

(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
29. Januar 2009 (29.01.2009)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2009/012741 A1

(51) Internationale Patentklassifikation:

C07C 231/02 (2006.01) A61K 31/166 (2006.01)
C07C 237/26 (2006.01) A61P 25/00 (2006.01)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE2008/001055

(22) Internationales Anmeldedatum:

25. Juni 2008 (25.06.2008)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:

10 2007 034 259.6 20. Juli 2007 (20.07.2007) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): OTTO-VON-GUERICKE UNIVERSITÄT
MAGDEBURG MEDIZINISCHE FAKULTÄT
[DE/DE]; Leipziger Strasse 44, 39120 Magdeburg (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): LORENZ, Peter
[DE/DE]; Langer Schlag 4, 39128 Magdeburg (DE).
KREUTZMANN, Peter [DE/DE]; Am Schraderhof
35, 39116 Magdeburg (DE). ROTHE, Fritz [DE/DE];
Salvador Allende Strasse 18, 39126 Magdeburg (DE).
MARTENS-LOBENHOFFER, Jens [DE/DE]; Sedel-
mannsbusch 2, 22339 Hamburg (DE). SCHMIDT, Harry
[DE/DE]; Ulmenstrasse 8, 06120 Lieskau (DE). WOLF,

Gerald [DE/DE]; Schrotebogen 12, 39126 Magdeburg
(DE).

(74) Anwalt: DONATH, Dirk; Bock Bieber Donath, Part-
nerschaftsgesellschaft, Hans-Knöll-Strasse 1, 07745 Jena
(DE).

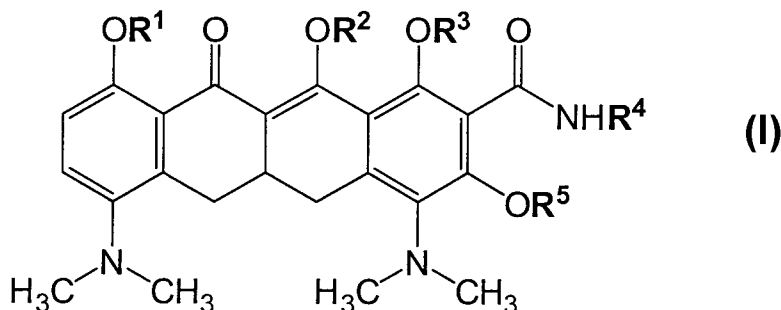
(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL,
AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY,
BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN,
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, 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, PG,
PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM,
SV, SY, 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, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG,
ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU,
TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,
EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV,
MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF,
BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN,
TD, TG).

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: METHOD FOR THE SYNTHESIS OF A-RING AROMATIZED ACETYL MINOCYCLINES

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR SYNTHESE VON A-RING-AROMATISIERTEN ACETYL-MINOCYCLINEN



(57) Abstract: The invention relates to a method for the production of A-ring aromatized acetyl minocyclines. The aim of the invention to provide a less complex method for the production of A-ring aromatized acetyl minocyclines of the formula (I), wherein R¹ to R⁵ = acetyl and/or H, which can also be used on an industrial scale, is achieved in that minocycline hydrochloride is reacted with acetanhydride in the presence of a proton catcher, the reaction

product is subjected to chromatographic filtration using a carrier material and an eluant, the eluant is distilled off, and the product is subsequently cleaned by recrystallization.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von A-Ring-aromatisierten Acetyl-Minocyclinen. Die Aufgabe der Erfindung, ein aufwandgeringeres Verfahren zur Herstellung von A-Ring-aromatisierten Acetyl-Minocyclinen der Formel (I), wobei R¹ bis R⁵ = Acetyl und/oder H sind, bereitzustellen, das auch in industriellem Maßstab durchführbar ist, wird dadurch gelöst, dass Minocyclinhydrochlorid mit Acetanhydrid in Gegenwart eines Protonenfängers umgesetzt, das Reaktionsprodukt einer chromatographischen Aufreinigung unter Verwendung eines Trägermaterials und eines Eluenten unterworfen, der Eluent abdestilliert und das Produkt anschließend durch Umkristallisation gereinigt wird.

WO 2009/012741 A1



Veröffentlicht:

— *mit internationalem Recherchenbericht*

Verfahren zur Synthese von A-Ring-aromatisierten Acetyl-Minocyclinen

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Synthese von A-Ring-aromatisierten Acetyl-Minocyclinen.

Minocyclin (siehe Formel III) ist ein semisynthetisches Breitband-Antibiotikum aus der Gruppe der Tetracycline, welches seit vielen Jahren in der klinischen Praxis zur Behandlung von infektiösen Erkrankungen der Atemwege, des Urogenital- und Gastrointestinaltraktes, bei verschiedenen Hauterkrankungen, wie Akne vulgaris, Rosacea, sowie bei Trachom, Chlamydien-Conjunctivitis, Borreliose u.a. eingesetzt wird.

Minocyclin hemmt die Proteinbiosynthese durch Bindung an die ribosomale 30S-Untereinheit, wodurch der Zugang von Aminoacyl-t-RNS zum RNS-Ribosomen-Komplex und damit die Verlängerung der Peptidkette verhindert wird.

Neben der bereits bekannten antibiotischen Wirkung von Minocyclin rückte kürzlich ein anderer biologischer Effekt der Substanz in den Blickpunkt der Forschung. Erste Untersuchungen zeigen, dass Minocyclin offenbar einen schützenden Effekt bei verschiedenen Entzündungsprozessen und neurodegenerativen Erkrankungen hat (Yong, V.W., Wells, J., Giuliani, F., Casha, S., Power, C., and Metz, L.M. (2004). The promise of minocycline in neurology. *Lancet Neurol* 3, 744-751).

So wird Minocyclin gegenwärtig zur klinischen Behandlung fortschreitender Entzündungsprozesse, wie z.B. inflammatorischer rheumatoider Arthritis vorgeschlagen (Furst, D.E. (1998). Update on clinical trials in the rheumatic diseases. *Curr Opin Rheumatol* 10, 123-128). Entzündungsprozesse spielen eine große Rolle in der Pathogenese von neurodegenerativen Erkrankungen, wie der Alzheimer-Krankheit, Parkinson-Krankheit, Multipler Sklerose sowie bei posttraumatischen Hirn- und Rückenmarksverletzungen.

Die Schrift DE 38 81 024 T2 offenbart ein Verfahren zur Herstellung von Tetracyclinderivaten, wie bspw. Minocyclin, dass mehrstufig ist, unter dem Einsatz von Katalysatoren auf einem Träger unter Verwendung von organischem Lösungsmittel und Druck abläuft, wobei
5 lediglich die Enthalogenierung und Hydrierung in einem Schritt durchgeführt werden.

Der Nachteil dieses Herstellungsverfahrens ist, dass es aufwendig und damit sehr kostenintensiv ist. Darüber hinaus werden bei dem Verfahren u.a. selenhaltige Legierungen als Katalysator eingesetzt.

10 Die Schrift WO 2005/070878 offenbart A-Ring-aromatisierte Tetracyclinderivate und ein Verfahren zu deren Herstellung.

Die Herstellung von A-Ring-aromatisierten Tetracyclinen, wie sie in dieser Offenlegung beschrieben ist, gelingt prinzipiell, setzt jedoch
15 mehrere Reaktionsstufen und eine aufwendige Reinigung der Reaktionsprodukte durch präparative HPLC voraus, welche für eine industrielle und somit rentable Gewinnung der Wirkstoffe, z.B. im Gramm- oder Kilogramm-Maßstab, ungeeignet ist.

