzen.

Versuch 1

Kohlenstoffnanopartikel (CNP, 14 nm, Printex 90, Degussa, Frankfurt, Deutschland) wurden mit Hilfe einer Ultraschallbehandlung in einer phosphatgepufferten Salzlösung (PBS) suspendiert. Ebenso wurde eine 0,1 und eine 1 mM-Lösung von Ectoin in PBS hergestellt. Weibliche Fisher 344 Ratten wurden intratracheal mit 0,4 ml der CNP-Partikelsuspension behandelt. Nach 1 und 2 Tagen fand eine Behandlung mit 0,4 ml der Ectoin-Lösungen bzw. PBS statt. Am 3. Tag wurden die Ratten getötet, die Lungen wurden mit je 4 x 5 ml PBS gespült. Die Zellen jedes Tieres wurden in 1 ml PBS suspendiert und zentrifugiert. Die Pellets wurden 1 mal mit PBS gewaschen und in 300 µl hypotonischer Lösung (0,1 % Natriumcitrat, 0,1 % Triton X 100) enthaltend 50 µg/ml Propidiumiodid (PI) resuspendiert. Anschließend erfolgte die Fluoreszenzmessung zur Bestimmung der Apoptoserate.

Man erhielt das in Figur 1 dargestellte Ergebnis (C: Kontrolle ohne CNP-Behandlung; *: signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe ohne CNP-Behandlung; †: signifikanter Unterschied zu nur mit CNP und PBS behandelten Tieren).

5 **Versuch 2**

Die Wirkung von Ectoin auf die Apoptose wurde anhand von menschlichen Neutrophilen untersucht. Neutrophile von 3 männlichen und 2 weiblichen jungen, gesunden Spendern wurden isoliert und mit den angegebenen Mengen Ectoin (mM) behandelt. Die Behandlung erfolgte mit Ectoin allein (offene Balken) bzw. mit 33 µg/ml CNP (schwarze Balken). In der Kontrollgruppe (C) wurde kein Ectoin verabreicht. Das Ergebnis ist in Figur 2 dargestellt.

Die Quantifizierung der apoptotischen Zellen erfolgte in folgender Weise: Die Neutrophile wurden in 300 µl hypotonischer Lösung enthaltend Propidiumiodid (PI) suspendiert. Die Fluoreszenz von PI wurde über Durchflusszytometrie gemessen (FACScan Zytometer, BD Biosciences). Die Ergebnisse werden dargestellt als Prozentsatz an hypodiploider DNA (sub-G1), korrespondierend 15 zur fragmentierten DNA, die für apoptotische Zellen charakteristisch ist.

Die durch CNP hervorgerufene Reduktion der Apoptoserate konnte durch Verabreichung signifikanter Mengen Ectoin praktisch aufgehoben werden.

20 (*: signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe ohne CNP-Behandlung; †: signifikanter Unterschied zu nur mit CNP und PBS behandelten Neutrophilen).

Versuch 3

Die Wirkung von Ectoin auf die Apoptose wurde anhand von menschlichen Neutrophilen untersucht. Neutrophile von 3 männlichen und 2 weiblichen jungen, gesunden Spendern wurden isoliert und für 2 h mit PBS (dunkle Balken) bzw. mit 1 mM Ectoin (helle Balken) vorbehandelt. Anschließend erfolgte die

Behandlung mit 33 µg/ml Kohlenstoffnanopartikeln (ufCB: ultrafine carbon black), 300 nM LTB₄, 20 ng/ml GM-CSF oder 1 µM Dexamethason bzw. keine Behandlung mit pro-entzündlichen Faktoren. Das Ergebnis ist in Figur 3 dargestellt. (†: signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe; *: signifikanter Unterschied zu nur mit pro-entzündlichen Faktoren und PBS behandelten Neutrophilen, Quantifizierung der apoptotischen Zellen analog Versuch 2).

Versuch 4

Die Wirkung von Ectoin auf die Apoptose wurde analog zu Versuch 3 bei COPD-Patienten und entsprechend alten Nicht-COPD-Patienten nachgewiesen.

10 Die neutrophilen Granulozyten wurden für 2 h mit 1 mM Ectoin bzw. PBS vorbehandelt, anschließend folgte Behandlung für 16 h mit 33 µg/ml CNP, 300 nM LTB₄, 20 ng/ml GM-CSF oder PBS. Es konnte eine höhere Basis-Apoptose festgestellt werden, dennoch reduzierten die inflammatorischen Stimulantien die Apoptoserate signifikant. Das Ergebnis ist in Figur 4 dargestellt. (dunkle Balken: Vorbehandlung mit Ectoin; helle Balken: Vorbehandlung mit PBS; *: signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe ohne CNP oder Entzündungsmediatoren; §: signifikanter Unterschied zur Behandlung ohne Ectoin; Quantifizierung der apoptotischen Zellen analog Versuch 2).

20 **Versuche 5-7**

Für die Versuche 5 bis 7 wurden neutrophile Granulozyten aus Blutproben gewonnen. Die Gruppen 1 und 2 bestanden aus Personen aus einer laufenden Patientenstudie. Männliche Patienten (Alter: 40 bis 80 Jahre) mit stabilem COPD-Verlauf (GOLD III/IV) und gesunden Kontrollpatienten in der gleichen 25 Altersgruppe.

Darüber hinaus wurden junge, männliche Freiwillige in der Klinik (Gruppe 3) herangezogen.

Versuch 5

Der Einfluss von Ectoin in Kombination mit dem Corticosteroid Budesonid auf Apoptoseraten von Neutrophilen wird in Figur 5 dargestellt. Es wurden sub-G₁-Zellen nach Propidiumiodid-Färbung (FACS-Durchflusszytometrie) gemessen. Zellen: primäre, periphere Neutrophile. Isolierung der Neutrophile durch 5 Percoll®-Zentrifugation. Kultivierung von 2×10^6 Neutrophilen in Gegenwart von 33 µg/ml CNP, 300 nM LTB₄, 20 ng/ml GM-CSF, 1 µM Budesonid, 1 mM Ectoin und Kombinationen hieraus für 16 h. Figur 5 A: Zellen aus allen Proben kumuliert (n = 15), Figur 5 B: Zellen aus COPD-Patienten (n = 5), Figur 5 C: Zellen aus gesunder Alterskontrolle (n = 5), Figur 5 D: Zellen aus jungen 10 Freiwilligen (n = 5).

Die Behandlung mit Budesonid führt zu einer Abnahme der Apoptoserate von Neutrophilen. Man erkennt, dass die Vorbehandlung der Zellen mit 1 mM Ectoin den anti-apoptotischen Effekten des Budesonids signifikant vorbeugt. Der Effekt trat in sämtlichen Gruppen als auch in der Gesamtheit der Gruppen auf. Der 15 Effekt konnte bei neutrophilen Granulozyten gezeigt werden, die nicht mit pro-entzündlich wirkenden Stoffen behandelt wurden. Aber auch bei der Kombination von pro-entzündlich wirkenden Stoffen (CNP, LTB₄, GM-CSF) mit Budesonid verhinderte Ectoin die anti-apoptotische Wirkung erfolgreich.

