(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
22. Juli 2004 (22.07.2004)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2004/060360 A1

(51) Internationale Patentklassifikation[7]: A61K 31/00, 31/60, 31/19, 31/40, 31/54, 31/335, 35/78, 31/35, 31/13, 31/70, A61P 31/12, 31/16

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE2004/000012

(22) Internationales Anmeldedatum:
2. Januar 2004 (02.01.2004)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
103 00 222.7 3. Januar 2003 (03.01.2003) DE

(71) Anmelder *(für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US)*: **MEDINNOVA GESELLSCHAFT FÜR MEDIZINISCHE INNOVATIONEN AUS AKADEMISCHER FORSCHUNG MBH** [DE/DE]; Biegenstr. 4, 35037 Marburg (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder *(nur für US)*: **PLANZ, Oliver** [DE/DE]; Wendelsheimer Str. 34, 72108 Rottenburf (DE). **PLESCHKA, Stephan** [DE/DE]; Hinter der Ostanlage 5a, 35390 Giessen (DE). **SEDLACEK, Hans-Harald** [DE/DE]; Sonnenhang 3, 35041 Marburg (DE). **LUDWING, Stephan** [DE/DE]; Langes Gräthlein 21, 97078 Würzburg (DE).

(74) Anwälte: **JUNGBLUT, Bernhard** usw.; Albrecht, Lüke & Jungblut, Patentanwälte, Gelfertstr. 56, 14195 Berlin (DE).

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

(84) Bestimmungsstaaten *(soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, 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, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:
— *mit internationalem Recherchenbericht*
— *vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen*

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

(54) **Title:** USE OF ACTIVE INGREDIENTS FOR THE PROPHYLAXIS AND/OR THERAPY OF VIRAL DISEASES

(54) **Bezeichnung:** VERWENDUNG VON WIRKSUBSTANZEN ZUR PROPHYLAXE UND/ODER THERAPIE VON VIRUSERKRANKUNGEN

(57) **Abstract:** The invention relates to the use of at least one active ingredient for the prophylaxis and/or therapy of a viral disease, whereby said active ingredient inhibits at least one component of the cellular transmission pathway for activation of the transcription factor NF-kB, such that viral multiplication is inhibited. The invention further relates to the local, preferably air-borne administration of said active ingredients for inhibition of a viral multiplication. Said active ingredients can be combined with at least one further anti-virally effective substance for the prophylaxis and/or therapy of a viral disease.

(57) **Zusammenfassung:** Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung bevorzugt mindestens einer Wirksubstanz zur Prophylaxe und/oder Therapie einer Viruserkrankung, wobei diese Wirksubstanz mindestens eine Komponente des zellulären Signalübertragungsweges zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-kB derart hemmt, dass die Virusvermehrung gehemmt wird. Die vorliegende Erfindung betrifft des weiteren die lokale, bevorzugt die aerogene Verabreichung des erfindungsgemässen Wirkstoffes zur Hemmung einer Virusvermehrung. Die erfindungsgemässe Wirksubstanz kann mit mindestens einer weiteren antiviral wirksamen Substanz zur Prophylaxe und/oder Therapie einer Viruserkrankung kombiniert werden.

WO 2004/060360 A1

Verwendung von Wirksubstanzen zur Prophylaxe und/oder Therapie von Viruserkrankungen

Gebiet der Erfindung.

Die Erfindung betrifft ein Testsystem zur Findung von Wirksubstanzen, welche zur Prophylaxe und/oder Behandlung von Viruserkrankungen geeignet sind, Verwendungen solcher Wirksubstanzen zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Prophylaxe und/oder Behandlung von Viruserkrankungen, Formulierungen für solche pharmazeutischen Zusammensetzungen sowie Verfahren zur Herstellung solcher pharmazeutischen Zusammensetzungen.