20 Aufgrund der gefundenen biologischen und pharmakologischen Wirkungen ist die Verwendung von Minocyclin zur Behandlung neurodegenerativer Erkrankungen sehr interessant. Die Untersuchung von Minocyclin als Leitstruktur stellt dabei einen attraktiven Ansatz bei der Suche nach neuroprotektiven Wirkstoffen dar.

25 Eine Optimierung und Verbesserung der Minocyclin-Leitstruktur ist dabei in zwei Richtungen möglich:

1. Verbesserung der Pharmakokinetik, z.B. durch Realisierung eines
30 'Prodrug'-Konzeptes.

2. Aufhebung der antibiotischen Aktivität, wenn diese für die Wirkung als neuroprotektive Substanz nicht relevant ist, um einen Selektionsdruck auf Mikroorganismen in Richtung einer
35 Resistenzentwicklung auszuschließen.

Das 'Prodrug'-Konzept ist dem Fachmann als Methode bekannt, um hydrophile Wirkstoffmoleküle chemisch so zu verändern, dass sich zum einen ihre Lipophilie und damit die Aufnahmefähigkeit durch Membranen erhöht, zum anderen die eigentlichen Wirkstoffmoleküle erst aus einer Vorstufe ('Prodrug') in den Zellen gebildet werden. Hierbei dient die Vorstufe ('Prodrug') u.a. als Transporter ('Carrier').

Eine 'Prodrug' ist per Definition ein Stoff bzw. ein Medikament, das ohne Verstoffwechselung pharmakologisch nicht oder wenig wirksam ist und erst durch die Verstoffwechselung im Körper in einen aktiven Wirkstoff überführt wird. 'Prodrugs' sind in denjenigen Fällen von strategischer Bedeutung, in denen der eigentliche Wirkstoff nur geringfügig und wenig selektiv den Wirkort erreicht.

Das 'Prodrug'-Konzept zielt dabei auf eine Verbesserung der pharmakokinetischen Eigenschaften der Wirkstoffmoleküle ab, um z.B. deren Resorbierbarkeit/Bioverfügbarkeit zu verbessern oder bei einem Psychopharmakon bzw. Neuroprotektivum die Blut-Hirn-Schranken-Gängigkeit zu ermöglichen.

Hydrophile Wirkstoffmoleküle, wie Minocyclin besitzen aufgrund von freien Hydroxyl(OH)- bzw. Amino(NH₂)-Gruppen oftmals zwar eine gute Wasserlöslichkeit, was ihre pharmazeutische Formulierbarkeit begünstigt, sind aber relativ schlecht membrangängig.

Eine Möglichkeit der Senkung ihrer Polarität ist die Einführung von apolaren Schutzgruppen. Als apolare Schutzgruppe (engl. 'prodrug moiety') hat sich die Acetyl-Gruppe (CH₃CO) bewährt, die nach Abspaltung in den Zellen freie Essigsäure bildet, welche einen natürlichen Metaboliten des Zellstoffwechsels darstellt. Sowohl OH- als auch NH₂-Gruppen lassen sich durch Acetyl-Gruppen maskieren. Die Polarität der acetylierten Moleküle ist ähnlich der biologischen Membranen, wobei eine stärkere Wechselwirkung mit Lipiden und somit erhöhte Diffusion in das Gewebe erreicht wird ('Carrier'-Effekt). Nach Aufnahme der acetylierten 'Prodrug' in die Zellen werden die Acetyl-Gruppen durch unspezifische Esterasen abgespalten, wodurch das eigentliche Wirkstoffmolekül endogen freigesetzt wird und hier in Aktion treten kann.

Die 'Prodrug' stellt außerdem eine Retardform des Wirkstoffmoleküls dar, die eine verzögerte Freisetzung und ein günstigeres pharmakologisches Verhalten impliziert.

In der Literatur sind bisher nur wenige vom Minocyclin abgeleitete neuroprotektive Wirkstoffmoleküle beschrieben, die zwar den Naturstoff zum Vorbild haben, mit denen jedoch bisher kein 'Prodrug'-Konzept verfolgt wird [Wang, R., Du, Y., and Liu, Zhou, Z., Wang, H., Wang, X., (J. (2004). Synthesis and neuroprotective activity of novel C4, C7 derivatives in tetracycline series. *J Chin Pharm Sci* 13, 217-220].

Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, die Nachteile des Standes der Technik zu vermeiden, in dem ein aufwandgeringes Verfahren zur Herstellung von A-Ring-aromatisierten Acetyl-Minocyclinen der Formel I bereitgestellt wird, das auch in industriellem Maßstab durchführbar ist.

Hierzu wird erfindungsgemäß vorgeschlagen, eine Ein- oder Mehrfach-Acetylierung der Leitstruktur unter gleichzeitiger Wasserabspaltung und Aromatisierung des A-Ringes in einem Schritt durchzuführen, um zu einem neuroprotektiven Wirkstoff zu gelangen.

Dabei zeigt sich überraschenderweise, dass durch eine Einstufen-Reaktion von Minocyclinhydrochlorid mit Essigsäureanhydrid (Acetanhydrid) in Gegenwart eines organischen Protonenfängers A-Ring-aromatisierte ein- oder mehrfachacetylierte Minocycline der Formel I (wobei R^1 bis R^5 = Acetyl und / oder H sind) durch Acetylierung von Minocyclinhydrochlorid, die präparative chromatographische Aufreinigung bzw. Trennung der Reaktionsprodukte und die anschließende weiterführende Reinigung durch Umkristallisation der entsprechenden Produkte aus einem Ethylacetat / Petroleumbenzin-Gemisch erhalten werden.

Solche A-Ring-aromatisierten Acetyl-Minocycline der Formel I (mit R^1 bis R^5 = Acetyl und/oder H) setzen nach Verstoffwechselung im Organismus A-Ring-aromatisiertes Minocyclin der Formel I (mit R^1 bis

$R^5 = H$) frei, welches eine zell- bzw. neuroprotektive, jedoch keine antibiotische Wirkung mehr aufweist.

Die Herstellung von ein- oder mehrfachacetylierten A-Ring-aromatisierten Minocyclinen der Formel I (wobei R^1 bis $R^5 = \text{Acetyl}$ und / oder H sind) erfolgt durch die Reaktion von Minocyclinhydrochlorid mit Acetanhydrid in Gegenwart eines organischen Protonenfängers. Dabei wird vorzugsweise ein äquimolarer Überschuss an Acetanhydrid bzw. organischem Protonenfänger verwendet, wobei diese gleichzeitig Lösungsmittel für das Minocyclinhydrochlorid sind.

Genauso können aber auch äquimolare Mengen der Edukte, entsprechend der Anzahl einzuführender Acetyl-Gruppen eingesetzt werden, wobei verminderte Mengen an Acetanhydrid und Protonenfänger gegebenenfalls durch ein inertes Lösungsmittel zu ersetzen sind. Geeignete inerte Lösungsmittel für die Edukte sind beispielsweise Chloroform, Methylenchlorid, Nitromethan, Acetonitril, Aceton, Sulfolan, Dimethylformamid oder Dimethylsulfoxid.

Als organischer Protonenfänger wird bevorzugt Pyridin verwendet, wobei man die Reaktion in einem Temperaturbereich von 4 bis 100 °C, besonders bevorzugt bei 75 °C bzw. unterhalb der Siedetemperatur des Reaktionsgemisches ablaufen lässt.

Anstelle von Pyridin können auch andere Protonenfänger wie beispielsweise primäre, sekundäre oder tertiäre Amine bzw. Carbonsäureamide verwendet werden.