Versuch 6

20 Der Einfluss von Ectoin in Kombination mit Budenosid auf anti-apoptotische Signale ist Figur 6 zu entnehmen. Die entsprechenden Signale über die Proteinkinase B (Akt) und Mcl-1 wurden bei ausgewählten Proben von Neutrophilen über Messung der Akt-Phosphorylierung und des Mcl-1-Proteinlevels durchgeführt, als Zellen dienten humane primäre, periphere 25 Neutrophile. Isolierung der Neutrophile durch Percoll®-Zentrifugation, die Kultivierung von 2×10^6 Neutrophilen in Gegenwart von 33 µg/ml CNP, 1 µM Budesonid, 1 mM Ectoin und Kombinationen hieraus für 6 h. Es erfolgte eine Proteinisolierung, ein Western Blot, Lumineszenz auf Röntgenfilmen an Material von jeweils 3 COPD-Patienten und 3 Personen aus der entsprechenden 30 Alterskontrolle. Das Ergebnis zeigt deutlich den anti-apoptotischen Effekt von Budesonid, das den Akt-Signalweg aktiviert und die Menge an anti-

apoptotischem Protein Mcl-1 erhöht. Ectoin ist in der Lage, diesem Effekt entgegenzuwirken, auch in der Gegenwart von CNP.

Versuch 7

Der Einfluss verschiedener weiterer Testsubstanzen auf die Apoptoserate von 5 menschlichen Neutrophilen ist in Figur 7 dargestellt. Es wurden sub-G₁-Zellen nach Propidiumiodid-Färbung (FACS-Durchflusszytometrie) gemessen. Zellen: primäre, periphere humane Neutrophile. Isolierung der Neutrophile durch Percoll®-Zentrifugation und Kultivierung von 2 x 10⁶ Neutrophilen in Gegenwart von 33 µg/ml CNP, 1 µM Budesonid, 1 mM Ectoin, 1 mM Harnstoff, 1 mM 10 Ectoinamid und Kombinationen hieraus für 16 h. Die Zellen stammen von jungen Freiwilligen (Gruppe 3), n = 5, bud = Budenosid. Zwei weitere Testsubstanzen (Harnstoff und das Ectoinamid von 2-Hydroxy-5-aminobenzoesäure) wurden auf ihre Fähigkeiten hin getestet, anti-apoptotische 15 Effekte auf Neutrophile zu unterbinden. Beide Substanzen hatten keinen Einfluss auf die Hintergrundapoptoserate. Ectoinamid war in der Lage, die Reduktion der Apoptoserate, die durch Kohlenstoffnanopartikel (CNP) mit oder ohne Budenosid hervorgerufen wurde, zu verhindern, Harnstoff hingegen nicht.

- Patentansprüche -

Patentansprüche

1. Zusammensetzung enthaltend Ectoin, Hydroxyectoin und/oder ein Salz, Ester oder Amid dieser Verbindungen zur Unterdrückung von anti-apoptotischen Signalen auf neutrophile Granulozyten, Makrophagen, eosinophile Granulozyten, basophile Granulozyten, Mastzellen, Lymphozyten, Epitheloidzellen, dendritische Zellen oder andere an Entzündungen beteiligte Zellen.
2. Zusammensetzung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Unterdrückung der anti-apoptotischen Signale bei der Behandlung oder Prävention einer Entzündung erfolgt.
3. Zusammensetzung nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei der Entzündung um eine chronische Entzündung handelt.
4. Zusammensetzung nach Anspruch 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei der Entzündung um eine Lungenentzündung, Asthma, eine chronisch obstruktive Lungenerkrankung, ARDS, zystische Fibrose, Lungenfibrose, Silikose, Sarkoidose, Allergie oder bronchiale Hyperreagibilität handelt.
5. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass die Zusammensetzung zumindest ein Corticosteroid enthält.
6. Zusammensetzung nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass das Corticostéroid ein Glucocorticoid ist.

7. Zusammensetzung nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass das Glucocorticoid Dexamethason, Budesonid, Betamethason, Triamcinolon, Fluocortolon, Methylprednisolon, Deflazacort, Prednisolon, Prednison, Cloprednol, Cortison, Hydrocortison, Fluocortin, Clocortolon, 5 Clobetasol, Alclomethason, Flumethason, Fluopredniden, Fluorandrenolon, Prednicarbat, Mometason, Methylprednisolon, Fluticasone, Halomethason, Fluocinolon, Diflorasan, Desoximethason, Fluocinonid, Fludrocortison, Deflazacort, Rimexolon, Cloprednol, Amcinonid, Halcinonid, Diflucortolon, Clobetasol oder ein Salz, Ester, Amid, Solvat oder Hydrat einer der 10 vorgenannten Verbindungen ist.

8. Zusammensetzung enthaltend Ectoin, Hydroxyectoin und/oder ein Salz, Ester oder Amid dieser Verbindungen zur Behandlung oder Prävention von Lungenerkrankungen, ausgenommen solchen, die auf die Einwirkung von Schwebstäuben zurückzuführen sind.

15 9. Zusammensetzung enthaltend Ectoin, Hydroxyectoin und/oder ein Salz, Ester oder Amid dieser Verbindungen sowie ein Corticosteroid zur Anwendung in der Prävention und/oder Behandlung von Lungenerkrankungen.

10. Zusammensetzung nach Anspruch 8 oder 9, dadurch gekennzeichnet, dass die Lungenerkrankung eine Lungenentzündung, eine 20 chronisch obstruktive Lungenerkrankung, Asthma, ARDS, zystische Fibrose, Lungenfibrose, Silikose, Sarkoidose, Allergie oder bronchiale Hyperreagibilität ist.

11. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass die Zusammensetzung eine inhalierbare 25 Zusammensetzung ist.

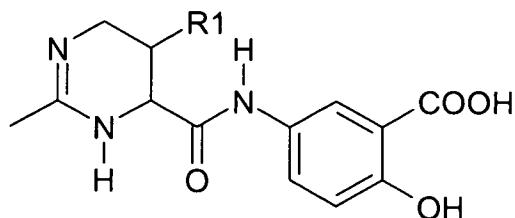
12. Kombinationspräparat aus Zusammensetzungen zur Anwendung in der Prävention und/oder Behandlung von Lungenerkrankungen, wobei die Zusammensetzungen zur zeitnahen Verabreichung vorgesehen sind, bestehend aus zumindest

16

- einer ersten Zusammensetzung enthaltend Ectoin, Hydroxyectoin und/oder ein Salz, Ester oder Amid dieser Verbindungen und
- einer zweiten Zusammensetzung enthaltend ein Corticosteroid.