Stand der Technik und Hintergrund der Erfindung

Infektionen mit RNA- oder DNA-Viren stellen eine bedeutende Gesundheitsbedrohung für Mensch und Tier dar. Zu den RNA-Viren gehören die Negativ-Strang-RNA Viren, wie beispielsweise Influenza Viren oder das Borna-Disease Virus. Infektionen mit Influenza-Viren gehören immer noch zu den großen Seuchen der Menschheit und fordern Jahr für Jahr eine Vielzahl an Todesopfern. Sie sind gesamtwirtschaftlich, etwa durch krankheitsbedingte Arbeitsunfähigkeit, ein immenser Kostenfaktor. Von ebenfalls wichtiger wirtschaftlicher Bedeutung sind Infektionen mit dem Borna Disease Virus (BDV), das vor allem Pferde und Schafe befällt, jedoch auch schon beim Menschen isoliert wurde und hier in Zusammenhang mit neurologischen Erkrankungen gebracht wird.

Das Problem der Bekämpfung von insbesondere RNA-Viren ist die durch eine hohe Fehlerrate der viralen Polymerasen verursachte Wandlungsfähigkeit der Viren, die sowohl die Herstellung geeigneter Impfstoffe als auch das Entwickeln von antiviralen Substanzen sehr schwierig macht.

Darüber hinaus hat sich gezeigt, dass die Anwendung von antiviralen Substanzen, die direkt gegen Funktionen des Virus gerichtet sind, zwar zu Therapiebeginn eine gute antivirale Wirkung zeigen, aber mutationsbedingt sehr schnell zur Selektion resistenter Varianten führt. Ein Beispiel hierfür ist das anti-Influenza-Agens Amantadin und dessen Derivate, welches bzw. welche gegen ein Transmembranprotein des Virus gerichtet ist bzw. sind. Innerhalb kurzer Zeit nach Anwendung bilden sich resistente Varianten des Virus.

Ein weiteres Beispiel sind die neuen Therapeutika für Influenzainfektionen, die das Influenza-virale Oberflächenprotein Neuraminidase hemmen. Hierzu gehört beispielsweise Relanza. In Patienten wurden bereits Relanza-resistente Varianten gefunden (Gubareva et al., J Infect Dis 178, 1257-1262, 1998). Die Hoffnungen, die in dieses Therapeutikum gelegt wurden, konnten somit nicht erfüllt werden.

Aufgrund ihrer meist sehr kleinen Genome und damit verbundener begrenzter Kodierungskapazität für replikationsnotwendige Funktionen sind alle Viren in starkem Maße auf Funktionen ihrer Wirtszellen angewiesen. Durch Einflussnahme auf solche zelluläre Funktionen, die für die virale Replikation notwendig sind, ist es möglich, die Virusreplikation in der infizierten Zelle negativ zu beeinträchtigen. Hierbei besteht für das Virus nicht die Möglichkeit, durch Anpassung, insbesondere durch Mutationen, die fehlende zelluläre Funktion zu ersetzen, um so dem

Selektionsdruck zu entweichen. Dies konnte am Beispiel des Influenza A Virus mit relativ unspezifischen Hemmstoffen gegen zelluläre Kinasen und Methyltransferasen bereits gezeigt werden (Scholtissek und Müller, Arch Virol 119, 111-118, 1991).

Es ist bekannt, dass Zellen über eine Vielzahl von Signalübertragungswegen verfügen, mit Hilfe derer auf die Zelle einwirkende Signale in den Zellkern übertragen werden. Dadurch kann die Zelle auf äußere Reize reagieren und mit Zellproliferation, Zellaktivierung, Differenzierung oder kontrolliertem Zelltod reagieren.

Diesen Signalübertragungswegen ist gemeinsam, dass sie mindestens eine Kinase enthalten, welche durch Phosphorylierung mindestens ein nachfolgend signalübertragendes Protein aktivieren.

Bei Betrachtung der zellulären Prozesse, die nach Virusinfektionen induziert werden, findet man, dass eine Vielzahl von DNA- und RNA-Viren in der infizierten Wirtszelle bevorzugt einen definierten Signalübertragungsweg, den sogenannte Raf/MEK/ERK-Kinase-Signalübertragungsweg aktivieren. Dieser Signalübertragungsweg ist einer der wichtigsten Signalübertragungswege in einer Zelle und spielt eine bedeutende Rolle in Proliferations- und Differenzierungsprozessen (Cohen, Trends in Cell Biol 7, 353-361, 1997; Robinson und Cobb, Curr.Opin.Cell Biol 9, 180-186, 1997; Treisman, Curr.Opin Cell Biol 8, 205-215, 1996).