Die Umsetzung wird üblicherweise bei Normaldruck unter Rühren der Reaktionsmischung durchgeführt. Dabei verwendet man eine Glas-Reaktionsappartur mit Rückflusskühler, wobei entstehende Lösungsmitteldämpfe kondensiert und kontinuierlich in die Reaktionsmischung zurückgeführt werden.

Das erfindungsgemäße Verfahren kann jedoch auch unter verminderten oder erhöhten Druck durchgeführt werden. Die Anwendung von erhöhtem Druck ist insbesondere dann angezeigt, wenn man die

Reaktion bei einer Temperatur durchführen will, bei der das Lösungsmittel unter Normaldruck siedet.

Überraschenderweise können mittels des erfindungsgemäßen Verfahrens
5 in einem Reaktionsschritt die beiden neuartigen Substanzen
Pentaacetylcyclin (A-Ring-aromatisiertes Pentaacetyl-Minocyclin) und
Tetraacetylcyclin (A-Ring-aromatisiertes Tetraacetyl-Minocyclin)
gewonnen werden, welche bisher nicht publiziert sind.
Abbildung 1 zeigt beispielhaft das LC(HPLC)-Chromatogramm und die
10 korrespondierenden Massenspektren der zwei Hauptkomponenten eines
Reaktionsgemisches nach Einsatz von überschüssigem Acetanhydrid. Es
ist die hohe Selektivität der Reaktion für das pentaacetylierte Produkt
(Formel II und Abbildung 1B) erkennbar. Durch Optimierung der
Reaktionsbedingungen kann die Selektivität für das entsprechende
15 Zielprodukt noch weiter erhöht werden, wodurch sich nachfolgend
beschriebene Reinigungsschritte vereinfachen bzw. erübrigen.

In dem hier beschriebenen erfindungsgemäßen Verfahren wird nach
Ablauf der Reaktionszeit eine chromatographische Trennung bzw.
20 Reinigung der Produkte mit Hilfe der VLC (Vakuum-
Flüssigkeitschromatographie) durchgeführt.

Die VLC-Methode kann, je nach technischer Ausführung, auch im
industriellen Maßstab durchgeführt werden. Dazu wird das
Reaktionsgemisch vorzugsweise auf ein mit Petroleumbenzin
25 (Siedebereich: 40 – 60 °C) oder einem anderen Kohlenwasserstoff, wie
n-Pentan, *n*-Hexan, Cyclohexan oder Isobutan vorkonditioniertes
Trägermaterial gegeben, welches sich in einem Büchner-Trichter mit
Frittenboden, einer Chromatographie-Säule oder einem Hängegefäß mit
Siebboden befindet. Durch Vakuum-Zug (VLC) oder mit Hilfe von
30 Überdruck wird der Eluent nun durch das Trägermaterial (stationäre
Phase) geleitet.

Die Elution der Zielverbindungen erfolgt anschließend durch Aufgabe
eines Lösungsmittel-Gradientengemisches, bestehend aus einem
Kohlenwasserstoff und einem Carbonsäureester, wobei man die Polarität
35 des Gemisches durch höhere Anteile des Carbonsäureesters während der
Elution steigert.

In dem hier vorgestellten erfindungsgemäßen Verfahren wird zur Elution der Zielverbindungen besonders bevorzugt ein Gemisch aus Petroleumbenzin und Ethylacetat verwendet. Es ist jedoch auch möglich, dass anstelle dessen Eluenten-Gemische von Kohlenwasserstoffen mit
5 anderen Carbonsäureestern, wie Methylformiat, *n*-Butylacetat oder Dimethylcarbonat, verwendet werden können.

Als Trägermaterial (stationäre Phase) werden Kieselgel (z.B. Kieselgel 60), Aluminiumoxid, 'reversed phase'-Kieselgel oder Sephadex verwendet.

10 Nach Abtrennung entsprechender Fraktionen, welche die angereicherten Zielverbindungen enthalten, wird der Eluent unter vermindertem Druck durch Verwendung eines Rotationsverdampfers abdestilliert und der Rückstand aus einem der vorstehend genannten Lösungsmittel-Gemische umkristallisiert.

15 Zur Umkristallisation wird im erfindungsgemäßen Verfahren die entsprechende Zielverbindung zunächst unter leichtem Erwärmen in Ethylacetat gelöst und dann durch Zusatz von Petroleumbenzin, somit durch Verminderung des Löslichkeitsproduktes, eine Kristallisation eingeleitet.

20 Nach vollständiger Kristallisation, wobei man die Mischung für einige Stunden auf 4 °C kühlt, filtriert man die Zielverbindung mit Hilfe einer Filternutsche ab und entfernt Lösungsmittelreste durch Trocknung im Vakuum.

Die hier im Folgenden beispielhaft aufgeführten, mittels des
25 erfindungsgemäßen Verfahrens hergestellten neuartigen Substanzen Pentaacetylcyclin (A-Ring-aromatisiertes Pentaacetyl-Minocyclin der Formel II) und Tetraacetylcyclin (A-Ring-aromatisiertes Tetraacetyl-Minocyclin der Formel IV) wurden durch Massenspektroskopie (LC/MS, HR/MS), UV/VIS-Spektroskopie sowie durch ¹H- und ¹³C-
30 NMR charakterisiert.

So zeigt Abbildung 2 beispielhaft die UV/VIS-Spektren beider vorstehend genannter Substanzen und Abbildung 3 das ¹H-NMR von Tetraacetylcyclin der Formel IV.

Die Prüfung der zellschützenden Eigenschaften der durch das
35 erfindungsgemäße Verfahren dargestellten Substanzen erfolgte, beispielhaft an rein dargestelltem Pentaacetylcyclin der Formel II, mit

Hilfe eines Astrozytenschädigungsmodells. Dieses Modell dient der Untersuchung durch oxidativen Stress vermittelter neurodegenerativer Erkrankungen bzw. zur Testung von zellschützenden Substanzen, mit denen eine solche Schädigung verhindert bzw. verringert werden kann.

5 In dem beispielhaft verwendeten Modell werden Astrozyten mit Hilfe von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) geschädigt und anschließend die Funktionalität und Morphologie der Zellen und Mitochondrien mikroskopisch beurteilt. Eine Überproduktion von H_2O_2 , als reaktive Sauerstoffspezies (ROS), gilt im ZNS u.a. als Auslöser vieler

10 neurodegenerativer Prozesse und Erkrankungen, wie Schlaganfall, Alzheimer-Krankheit, Parkinson-Krankheit, post-traumatischen Hirn- und Spinalverletzungen. Erstaunlicherweise vermochte Pentaacetylcyclin der Formel II gegenüber der Vergleichssubstanz Minocyclinhydrochlorid bereits in viel niedrigerer Dosierung die Schädigung der

15 Mitochondrien deutlich zu vermindern (Beispiel 3 und Abbildung 4). Dieser Befund ist überraschend und zeigt die herausragenden Wirkeigenschaften der beispielhaft getesteten Substanz.

Die Überprüfung der antibiotischen Aktivität des durch das

20 erfindungsgemäße Verfahren gewonnenen Pentaacetylcyclins erfolgte unter Verwendung eines *E. coli*-Stammes (Beispiel 4). Pentaacetylcyclin weist im Vergleich zum Minocyclinhydrochlorid keine antibiotische Wirkung mehr auf, womit überraschenderweise ein weiterer angestrebter biologischer Effekt erreicht wurde.