13. Verbindung mit der Strukturformel

5



oder ein Salz, Ester oder Amid dieser Verbindung, mit R1 = H, OH oder OR2 mit R2 = Alkyl, Cycloalkyl oder Aryl, bevorzugt C₁ bis C₁₀-Alkyl, C₁ bis C₁₀-Cycloalkyl oder C₁ bis C₁₀-Aryl.

10 14. Zusammensetzung enthaltend eine Verbindung und/oder ein Salz, Ester oder Amid nach Anspruch 13 zur Verwendung als Arzneimittel.

15. Zusammensetzung enthaltend eine Verbindung und/oder ein Salz, Ester oder Amid nach Anspruch 13 zur Unterdrückung von anti-apoptotischen Signalen auf neutrophile Granulozyten, Makrophagen, eosinophile Granulozyten, basophile Granulozyten, Mastzellen, Lymphozyten, Epitheloidzellen, dendritische Zellen oder andere an Entzündungen beteiligte Zellen.

20

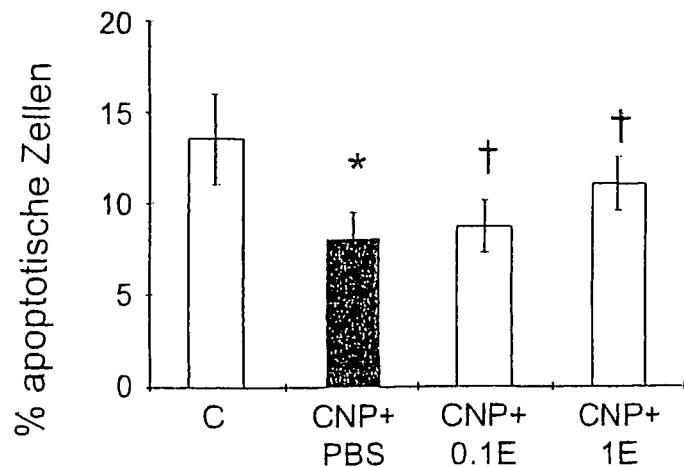


Fig. 1

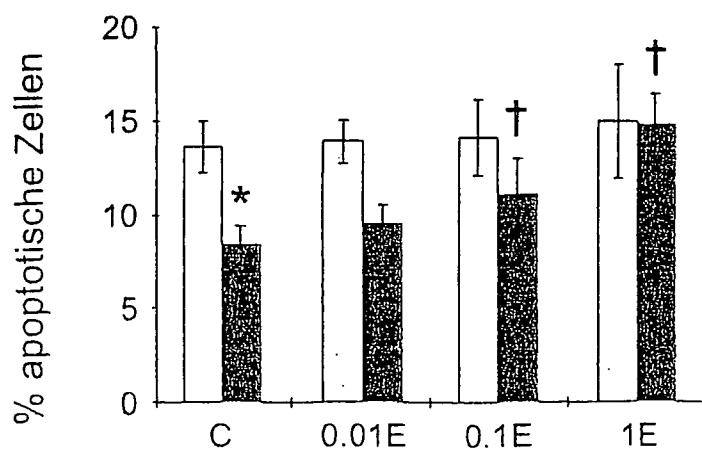


Fig. 2

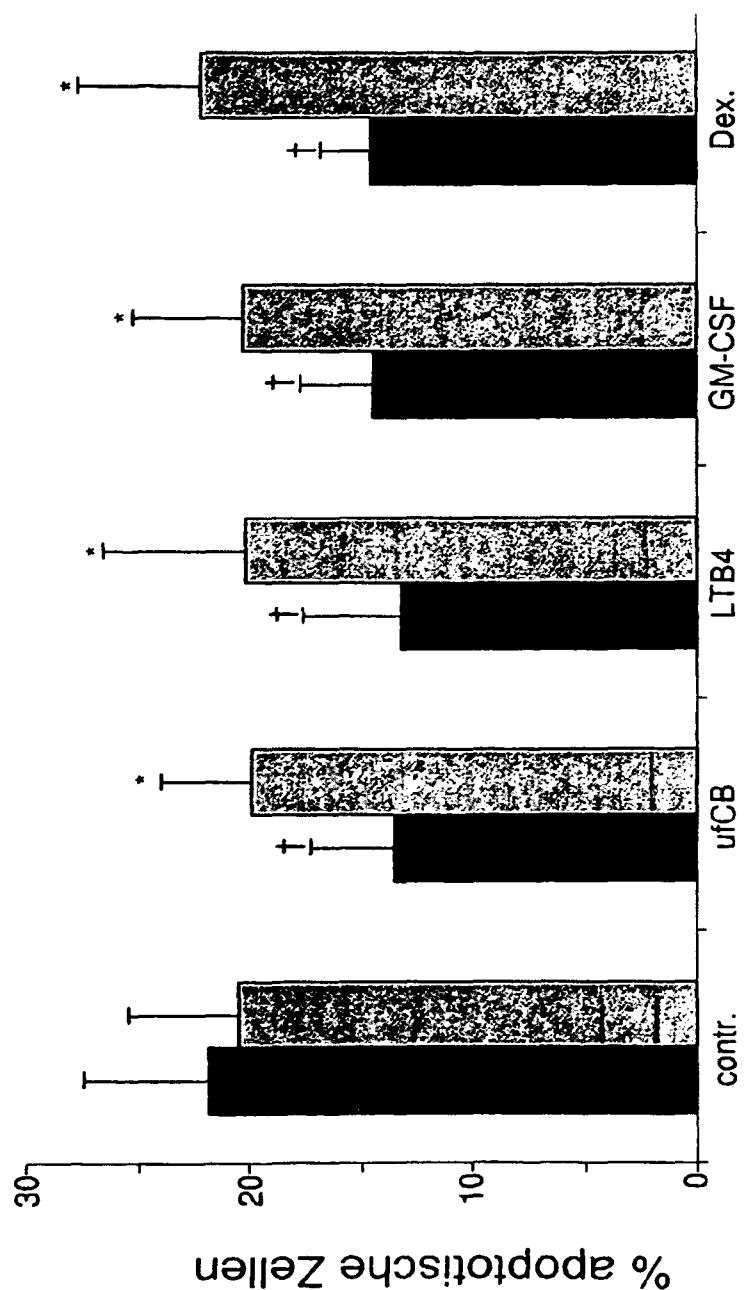