Die Untersuchung der Rolle dieses Signalübertragungsweges in zellulären Entscheidungsprozessen hat zur Identifizierung mehrerer pharmakologischer Inhibitoren geführt, welche den Signalübertragungsweg unter anderem auf der Ebene von MEK, also relativ am Beginn des Signalübertragungsweges hemmen (Alessi et

al., J Biol Chem 270, 27489-27494, 1995; Cohen, Trends in Cell Biol 7, 353-361, 1997; Dudley et al., PNAS USA 92, 7686-7689, 1995; Favata et al., J Biol Chem 273, 18623-18632, 1998).

Neuere Daten zeigen, dass die Inhibition des Ras-Raf-MEK-ERK-Signalübertragungsweges oder eines weiteren Signalübertragungsweges, des MEKK/SEK/JNK-Signalübertragungsweges, durch Wirksubstanzen, welche relativ selektiv eine der an diesem Signalübertragungsweg beteiligten Kinasen, beispielsweise die MEK oder die SEK inhibieren, die intrazelluläre Vermehrung von intranukleär replizierenden Negativstrang-Viren, beispielsweise von Influenza A Virus und Borna Disease Virus (BDV) drastisch hemmen kann (Pleschka et al., Nature Cell Biol 3, 301-305, 2001; Planz et al., J Virol 10, 4871-4877, 2001; PCT/DE 01/01292; DE 101 38 912).

Bislang war bekannt, dass Influenza- Viren vorzugsweise den Raf-MEK-ERK-Signalübertragungsweg oder den MEKK/SEK Signalübertragungsweg für ihre Vermehrung nutzen und demzufolge eine Hemmung dieser Signalübertragungswege zu einer vollständigen Hemmung der Virusvermehrung führt. Da in einer Zelle die Signalübertragungswege jedoch kaum eine in sich abgeschlossene Funktionen aufweisen, sondern bei Aktivierung des einen Signalübertragungsweges über Kreuzvernetzungen weitere Signalübertragungswege in unterschiedlichem Ausmaß zusätzlich aktiviert werden, ist grundsätzlich nicht auszuschließen, dass ein gehemmter Signalübertragungsweg sowohl von der Zelle als auch von den Viren umgangen werden kann und der therapeutische Effekt einer Wirksubstanz, die eine Virusvermehrung durch Hemmung eines bestimmten Signalübertragungsweges hemmt, hierdurch eingeschränkt werden könnte.

Daher besteht ein großer Bedarf für das Auffinden und Verwenden antiviraler Wirksubstanzen, welche zusätzlich oder ergänzend zu solchen wirken, die Kinasen von zellulären Signalübertragungswegen, beispielsweise des Raf-MEK-ERK-Signalübertragungsweges oder des MEKK/SEK/JNK-Signalübertragungsweges hemmen. Solche Wirkstoffe sind bereits in den Literaturstellen PCT/DE 01/01292 und DE 101 38 912 beschrieben worden.