25 Die Erfindung wird nachstehend an Hand der folgenden Ausführungsbeispiele und Abbildungen näher erläutert.

Abb. 1: Chromatogramm einer LC/MS-Analyse des

30 erfindungsgemäßen Reaktionsgemisches vor der Aufreinigung, wobei

(A) – Analytisches LC-Chromatogramm des Reaktionsgemisches,

(B) – Massenspektrum des Pentaacetylcyclins (Analyse des

35 Peak bei 11,69 min) und

(C) – Massenspektrum des Tetraacetylcyclins (Analyse des Peak bei 12,37 min) bedeuten,

Abb. 2: UV/VIS-Spektren von Pentaacetylcyclin (A) und Tetraacetylcyclin (B), hergestellt gemäß dem erfindungsgemäßen Verfahren, sowie

Abb.3: ^1H -NMR-Spektrum von Tetraacetylcyclin (in DMSO- d_6) hergestellt gemäß dem erfindungsgemäßen Verfahren, wobei (A) eine vergrößerte Darstellung des Bereich von 2.0 – 3.6 ppm darstellt.

Ausführungsbeispiel 1

Synthese von Pentaacetylcyclin der Formel II

Minocyclinhydrochlorid (0,60 g; 1,215 mmol) wurde unter Eiskühlung (4 °C) in 12 ml Pyridin (11,73 g; 148,37 mmol) gelöst und anschließend unter Rühren 12 ml Acetanhydrid (12,98 g, 127,18 mmol) hinzugefügt. Dann wurde die Mischung 30 Minuten bei 4 °C, 2 Stunden bei Raumtemperatur und 30 Minuten bei 75 °C nachgerührt. Die Reinigung des Reaktionsproduktes erfolgte durch Vakuumflüssigkeits-Chromatographie (VLC). Dazu wurde Kieselgel 60 (75 g) in einer Glasfilternutsche unter Vakuumzug verdichtet und mit Petroleumbenzin (Siedebereich: 40 – 60 °C) vorkonditioniert. Das Reaktionsgemisch wurde auf die so vorbereitete Chromatographiesäule geladen und mit einem Petroleumbenzin / Ethylacetat-Gradienten (4/1, vol/vol bis 100 % EtOAc) eluiert. Fraktionen, die das Reaktionsprodukt enthielten, wurden vereinigt. Nach Abdestillieren des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer wurde ein Rückstand (518,5 mg) erhalten, der aus einem Ethylacetat / Petroleumbenzin-Gemisch umkristallisiert wurde und schließlich das fast reine Pentaacetylcyclin als hellgelben Feststoff lieferte. Die Roh-Ausbeute betrug 237,5 mg. Zur Endreinigung wurde das Produkt einer weiteren VLC unterworfen. Die Reinausbeute betrug 181,9 mg (23 % d. Theorie). Die analytische Kontrolle der jeweiligen Fraktionen erfolgte über Dünnschichtchromatographie (DC mit Fluoreszenzindikator, Polygram SIL G/UV₂₅₄, Firma Macherey & Nagel) mit Kieselgel 60 als stationäre Phase und

Petroleumbenzin/Ethylacetat (1/3, vol/vol) als mobile Phase. Für Zellkulturexperimente bzw. zur Testung der antibiotischen Wirkung wurden Stammlösungen der Substanz in DMSO hergestellt, mit Hilfe von Nalgene-Nylonfiltern (0,22 μm Porengröße) steril filtriert und bis zur Verwendung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Analytische Daten Pentaacetylcyclin (A-Ring aromatisiertes Pentaacetyl-Minocyclin):

- R_f (DC) = 0,50

- UV-VIS (λ_{max} in MeOH): 330 nm ($\log \epsilon$ 4,27)

- LC/MS (positive ion mode): 723 $[\text{M} + \text{C}_3\text{H}_6\text{O}_2]^+$, 688 $[\text{M} + \text{K}]^+$, 672 $[\text{M} + \text{Na}]^+$, 650 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 608 $[\text{650} - \text{Acetyl} + \text{H}]^+$, 590 $[\text{608} - \text{H}_2\text{O}]$, 565 $[\text{608} - \text{Acetyl}]^+$, 548 $[\text{590} - \text{Acetyl} + \text{H}]^+$, 506 $[\text{548} - \text{Acetyl} + \text{H}]^+$

- HR-ESI-MS (negative ion mode): $(\text{M} - \text{H})^-$ gef. 648,2198825, $\text{C}_{33}\text{H}_{34}\text{O}_{11}\text{N}_3$, dev. 2,5 ppm

- HR-ESI-MS: $(\text{M} - \text{Acetyl})$ gef. 606,2093178 $(\text{M} - \text{Acetyl})$, $\text{C}_{31}\text{H}_{32}\text{O}_{10}\text{N}_3$, dev. 1,2 ppm

- HR-ESI-MS (positive ion mode): $(\text{M} + \text{Na}^+)$ gef. 672,21638, $\text{C}_{33}\text{H}_{35}\text{O}_{11}\text{N}_3\text{Na}$, dev. 2,4 ppm

- ^1H -NMR (DMSO- d_6): δ (ppm) 2,16 (s, CH_3); 2,23 (s, CH_3); 2,27 (s, CH_3); 2,28 (s, 2 CH_3); 2,56 (m, CH); 2,66 (s, $\text{N}(\text{CH}_3)_2$); 2,73 (s, $\text{N}(\text{CH}_3)_2$); 2,76 (m, CH_2 , überlagert von $\text{N}(\text{CH}_3)_2$ -Signal); 3,48 (m, CH_2); 7,00 (d, $J = 8,6$ Hz, aromat. CH); 7,29 (d, $J = 8,2$ Hz, aromat. CH); 11,08 (br s, NH)

- ^{13}C -NMR (DMSO- d_6): Signale, Auswahl δ (ppm) 13,9; 20,2; 20,6; 24,6; 31,7; 42,4; 43,9; 59,5; 122,0; 124,5; 139,9; 148,5; 161,7; 167,2; 167,8; 168,1; 168,9; 169,8

Ausführungsbeispiel 2

Synthese von A-Ring-aromatisiertem Tetraacetyl-Minocyclin der Formel IV

Tetraacetylcyclin wurde als Nebenprodukt aus dem, im Ausführungsbeispiel beschriebenen Reaktionsgemisch chromatographisch isoliert und anschließend aus der entsprechenden Fraktion, nach Abdestillieren des Lösungsmittels und Umkristallisation aus einem Petroleumbenzin/Ethylacetat-Gemisch, rein gewonnen. Aufgrund des bathochromen Shifts der UV-Bande gegenüber der des Pentaacetylcyclins der Formel II ist die Enol-Form, entsprechend Formel IV, am wahrscheinlichsten (Abbildung 2). Die anderen (nicht enolischen) OH- bzw. die NH_2 -Gruppen im Minocyclin weisen eine höhere Basizität auf und werden deshalb bevorzugt acetyliert. Das ^1H -NMR-Spektrum (Abbildung 3) unterstützt den Strukturbeweis.