Fig. 3

Fig. 4



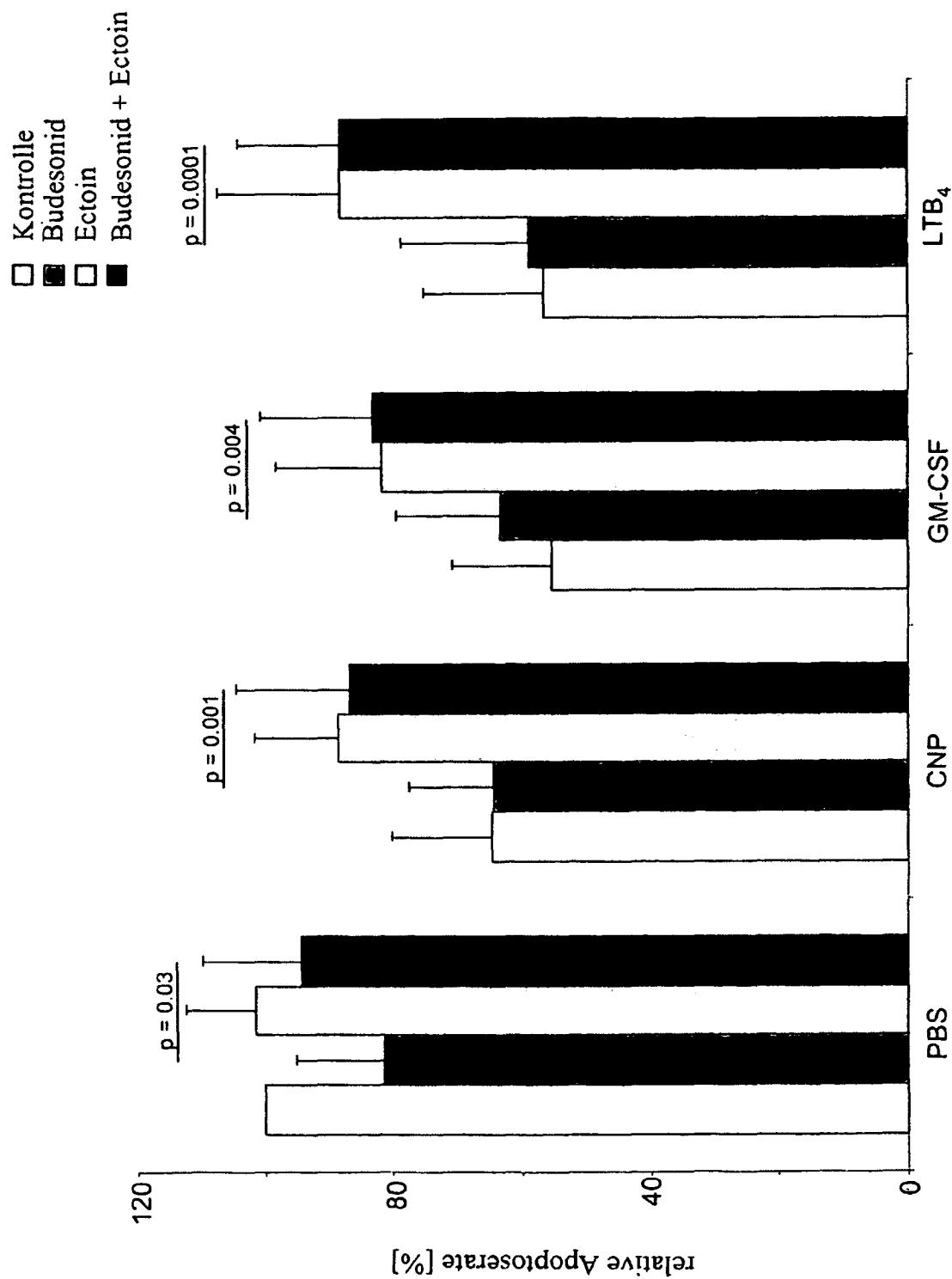


Fig. 5 A

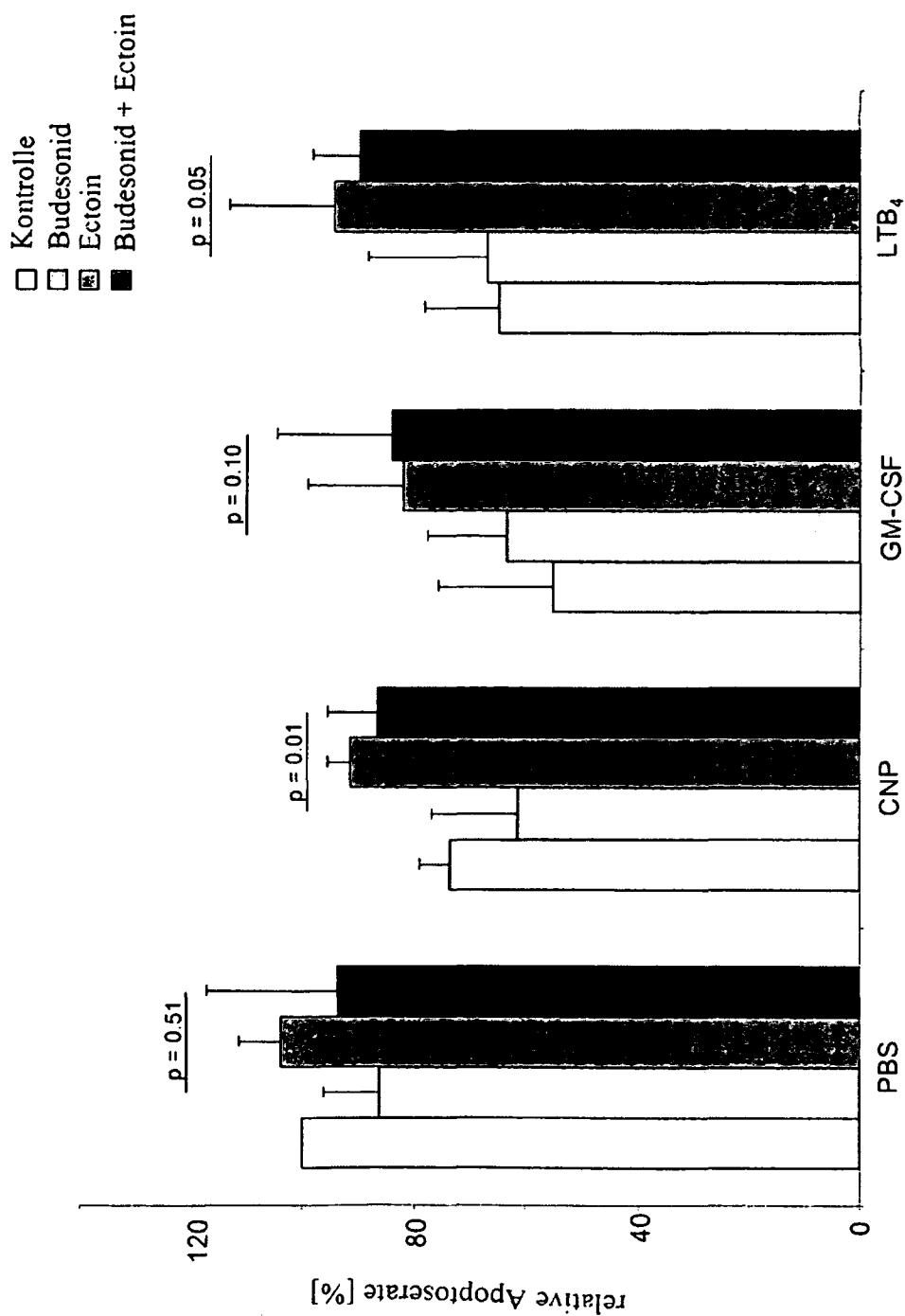


Fig. 5 B

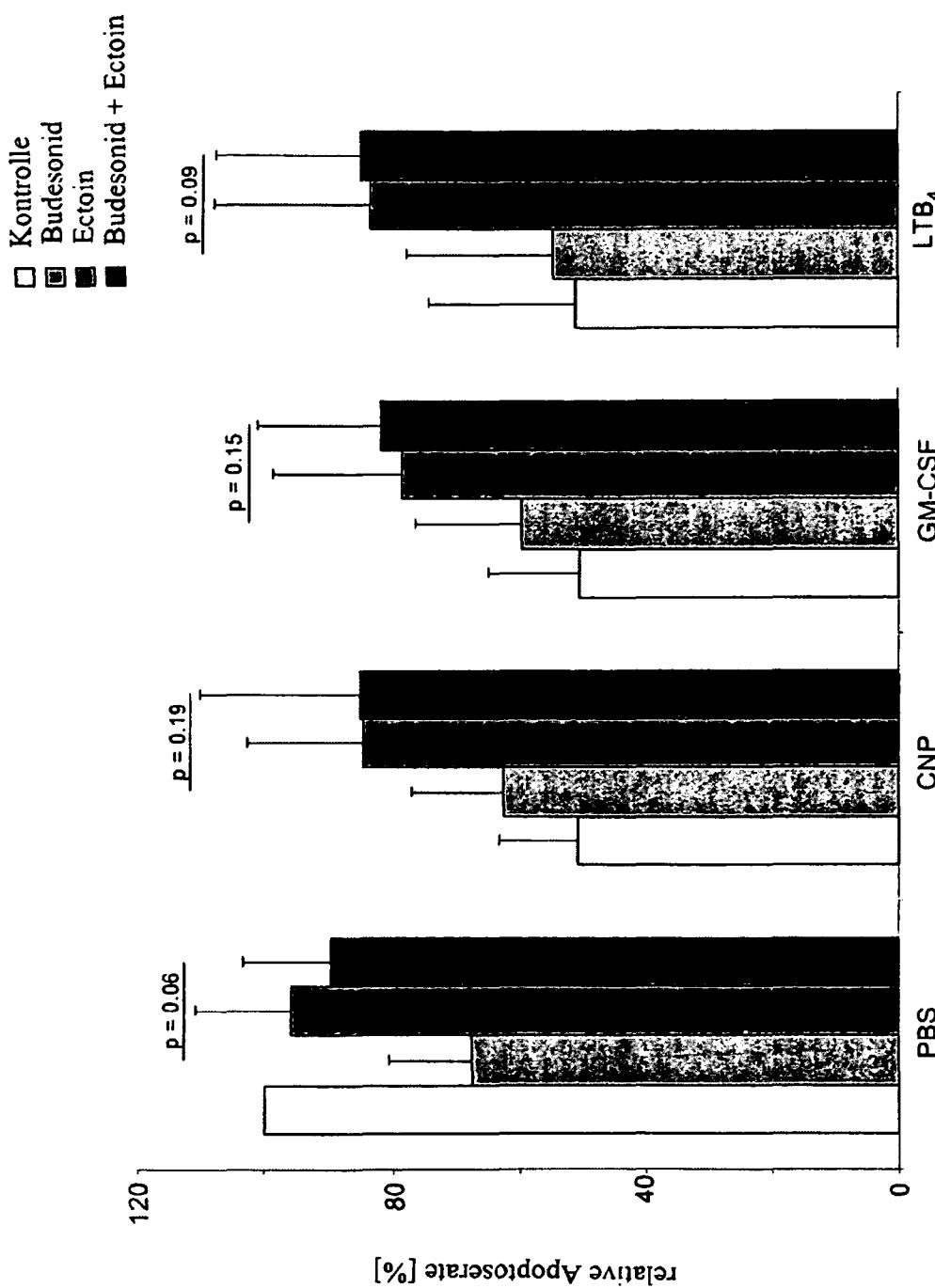


Fig. 5 C

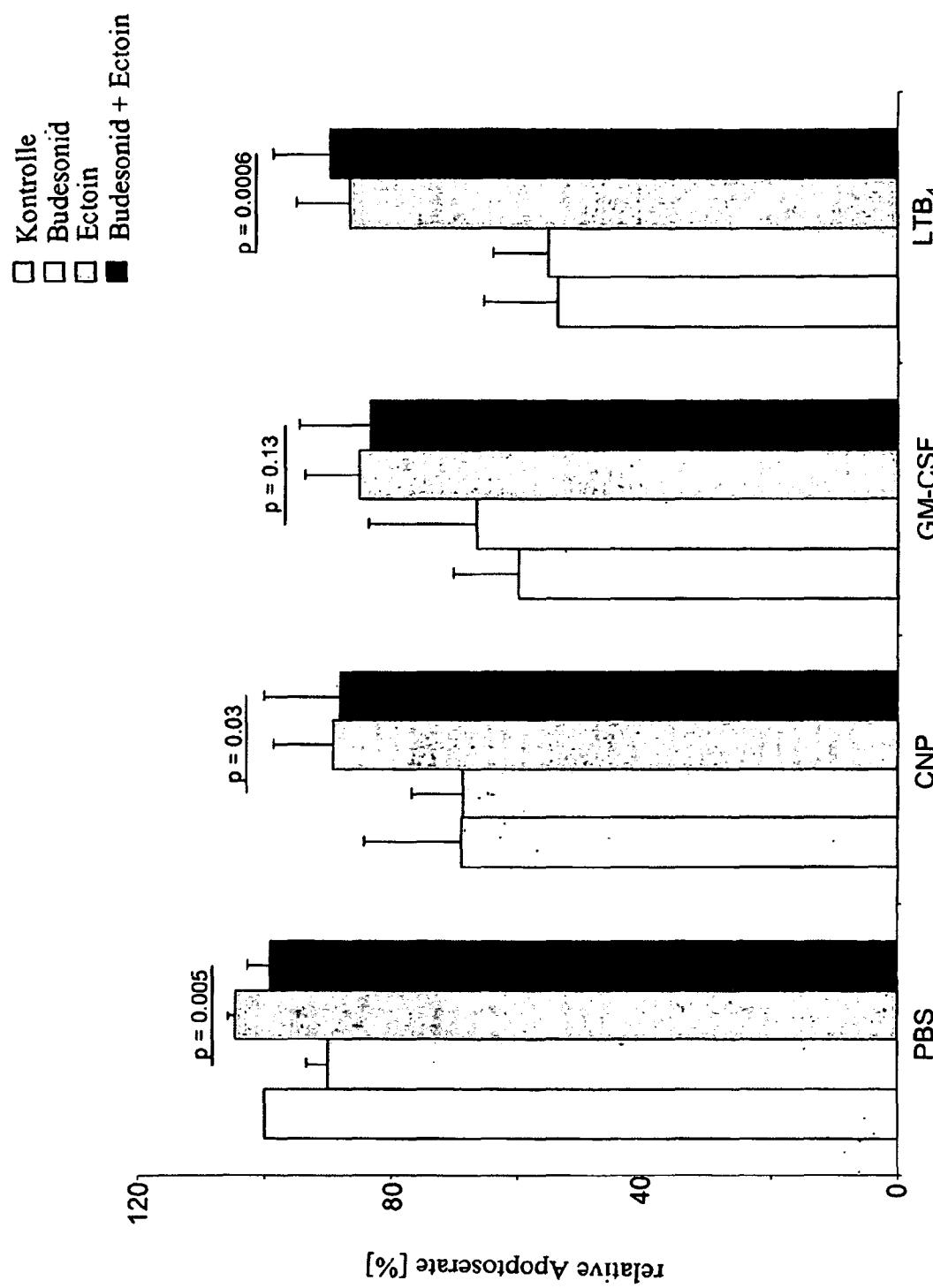


Fig. 5 D

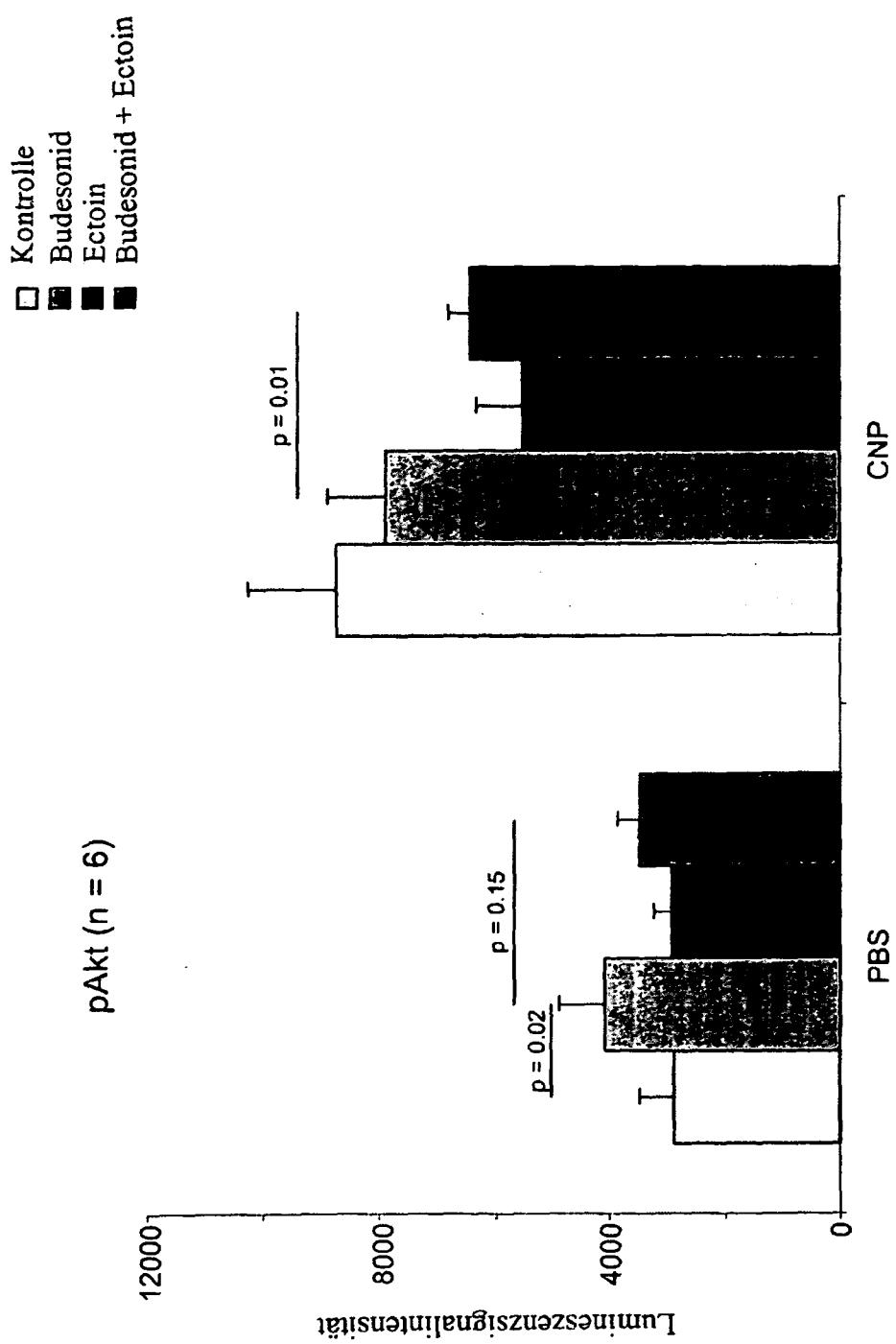