Einer der bedeutenden Signalübertragungswege in der Zelle ist der nukleäre Faktor von kappaB (NF-kB)-Signalübertragungs- weg. Zentraler Bestandteil dieses Übertragungsweges ist der heterodimere NF-kB-Transkriptions-Proteinkomplex, bestehend einerseits aus p50 [entstanden aus der Proteolyse von NF-kB1 (p105)] oder aus p52 [entstanden aus der Proteolyse von NF-kappaB2 (p100)] und andererseits aus p65 (RELA), c-REL oder RELB. Der häufigste NF-kB-Komplex besteht aus p50 und p65.
Die Transkriptionsaktivität dieses NF-kB-Komplexes wird gehemmt durch die Bindung der Inhibitorproteine von NFkB (IkB) an die nukleäre Bindesequenz von p65. Hierdurch verbleibt der Komplex im Zytoplasma. Aktivierung der Zelle beispielsweise durch Wachstumsfaktoren, Chemokine, TNFalpha, Il-1, CD40-ligand, LPS oder im Rahmen einer Infektion mit Viren führt zur Aktivierung von Kinasen wie der "NF-kB-induzierenden Kinase" (NIK), der Kinase TAK, der Kinase AKT und möglicherweise auch der Kinase MEKK1. Diese Kinase führen zur Aktivierung des "Inhibitor von kB (IkB)-Kinase" (IKK)-Komplexes, bestehend aus IKKalpha, IKKbeta und NEMO. Aktiviertes IKK phosphoryliert IkB und führt so zu dessen Degradierung und erlaubt damit die Freisetzung, nukleäre Translokation und Aktivierung der Transskriptionsaktivität des p50/p65- Heterodimers. Ein weiterer NF-kB Komplex besteht aus p100 und RELB. Aktivierung der Zelle durch Lymphotoxine führt, vermutlich bevorzugt vermittelt durch NIK, zur Aktivierung von IKKalpha. Das aktivierte IKK induziert die Phosphorylierung und

damit die Proteolyse von p100 zum p52, welches wiederum im Komplex mit dem RELB in den Zellkern translozieren und dort als Transkriptionsfaktor aktiv werden kann.

Es ist bekannt, dass i) nicht-steroidale anti-inflammatorische Substanzen (NSAIDs), wie beispielsweise Sulindac (Yamamoto et al., J Biol Chem 274,27307-27314, 1999; Berman et al., Clin Cancer Res 8, 354-360, 2002) oder Derivate von Sulindac wie beispielsweise Sulindac Sulfoxid, Sulidac Sulfon, Sulindac Sulfid oder Benzylamid Sulindac-Analoga (Moon und Lerner, Cancer Research 62, 5711-5719,2002) oder Acetylsalizylsäure oder Salizylsäure (Yin et al., Nature 396, 77-80,1998) oder Curcumin (Oncogene 18, 6013-6020, 1999) durch Hemmung der IKKbeta, ii) NEMO bindende Peptide (May et al., Science 289, 1550-1554, 2000), Proteosom Inhibitoren wie beispielsweise PS-341 (Tan und Waldmann, Cancer Res 62, 1083-1086,2002; Adams Trends Mol Med 8, 49-54, 2002) oder iii) Antisense Nukleotidsequenzen spezifisch für p65 oder p50 (Higgins et al., PNAS-USA 90, 9901-9905,1993) die Aktivierung des NF-kB-Signalübertragungsweges hemmen können. Bislang wurden diese Hemmstoffe jedoch ausnahmslos geprüft für ihre Verwendung als Wirkstoffe zur Beeinflussung von Entzündungen und des Wachstums von Tumoren, da bei beiden Indikationen die beteiligten Zellen eine erhöhte Aktivierung des NF-kB Signalübertragungsweg aufweisen (Karin et al., Nature Reviews Cancer 2, 301-310, 2002).

Bislang bestand die Vorstellung, dass eine Virusinfektion, im Besonderen auch eine Infektion mit Influenza-Virus, über die Aktivierung der IKK den NF-kB Signalweg aktiviert, welcher wiederum entscheidend beteiligt ist an der durch diese Infektion erhöhten Expression von antiviral aktiven Proteinen wie beispielsweise Interferon (Chu et al., Immunity 11,721-731,1999). In Übereinstimmung mit