Analytische Daten Tetraacetylcyclin (A-Ring aromatisiertes Tetraacetyl-Minocyclin):

- R_f (DC) = 0,57
- UV-VIS (λ_{max}): 252,381 (log ϵ 4,27)
- 5 - LC/MS (positive ion mode): 681 $[M + C_3H_6O_2]^+$, 646 $[M + K]^+$, 630 $[M + Na]^+$, 608 $[M + H]^+$, 566 $[608 - \text{Acetyl} + H]^+$, 548 $[566 - H_2O]^+$, 524 $[566 - \text{Acetyl} + H]^+$, 506 $[524 - H_2O]^+$
- 1H -NMR (DMSO- d_6): δ (ppm) 2,16 (s, CH_3); 2,22 (s, CH_3); 2,27 (s, CH_3); 2,29 (s, CH_3); 2,49 (dt, $J = 13,7$ Hz, CH_2); 2,63 (m, $J = 4,5$; 13,6 Hz; CH); 2,66 (s, $N(CH_3)_2$); 2,72 (s, $N(CH_3)_2$); 3,50 (dt, $J = 4,5$; 14,9 Hz; CH); 7,04 (d, $J = 8,6$ Hz; aromat. CH); 7,37 (d, $J = 8,6$ Hz; aromat. CH); 11,10 (s, NH)
- 10

Ausführungsbeispiel 3

Prüfung der zell- bzw. neuroprotektiven Wirkeigenschaften am Astrozyten-Mitochondrien-Modell

- 15 Astrogliazellen, d.h. nicht-neoplastische embryonale Astrozyten-Zelllinie der Ratte [Chamaon, K., Kirches, E., Kanakis, D., Braeuninger, S., Dietzmann, K., and Mawrin, C. (2005). Regulation of the pituitary tumor transforming gene by insulin-like-growth factor-I and insulin differs between malignant and non-neoplastic astrocytes. Biochem
- 20 Biophys Res Commun 331, 86-92] wurden auf mit Poly-D-Lysin beschichteten Deckgläsern am Boden von Kulturschalen für 18 Stunden bei 37 °C (5 % CO_2) kultiviert. Als Kulturmedium diente jeweils 2 ml DMEM (PAA Laboratories GmbH Pasching, Österreich) und die Einsaatdichte betrug $0,3 \times 10^6$ Zellen/2 ml. Die Zellkulturen
- 25 wurden zunächst mit unterschiedlichen Konzentrationen (1,0; 5,0 bzw. 25,0 μM) Minocyclinhydrochlorid bzw. Pentaacetylcyclin (Formel II) für 30 Minuten vorinkubiert. Als unbehandelte Kontrolle diente die alleinige Zugabe des Lösungsmittels DMSO (2 μl /Kulturschale) unter identischen Inkubationsbedingungen. Danach erfolgt die Zugabe von 1,0
- 30 bzw. 3,0 mM H_2O_2 (Endkonzentration) und eine weitere Inkubation für 2 Stunden. Als Vergleich dienten die entsprechend behandelten Zellen, welche nur mit 1,0 bzw. 3,0 mM H_2O_2 oder nur mit Minocyclinhydrochlorid bzw. Pentaacetylcyclin, in den angegebenen Konzentrationen kultiviert wurden. Nach Austausch des Kulturmediums
- 35 gegen 2 ml auf 37 °C temperierten HEPES-Puffer (10 mM HEPES, 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM $CaCl_2$, 10 mM D-Glukose, pH 7,4) fand eine weitere Inkubation der Zellen für 30 Minuten statt. Darauf

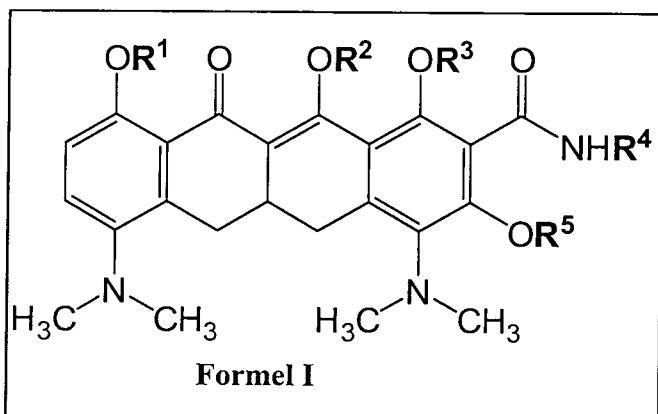
folgte die Zugabe von 40 nM MitoTracker® Orange CMTMRos (1 μ l einer 80 μ M Stammlösung der oxidierten Form, Bestell-Nr. M7510; $\lambda_{\text{Anregung}} = 554$ nm, $\lambda_{\text{Emission}} = 576$ nm; Molecular Probes Inc., Eugene, USA). Nach 30-minütiger Inkubation bei 37 °C wurden die Zellkulturen
5 in 4% Paraformaldehyd (m/vol in HEPES-Puffer) für 30 Minuten fixiert, zur Entfernung des Fixationsmittels dreimal für 10 Minuten mit 0,1 M PBS gespült und anschließend die Deckgläschen mit den fixierten Zellen auf Objektträger in ImmuMount® befestigt. Zur visuellen Untersuchung und Dokumentation kam ein Zeiss-Axiophot-Fluoreszenzmikroskop mit
10 CCD-Kamera (AxioCam MRc) zum Einsatz.

Unbehandelte Kontrollzellen stellen sich als polygonale Zellkörper mit 2-3 langgestreckten Fortsätzen dar und erscheinen bei ausreichender Zelldichte als ein zelluläres Netz. Fadenförmige Mitochondrien sind im Zytoplasma bis in die Zellfortsätze hinein verteilt. Nach 2-stündiger
15 Inkubation mit 1 mM H₂O₂ (ohne Minocyclin bzw. Pentaacetylcyclin) sind die Mehrzahl der Zellen geschädigt und zeigen einen deutlichen Rückzug ihrer Fortsätze. Dadurch verlieren die Zellkörper ihre polygonale Form und tendieren zur Abrundung. Infolge von Fission sind die Mitochondrien stark verkürzt und werden in Richtung des Zellkerns
20 disloziert. Mit 3 mM H₂O₂ sind diese zellschädigenden Prozesse verstärkt. Die Dichte der haftenden Zellen ist verringert, die Zellkörper sind weit mehr abgerundet und die noch stärker verkürzten Mitochondrien sind nahe dem Zellkern akkumuliert. Die Zugabe von
25 25 μ M Minocyclinhydrochlorid zu den zuvor mit H₂O₂ geschädigten Zellen hat einen schützenden Effekt. Die Zellen erhalten weitgehend ihre polygonale Gestalt und die Mitochondrien sind weniger verkürzt. Überraschenderweise zeigte sich, dass bei Verwendung von Pentaacetylcyclin schon bei der viel niedrigeren Konzentration von
30 1,0 μ M die H₂O₂-induzierte Schädigung der Mitochondrien deutlich verringert wird. Dieser Schutzeffekt des A-Ring-aromatisierten Pentaacetyl-Minocyclins ist eine Verbesserung gegenüber Minocyclinhydrochlorid, mit welchem erst ab 25 μ M eine ähnliche Schutzwirkung beobachtet werden kann. In dem genutzten Testsystem und den hier verwendeten Konzentrationen schädigen
35 Minocyclinhydrochlorid und Pentaacetylcyclin die Zellen nicht.