Fig. 6 A

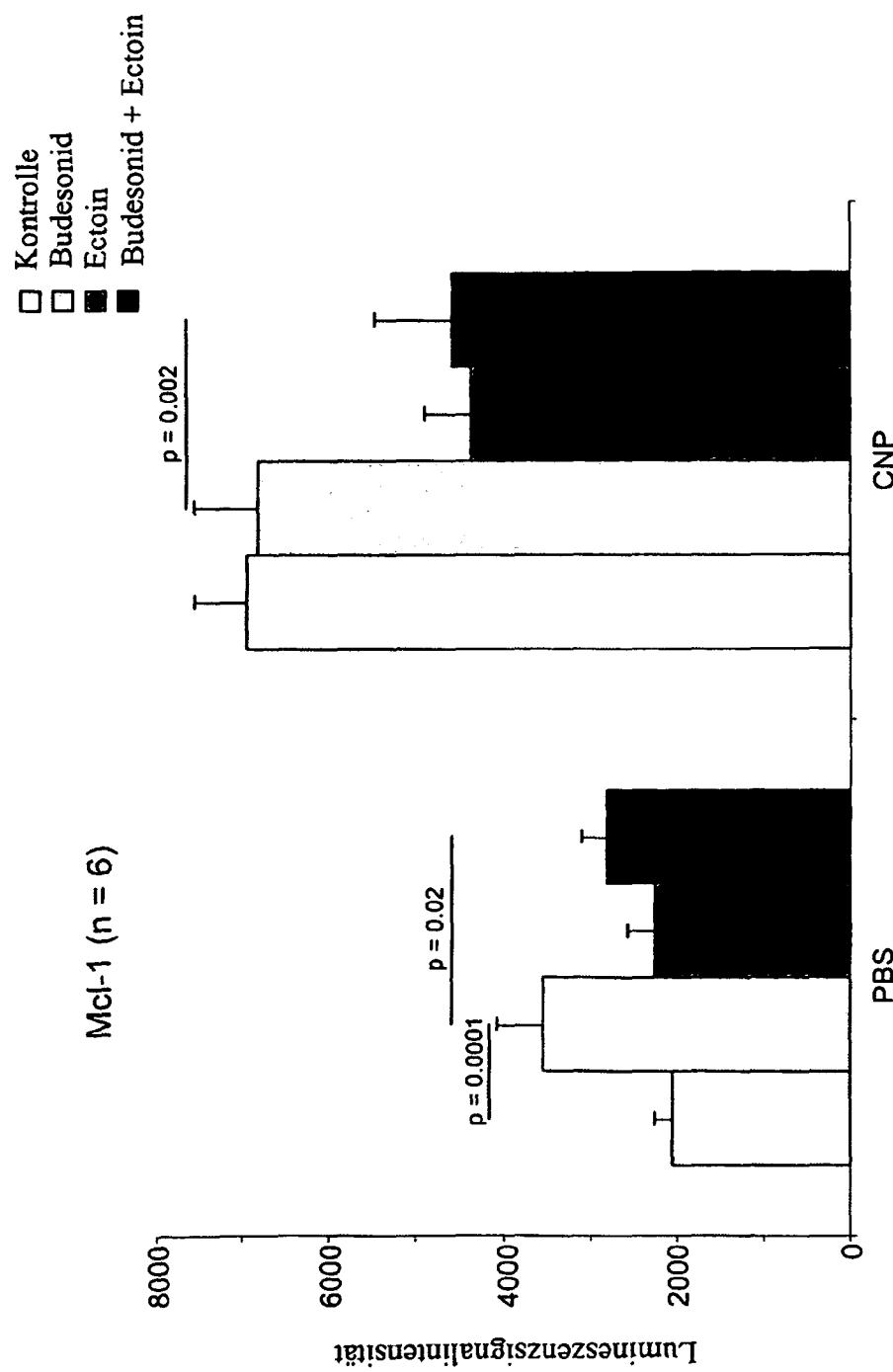


Fig. 6 B

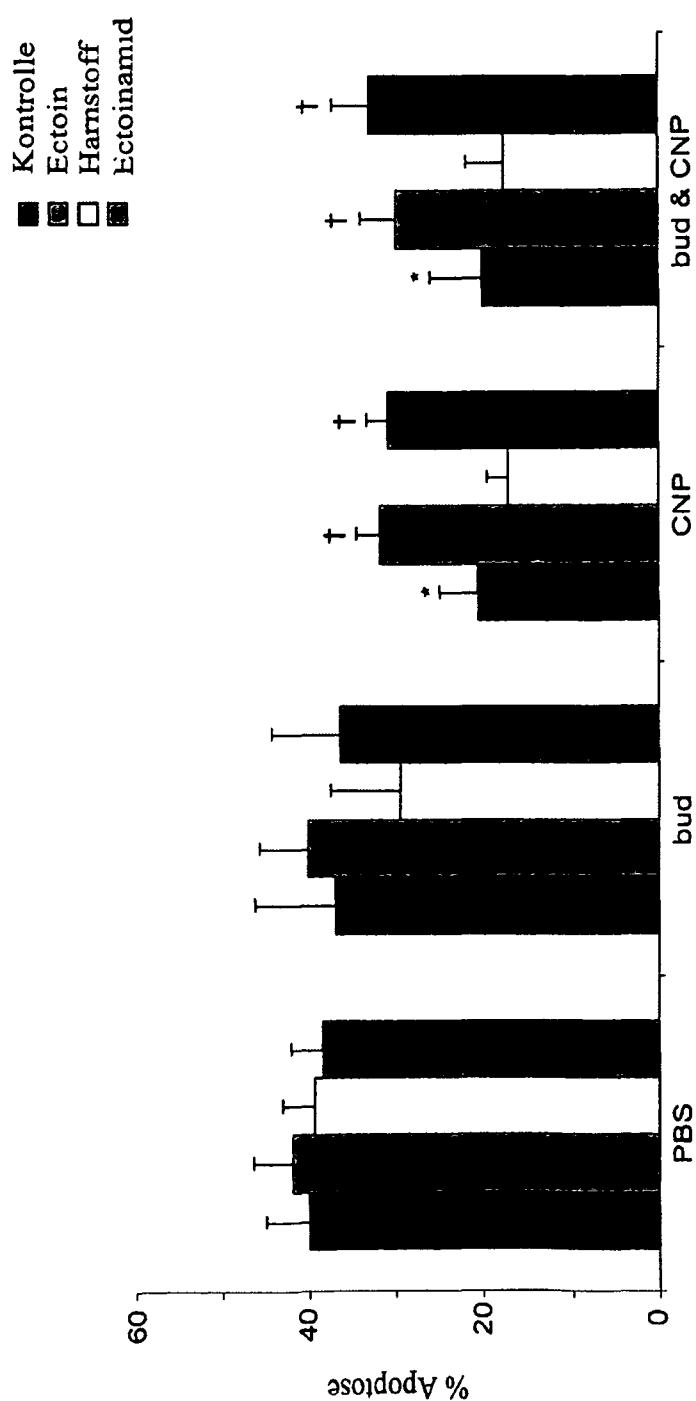


Fig. 7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2012/003757

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 INV. A61K31/505 A61K31/56 A61P11/00
 ADD.