dieser Vorstellung ist der Befund, dass die Influenza-Virus induzierte Aktivität des Interferon-ß-Promotors stark reduziert ist in Zellen, welche eine transdominant negative Mutation von IKK2 oder von IkBalpha exprimieren (Wang et al., Virol 74,11566-11573,2000). Andererseits gibt es den diesen Vorstellungen und Befunden widersprechenden Hinweis, dass Acetylsalizylsäure, bekannt als Inhibitor der IKK , in der Zellkultur auch Influenza-Virus Infektionen hemmen kann, dieses jedoch erst ab Konzentrationen von 5-10 mM (entsprechend 0,9-1,8 mg/ml). Derartige Konzentrationen sind im Blut nach oraler Verabreichung von Acetylsalizylsäure ohne erhebliche Nebenwirkungen praktisch nicht erreichbar (Huang und Dietsch, New Engl J Med 319,797, 1988). Acetylsalizylsäure gilt als das toxischste aller derzeit frei verfügbare Analgetika mit der geringsten therapeutischen Breite (Jones, Am J Ther 9, 245-257,2002). Zwar spekulierten Huang und Dietsch, durch eine Verabreichung von Aerosol höhere und damit antiviral wirksame Konzentrationen lokal in den Atemwegen zu erzielen. Diese Empfehlungen wurden bislang jedoch nicht umgesetzt, da allein schon die bisher bekannten klinischen Nebenwirkungen nach oraler Verabreichung einer ansonsten als nicht-toxisch geltenden Dosis von 100mg Acetylsalizylsäure dazu führten, vor der Einnahme von Aspirin bei Virusgrippe besonders bei Kindern zu warnen (Gebrauchsinformation Z.Nr.14.252 der Bayer AG zum Acetylsalicylsäure (ASS)-Präparat Aspirin®).

Technisches Problem der Erfindung

Der Erfindung liegt das technische Problem zu Grunde, ein Testsystem zu schaffen, mit welchen sich verbesserte Wirksubstanzen zur Prophylaxe und/oder Behandlung von Viruserkrankungen finden

lassen, sowie pharmazeutische Zusammensetzungen und Formulierungen für solche Indikationen anzugeben.

Grundzüge der Erfindung und Ausführungsformen.

Die Erfindung beruht auf den überraschenden Erkenntnissen, dass i) Wirkstoffe, welche den zellulären NF-kB Signalübertragungsweg hemmen, die Vermehrung von Viren in einem Organismus hemmen können, ii) bei lokaler Verabreichung geringere Konzentrationen des erfindungsgemäß eingesetzten Wirkstoffes antiviral wirksam sind als aus den in vitro Daten ableitbar, iii) der erfindungsgemäß eingesetzte Wirkstoff Acetylsalizylsäure aerogen in Konzentrationen von 0.1 bis 4 mM verabreicht eine deutliche Hemmung der Influenza-Virusvermehrung in der Lunge und im Gesamtorganismus und einen systemischen Heileffekt ohne Beeinträchtigung des Allgemeinbefindens bewirkt, obwohl derartige Konzentrationen der Acetylsalizylsäure in vitro keine antivirale Wirksamkeit gezeigt haben. Höhere Dosen von Acetylsalizylsäure, beispielsweise Acetylsalizylsäure in Konzentrationen von 10 mM, waren vergleichsweise nicht stärker, noch höhere Dosen (bis 50 mM) deutlich geringer antiviral wirksam als die niedrigen, erfindungsgemäßen Konzentrationen. Zusätzlich erwiesen sich Konzentrationen ab 20mM nach aerogener Verabreichung als toxisch.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist somit die Verwendung mindestens einer Wirksubstanz zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Prophylaxe und/oder Therapie von mindestens einer Viruserkrankung, wobei die Wirksubstanz(en) auf mindestens einen Bestandteil des NF-kB Signalübertragungsweges hemmend einwirkt, sodass eine Virusvermehrung im Organismus gehemmt wird. Bestandteil des NF-kB Signalübertragungs- weges sind beispielsweise: Tumor necrosis factor receptor associated factor

(TRAF), NF-kB inducing kinase (NIK), Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1 (MEKKK1), Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 3 (MEKKK3), AKR mouse thymoma Kinase (AKT), TGFß activated kinase (TAK1), Inhibitor of NF-kB kinase alpha (IKKalpha), Inhibitor of NF-kB kinase beta (IKKbeta), NEMO, Inhibitor von kB (IkB), RELA (p65), C-REL, RELB, NF-kB1 (p105), NF-kB2 (p100), P50, P52.