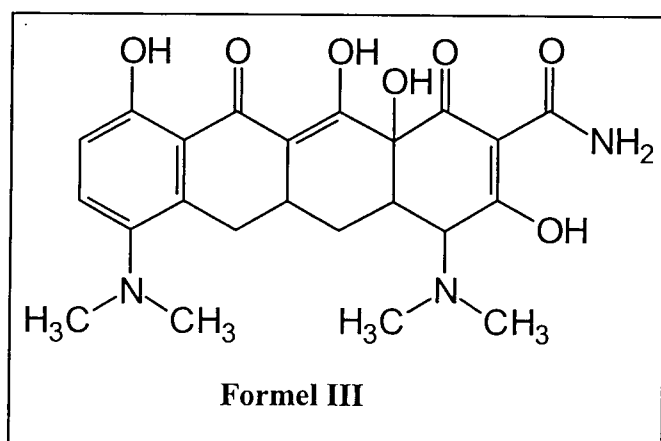
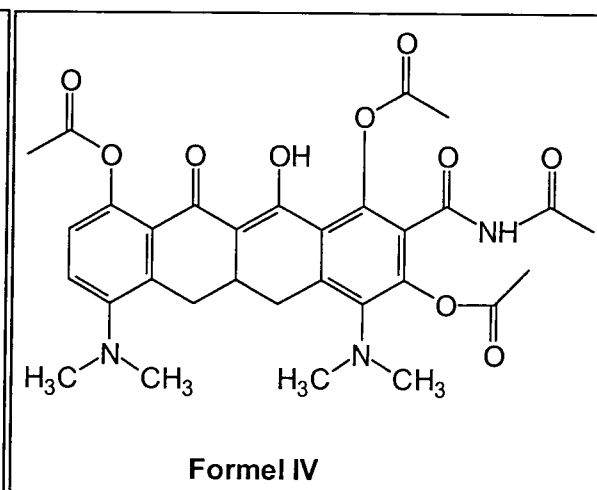
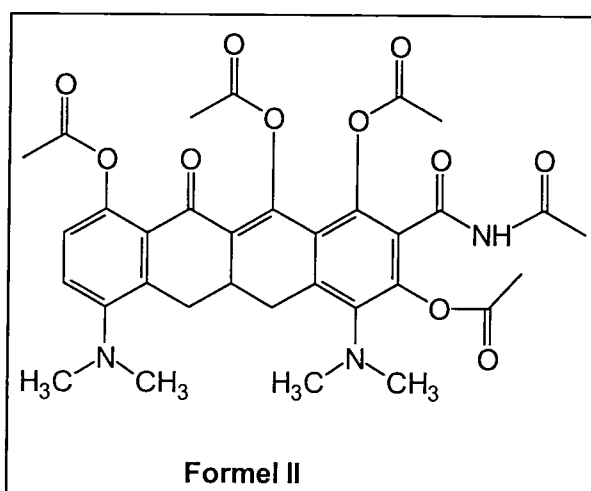
Ausführungsbeispiel 4**Prüfung der antibiotischen Wirkung von Pentaacetylcyclin und Minocyclinhydrochlorid im Plattendiffusionstest**

- 5 Die Flüssigkultur (24 Stunden in LB-Lennox-L-Broth-Base kultiviert) einer *E. coli*-Suspension (150 μ l) des Stammes C 600 hfc wurde auf LB-Agar (Lennox-L-Agar, Gibco) mit Hilfe eines sterilen Drigalski-Spatels gleichmäßig verteilt. Anschließend wurden sterile Filterpapierblättchen (Durchmesser 5,3 mm), die zuvor mit sterilen DMSO-Lösungen sowie
- 10 unterschiedlichen Konzentrationen (100 μ M bis 2,5 mM) von Minocyclinhydrochlorid bzw. Pentaacetylcyclin (Formel II) getränkt wurden, auf den Nährboden aufgelegt. Nach Inkubation der Platten bei 37 °C für 24 Stunden erfolgte die Beurteilung der antibiotischen Aktivität der Substanzen anhand der Durchmesser der Hemmhöfe,
- 15 welche durch die fehlende Eintrübung durch Bakterien sichtbar werden. An Hand der unterschiedlichen Größe der Hemmhöfe ist erkennbar, dass Minocyclinhydrochlorid konzentrationsabhängig das Wachstum von *E. coli* inhibiert. Hingegen zeigt Pentaacetylcyclin selbst in der höchsten getesteten Konzentration von 2,5 mM keine Wachstumshemmung und
- 20 ist demzufolge gegen den verwendeten *E. coli* Stamm nicht antibiotisch wirksam.

- Alle in der Beschreibung und den nachfolgenden Ansprüchen dargestellten Merkmale können sowohl einzeln als auch in beliebiger
- 25 Kombination miteinander erfindungswesentlich sein.



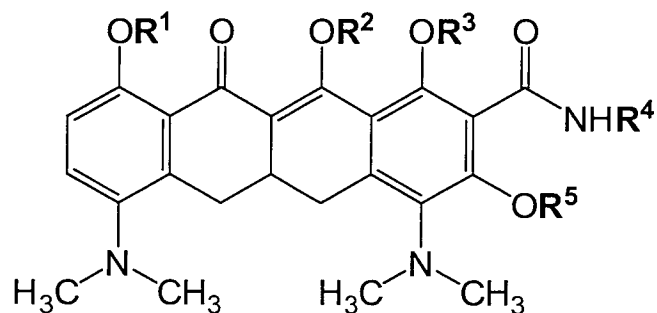
10



Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von A-Ring-aromatisierten Acetyl-Minocyclinen

5



wobei R¹ bis R⁵ = Acetyl und/oder H sind, dadurch gekennzeichnet, dass Minocyclinhydrochlorid mit Acetanhydrid in Gegenwart eines Protonenfängers umgesetzt, das Reaktionsprodukt einer chromatographischen Aufreinigung unter Verwendung eines Trägermaterials und eines Eluenten unterworfen, der Eluent abdestilliert und das Produkt anschließend durch Umkristallisation gereinigt wird.

15

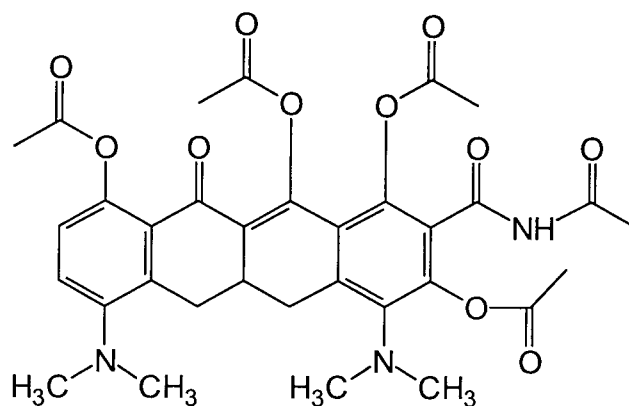
2. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass als Protonenfänger eine organische Base verwendet wird.
3. Verfahren gemäß den Ansprüchen 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Base ein primäres, sekundäres oder tertiäres Amin ist.
4. Verfahren gemäß Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass der Protonenfänger bevorzugt Pyridin ist.
5. Verfahren gemäß Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass das Acetanhydrid und der Protonenfänger im Überschuss oder äquimolar, entsprechend der Anzahl der einzuführenden Acetylgruppen, eingesetzt werden.

20

25

30

6. Verfahren nach einem oder mehrerer der voran stehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Umsetzung der Edukte in einem inerten Lösungsmittel erfolgt.
- 5 7. Verfahren gemäß Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass das Lösungsmittel Chloroform, Methylenchlorid, Nitromethan, Acetonitril, Aceton, Sulfolan, Dimethylformamid oder Dimethylsulfoxid ist.
- 10 8. Verfahren nach einem oder mehrerer der voran stehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Umsetzung bei einer Temperatur von 4 bis 100 °C, bei Normal- oder Überdruck durchgeführt wird.
- 15 9. Verfahren nach einem oder mehrerer der voran stehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass Pentaacetylcyclin (A-Ring-aromatisiertes Pentaacetyl-Minocyclin) der Formel II

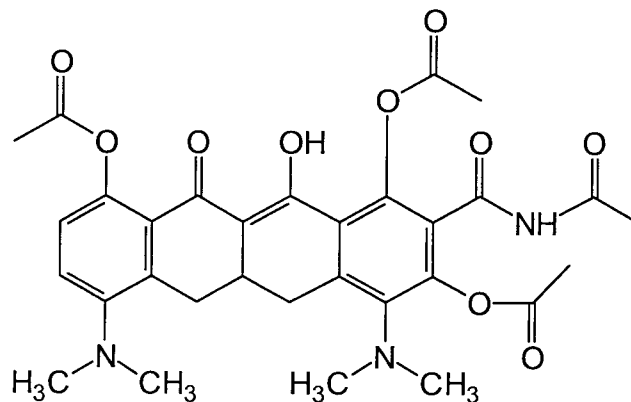
**Formel II**

als Hauptprodukt synthetisiert wird.