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

B. FIELDS SEARCHED

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

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2009/027069 A2 (BITOP AG [DE]; KRUTMANN JEAN [DE]; LENTZEN GEORG [DE]; SCHWARZ THOMAS) 5 March 2009 (2009-03-05) claims 1-4,7,11 -----	1-6,8-12
Y		1-12
X	BILSTEIN A ET AL: "Therapeutic effect of ectoine in an experimental model of allergic asthma", ALLERGY (OXFORD), vol. 64, no. Suppl. 90, 2009, page 313, XP002689778, & 28TH CONGRESS OF THE EUROPEAN-ACADEMY-OF-ALLERGY-AND-CLINICAL-IMMUNOLOGY; WARSAW, POLAND; JUNE 06 -10, 2009 ISSN: 0105-4538 abstract ----- - / --	1-4,8, 10,11

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search 8 January 2013	Date of mailing of the international search report 13/02/2013
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Baurand, Petra

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2012/003757

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 00/76528 A2 (BITOP GMBH [DE]; BARTH STEFAN [DE]) 21 December 2000 (2000-12-21) claims 1,2,5 -----	1-4,8,10
X	SYDLIK U ET AL: "The compatible solute ectoine protects against nanoparticle-induced neutrophilic lung inflammation", TOXICOLOGY LETTERS,, vol. 189, 13 September 2009 (2009-09-13), page S188, XP026420513, ELSEVIER BIOMEDICAL PRESS, AMSTERDAM, NL ISSN: 0378-4274 [retrieved on 2009-07-31] abstract -----	1-4
X	DE 100 06 578 A1 (BITOP GMBH [DE] BITOP AG FUER BIOTECHNISCHE OP [DE]) 23 August 2001 (2001-08-23) claims 1,4,10 -----	1-3
Y	WO 00/36915 A1 (UNIV NORTH CAROLINA [US]; BOUCHER RICHARD C JR [US]) 29 June 2000 (2000-06-29) claims 1,2,12,15,16,18-20,22,27 -----	1-12
A	DATABASE PubChem Compound [Online] 27 March 2005 (2005-03-27), "N-Phenyl-1,4,5,6-tetrahydro-2-pyrimidinecarboxamide - Compound Summary", XP002689779, retrieved from NCBI Database accession no. 536747 (CID) the whole document -----	13-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2012/003757

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 2009027069	A2	05-03-2009	AT 514422 T AU 2008291302 A1 CA 2698135 A1 DE 102007040615 A1 EP 2200603 A2 EP 2380569 A2 ES 2370955 T3 JP 2010536904 A KR 20100075435 A US 2011053896 A1 WO 2009027069 A2	15-07-2011 05-03-2009 05-03-2009 05-03-2009 30-06-2010 26-10-2011 26-12-2011 02-12-2010 02-07-2010 03-03-2011 05-03-2009

WO 0076528	A2	21-12-2000	AT 247981 T AU 5812800 A CA 2376894 A1 EP 1183047 A2 ES 2204640 T3 JP 2003501479 A US 2004071691 A1 WO 0076528 A2	15-09-2003 02-01-2001 21-12-2000 06-03-2002 01-05-2004 14-01-2003 15-04-2004 21-12-2000

DE 10006578	A1	23-08-2001	NONE	

WO 0036915	A1	29-06-2000	AU 771984 B2 CA 2356637 A1 EP 1139746 A1 EP 2191718 A1 EP 2258183 A1 JP 2002532520 A NZ 512383 A US 2010150898 A1 WO 0036915 A1	08-04-2004 29-06-2000 10-10-2001 02-06-2010 08-12-2010 02-10-2002 30-05-2003 17-06-2010 29-06-2000

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2012/003757

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
 INV. A61K31/505 A61K31/56 A61P11/00
 ADD.

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

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
A61K

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

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 2009/027069 A2 (BITOP AG [DE]; KRUTMANN JEAN [DE]; LENTZEN GEORG [DE]; SCHWARZ THOMAS) 5. März 2009 (2009-03-05) Ansprüche 1-4,7,11	1-6,8-12
Y	-----	1-12
X	BILSTEIN A ET AL: "Therapeutic effect of ectoine in an experimental model of allergic asthma", ALLERGY (OXFORD), Bd. 64, Nr. Suppl. 90, 2009, Seite 313, XP002689778, & 28TH CONGRESS OF THE EUROPEAN-ACADEMY-OF-ALLERGY-AND-CLINICAL-IMMUNOLOGY; WARSAW, POLAND; JUNE 06 -10, 2009 ISSN: 0105-4538 Zusammenfassung	1-4,8, 10,11
	----- - / --	



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" frühere Anmeldung oder Patent, die bzw. das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

8. Januar 2013

13/02/2013

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
 Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Baurand, Petra

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2012/003757

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 00/76528 A2 (BITOP GMBH [DE]; BARTH STEFAN [DE]) 21. Dezember 2000 (2000-12-21) Ansprüche 1,2,5 -----	1-4,8,10
X	SYDLIK U ET AL: "The compatible solute ectoine protects against nanoparticle-induced neutrophilic lung inflammation", TOXICOLOGY LETTERS,, Bd. 189, 13. September 2009 (2009-09-13), Seite S188, XP026420513, ELSEVIER BIOMEDICAL PRESS, AMSTERDAM, NL ISSN: 0378-4274 [gefunden am 2009-07-31] Zusammenfassung -----	1-4
X	DE 100 06 578 A1 (BITOP GMBH [DE] BITOP AG FUER BIOTECHNISCHE OP [DE]) 23. August 2001 (2001-08-23) Ansprüche 1,4,10 -----	1-3
Y	WO 00/36915 A1 (UNIV NORTH CAROLINA [US]; BOUCHER RICHARD C JR [US]) 29. Juni 2000 (2000-06-29) Ansprüche 1,2,12,15,16,18-20,22,27 -----	1-12
A	DATABASE PubChem Compound [Online] 27. März 2005 (2005-03-27), "N-Phenyl-1,4,5,6-tetrahydro-2-pyrimidinecarboxamide - Compound Summary", XP002689779, gefunden im NCBI Database accession no. 536747 (CID) das ganze Dokument -----	13-15

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2012/003757

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO 2009027069	A2	05-03-2009	AT 514422 T AU 2008291302 A1 CA 2698135 A1 DE 102007040615 A1 EP 2200603 A2 EP 2380569 A2 ES 2370955 T3 JP 2010536904 A KR 20100075435 A US 2011053896 A1 WO 2009027069 A2		15-07-2011 05-03-2009 05-03-2009 05-03-2009 30-06-2010 26-10-2011 26-12-2011 02-12-2010 02-07-2010 03-03-2011 05-03-2009
WO 0076528	A2	21-12-2000	AT 247981 T AU 5812800 A CA 2376894 A1 EP 1183047 A2 ES 2204640 T3 JP 2003501479 A US 2004071691 A1 WO 0076528 A2		15-09-2003 02-01-2001 21-12-2000 06-03-2002 01-05-2004 14-01-2003 15-04-2004 21-12-2000
DE 10006578	A1	23-08-2001	KEINE		
WO 0036915	A1	29-06-2000	AU 771984 B2 CA 2356637 A1 EP 1139746 A1 EP 2191718 A1 EP 2258183 A1 JP 2002532520 A NZ 512383 A US 2010150898 A1 WO 0036915 A1		08-04-2004 29-06-2000 10-10-2001 02-06-2010 08-12-2010 02-10-2002 30-05-2003 17-06-2010 29-06-2000