Zu den erfindungsgemäß einsetzbaren Wirksubstanzen gehören beispielsweise: Inhibitoren einer Kinase des NF-kB Signalübertragungsweges [hierzu gehören nicht-steroidale anti-inflammatorische, die NF-kB Aktivierung inhibierende Substanzen, wie beispielsweise Phenylalkylsäurederivate wie beispielsweise Sulindac (Yamamoto et al., J Biol Chem 274,27307-27314, 1999; Berman et al Clin Cancer Res 8, 354-360, 2002) oder Derivate von Sulindac wie Sulindac- Sulfoxid, Sulidac- Sulfon, Sulindac- Sulfid, Benzylamid Sulindac-Analoga (Moon und Lerner, Cancer Research 62, 5711-5719,2002), Salicylsäurederivate wie beispielsweise Salicylsäure selber oder Acetylsalizylsäure (Yin et al., Nature 396, 77-80,1998) Salicylamid, Salacetamid, Ethenzamid, Diflunisal, Olsalazin oder Salazosulfapyridin, Curcumin (Oncogene 18, 6013-6020, 1999), Antioxidantien wie Pyrrolidine-dithiocarbamate (PDTC; Piette et al. Biol Chem 378, 1237-1245, 1997), Oxicame wie beispielsweise Piroxicam (Liu et al., J Biol Chem 13,---, 2002), Vitamin E und Derivate hiervon, wie beispielsweise Pentamethyl-hydroxychroman (PMC, Hattori et al., Biochem Mol Biol Int 35, 177-183, 1995), 17 beta Oestradiol und Derivate hiervon (Deshpande et al Am J Reprod Immunol 38, 46-54, 1997), Polyphenole des Tees wie beispielsweise (-)-epigallocatechin-3-gallat (EGCG, Lin et al Biochem Pharmacol 58, 911-915, 1999), Bay11-7182 Misra und Pizzo Arch Biochem Biophys 386, 227-232,2001)], Peptide, welche die Interaktion von mindestens zwei Komponenten des NF-kB Signalübertragungsweges inhibieren;

hierzu gehören beispielsweise an NEMO bindende Peptide (May et al Science 289, 1550-1554, 2000), Inhibitoren des Proteosoms, wie beispielsweise PS-341 (Tan und Waldmann, Cancer Res 62, 1083-1086, 2002; Adams Trends Mol Med 8, 49-54, 2002) und Lactacystin (Morise und Grisham J Clin Gastroenterol 27, 87-90,1998), Antisense-Oligonukleotide, welche sich spezifisch an die DNA-Sequenz oder m-RNA Sequenz kodierend für eine Komponente des NF-kB Signalübertragungsweges anlagern und deren Transkription oder Translation inhibieren, beispielsweise Antisense Nukleotidsequenzen spezifisch für p65 oder p50 (Higgins et al PNAS-USA 90, 9901-9905,1993), Dominant negative Mutanten einer Komponente des NF-kB Signalüber- tragungsweges; dsOligonukleotide, die geeignet sind zur gezielten Degradierung der mRNAs einer Komponente des NF-kB Signalübertragungsweges durch die RNAi-Technologie entsprechend der Methode, wie von Tuschl et al (Genes Dev 13: 3191-3197, 1999) und von Zamore et al (Cell 101: 25-33, 2000) beschrieben, Antikörper oder Antikörperfragmente spezifisch für eine Komponente des NF-kB Signalübertragungsweges, oder Fusionsproteine, enthaltend mindestens ein Antikörperfragment, beispielsweise ein Fv-Fragment, welche mindestens eine Komponente des NF-kB Signalübertragungsweges inhibieren.

Wirksubstanz im Sinne der vorliegenden Erfindung ist eine Substanz, die in der Lage ist, auf mindestens eine Komponente des NF-kB Signalübertragungsweges direkt derart einzuwirken, dass eine Virusvermehrung im wesentlichen gehemmt ist. Weiterhin sind als Wirksubstanzen im Sinne dieser Erfindung Derivate dieser Wirksubstanzen zu verstehen, die beispielsweise durch enzymatische Spaltung in eine erfindungsgemäße aktive Wirksubstanz umgewandelt werden. Wirksubstanzen im Sinne der vorliegenden Erfindung sind außerdem Vorstufen von Wirksubstanzen, welche metabolisch in eine erfindungsgemäß aktive Substanz umgewandelt werden.