- 20 10. Verfahren nach einem oder mehrerer der voran stehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass je nach Reaktionsführung andere A-Ring-aromatisierte, ein- oder mehrfachacetylierte Minocycline der Formel I (mit R¹ bis R⁵ = Acetyl und/oder H) synthetisiert werden, wobei die Anzahl der Acetylgruppen im Molekül kleiner oder gleich 5 ist.

11. Verfahren nach einem oder mehreren der voran stehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass als Nebenprodukt besonders bevorzugt das Tetraacetylcyclin (A-Ring-aromatisiertes Tetraacetyl-Minocyclin) der Formel IV

5

**Formel IV**

synthetisiert wird.

12. Verfahren nach einem oder mehreren der voran stehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die chromatographische Reinigung der Reaktionsprodukte an Kieselgel 60 (Silicagel) oder einem anderen Trägermaterial wie Aluminiumoxid, 'reversed-phase'-Silicagel oder Sephadex durchgeführt wird.
13. Verfahren nach einem oder mehreren der voran stehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die chromatographische Aufreinigung im Festbett, in einer Chromatographiesäule, in einem Büchner-Trichter mit Glasfritten-Einsatz oder einem Hängegefäß mit Siebboden-Einlage erfolgt.
14. Verfahren nach einem oder mehreren der voran stehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass zur Elution über das Trägermaterial

und zur Umkristallisation der Reaktionsprodukte besonders bevorzugt ein Gemisch aus Ethylacetat und Petroleumbenzin verwendet wird.

- 5 15. Verfahren nach einem oder mehreren der voran stehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass an Stelle von Ethylacetat und Petroleumbenzin auch Methylformiat, *n*-Butylacetat, Dimethylcarbonat bzw. andere Kohlenwasserstoffe wie *n*-Pentan, *n*-Hexan, Cyclohexan oder Isobutan eingesetzt werden.
- 10 16. Wirkstoff oder Wirkstoffgemisch hergestellt nach einem oder mehreren der voran stehenden Ansprüche.
- 15 17. Verwendung des Wirkstoffes oder Wirkstoffgemisches gemäß Anspruch 16 zur Herstellung eines Medikamentes, welches zur Behandlung von durch oxidativen Stress und/oder mitochondriale Schädigungen vermittelter neurodegenerativer Erkrankungen eingesetzt werden kann.

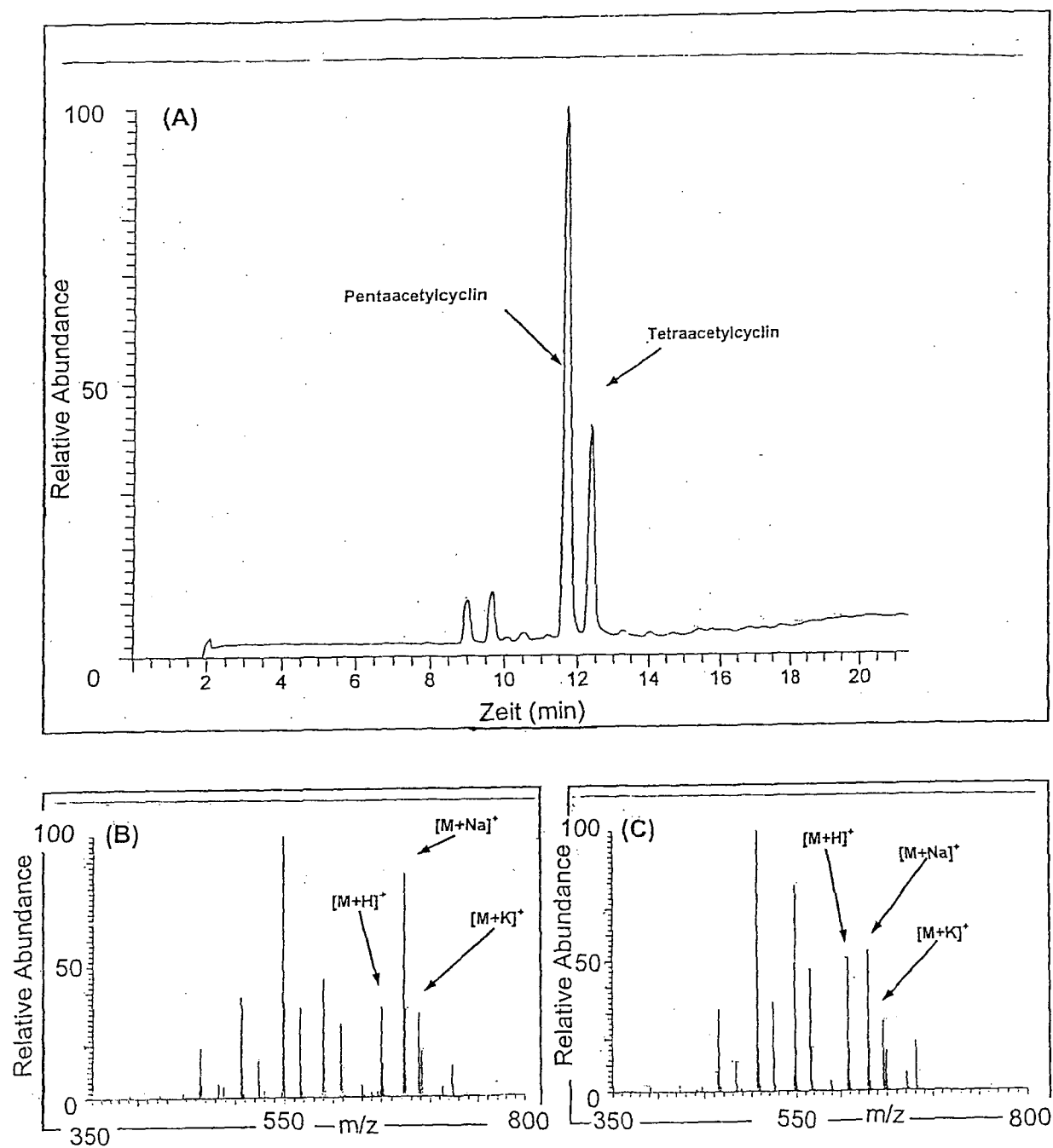


Abb. 1

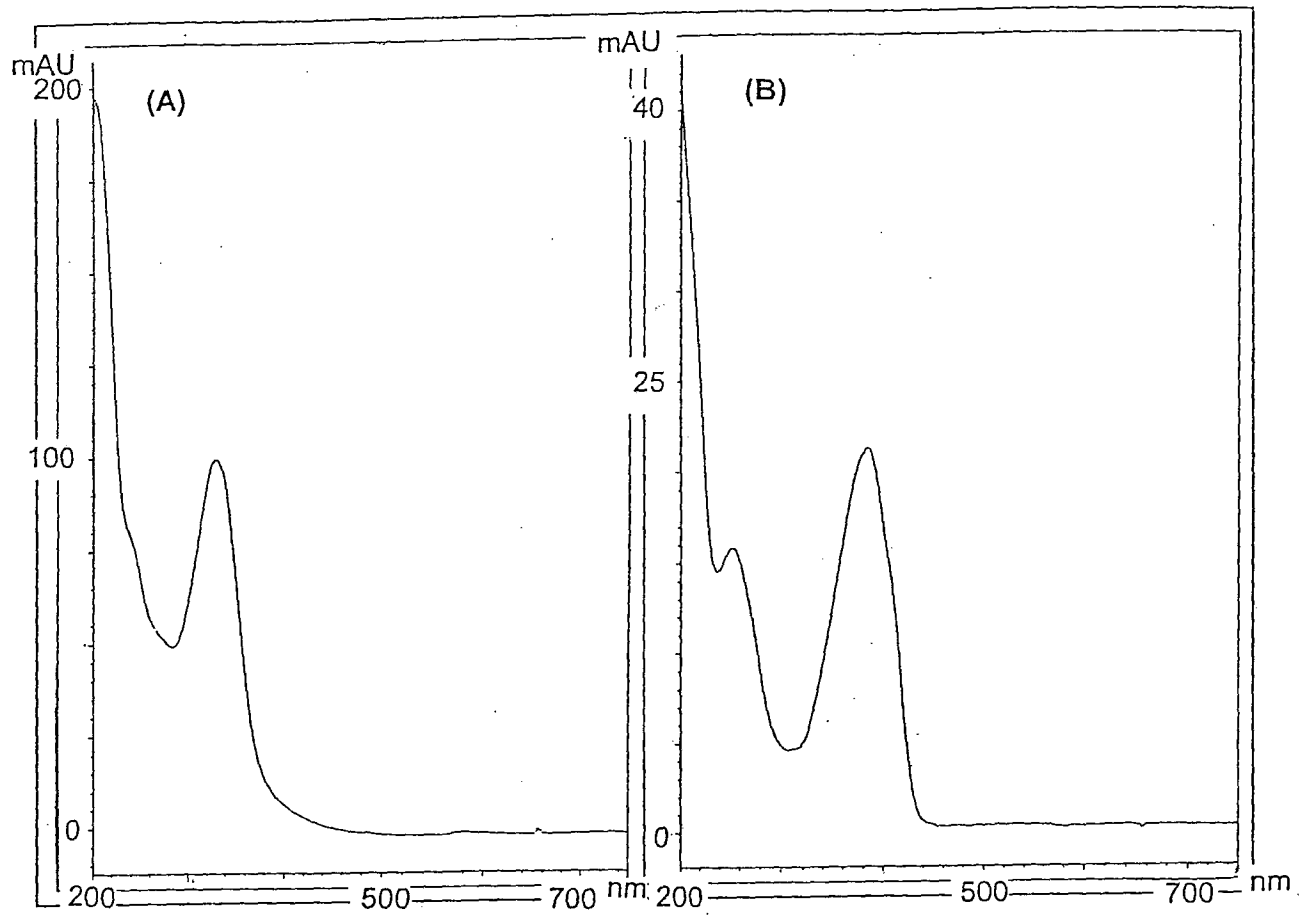


Abb. 2

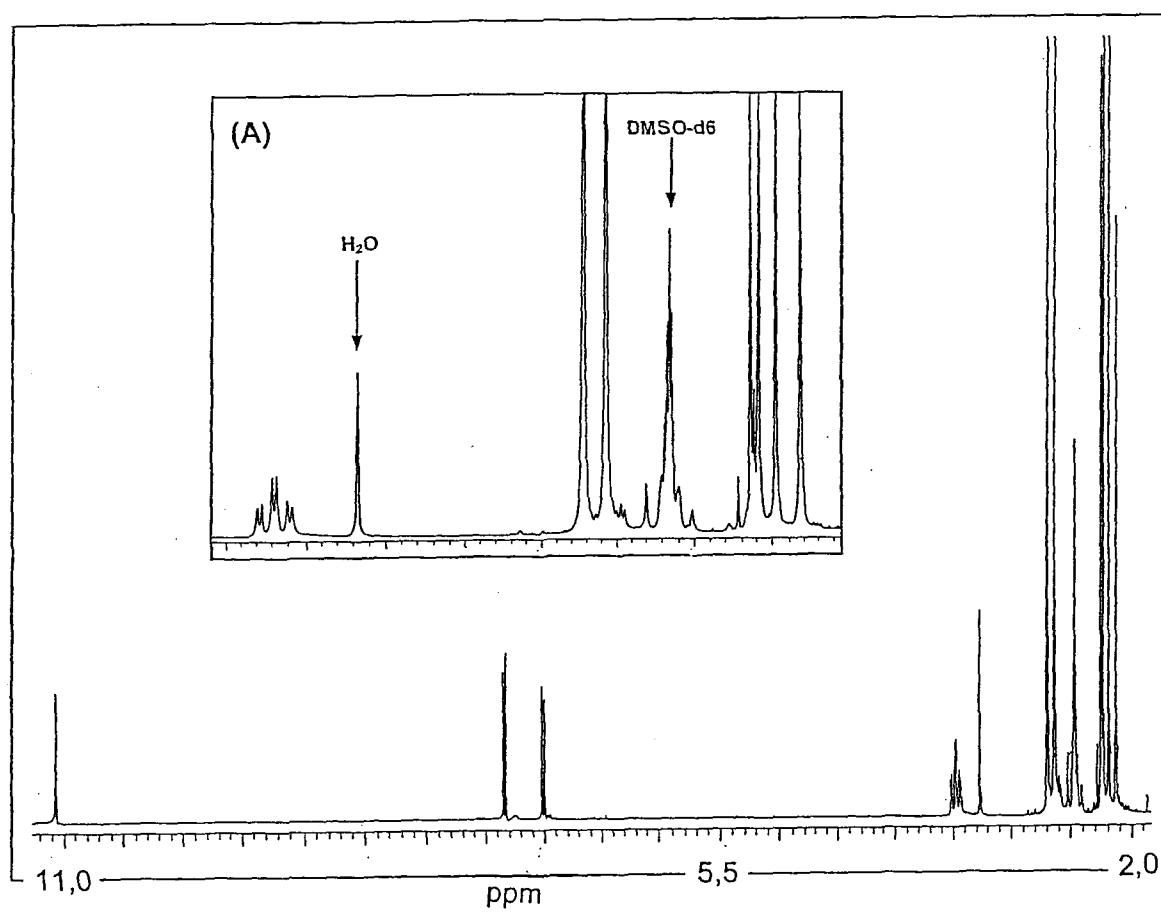


Abb. 3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/DE2008/001055

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C07C231/02 C07C237/26 A61K31/166 A61P25/00

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)

C07C A61K A61P

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

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

EPO-Internal, WPI Data, BEILSTEIN Data, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2005/070878 A (PARATEK PHARM INNOC [US]; NELSON MARK L [US]) 4 August 2005 (2005-08-04) cited in the application	1-8, 12-17
A	page 33 - page 46; claims; example 1	9-11

☐ 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 document but published on or after the international filing date

L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

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

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

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

Z document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

4 November 2008

Date of mailing of the international search report

11/11/2008

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

Zervas, Brigitte

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/DE2008/001055

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2005070878 A	04-08-2005	CA 2553510 A1	04-08-2005
		EP 1716101 A1	02-11-2006
		JP 2007520482 T	26-07-2007

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE2008/001055

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
INV. C07C231/02 C07C237/26 A61K31/166 A61P25/00

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

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
C07C A61K A61P

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, BEILSTEIN Data, CHEM ABS Data

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 2005/070878 A (PARATEK PHARM INNC [US]; NELSON MARK L [US]) 4. August 2005 (2005-08-04). in der Anmeldung erwähnt	1-8, 12-17
A	Seite 33 - Seite 46; Ansprüche; Beispiel 1 -----	9-11

☐ 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 älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

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

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

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

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

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

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

G Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

4. November 2008

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

11/11/2008

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

Zervas, Brigitte

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE2008/001055

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 2005070878 A	04-08-2005	CA 2553510 A1	04-08-2005
		EP 1716101 A1	02-11-2006
		JP 2007520482 T	26-07-2007