Bevorzugt erfolgt die Verwendung mindestens einer erfindungsgemäßen Wirksubstanz zur Prophylaxe oder Therapie einer Viruserkrankungen, die durch RNA- oder DNA-Viren, vorzugsweise Negativstrang-RNA Viren, beispielsweise Influenza-Viren, oder Borna-Viren, hervorgerufen werden. Hierzu wird die erfindungsgemäße Wirksubstanz systemisch oder lokal, beispielsweise dermal, nasal, aerogen, in eine Körperhöhle oder in ein Gewebe verabreicht.

Weiterhin bevorzugt ist die Verwendung von Acetylsalizylsäure zur Prophylaxe oder Therapie einer Influenza-Virus-Infektion, wobei die Acetylsalizylsäure nasal oder bronchial (aerogen) in Konzentrationen von vorzugsweise 0,1 bis 4 mM verabreicht wird. Die Gesamtdosis einer pro Tag beim Menschen sollte zweckmäßigerweise im Bereich von 0,1 bis 30 mg (nasal) bzw. von 0,1 bis 70 mg (bronchial) liegen. Je nach Anwendung kann die Untergrenze aber auch zwischen 0,1 und 20 mg bzw. 50 mg liegen. Je nach Anwendung kann aber auch die Obergrenze zwischen 1 mg bzw. 2 mg und den angegebenen Maximalwerten liegen. Eine Tagesdosis wird vorteilhafterweise in 1 bis 8 Gaben verabreicht, welche zweckmäßigerweise gleichmäßig über eine Wachdauer von 16 Stunden verteilt sind. Eine Behandlung erfolgt zweckmäßigerweise über einen Zeitraum von 1 bis 7 Tagen und länger. Die Erfindung umfaßt insofern auch galenisch hergerichtete Gabeeinheiten, wobei die in einer Gabeeinheit vorliegende Menge des Wirkstoffes gemäß vorstehenden Bereichen eines Behandlungsplanes unschwer errechenbar ist.

Eine weitere Ausführungsform der vorliegenden Erfindung betrifft ein Kombinationspräparat für die Prophylaxe und/oder Therapie einer Viruserkrankung, enthaltend mindestens zwei antiviral wirkende Wirksubstanzen, wobei mindestens eine antiviral

wirkende Wirksubstanz mindestens eine Komponente des NF-kB Signalübertragungsweges derart hemmt, dass die Vermehrung des Virus in einem Organismus gehemmt wird. Vorzugsweise wird diese antiviral wirkende Wirksubstanz ausgewählt aus den bereits vorstehend aufgeführten erfindungsgemäßen Wirksubstanzen. Zu den weiteren antiviral wirkenden Wirksubstanzen in dem erfindungsgemäßen Kombinationspräparat gehören entweder mindestens eine andere erfindungsgemäße Wirksubstanz und/oder mindestens eine antvirale Wirksubstanz wie beispielsweise: Amantadin (1-Adamantanamin) und dessen Derivate, welches bzw. welche gegen ein Transmembranprotein von einigen Influenza-A Viren gerichtet ist bzw. sind, wie beispielsweise das Rimantadine, Therapeutika für Influenzainfektionen, die das Influenza-virale Oberflächenprotein Neuraminidase hemmen. Hierzu gehört beispielsweise Relanza, Inhibitoren des Raf-MEK-ERK- Signalübertragungsweges wie zum Beispiel U0126 oder weiterer Inhibitoren, wie sie in der PCT/DE 01/01292 beschrieben wurden, Inhibitoren des MEKK/SEK-Signalübertragungsweges oder der Komponenten weiterer Signalübertragungswege wie sie in der DE 10138 912 beschrieben wurden und synthetische Nucleosidanaloga wie beispielweise 3-Deaza adenosin und Ribavirin.

Das Kombinationspräparat kann in Form eines Gemisches oder als einzelne Komponenten zur gleichzeitigen oder zeitlich unterschiedlichen Anwendung an gleichen oder unterschiedlichen Orten systemisch oder lokal angewendet werden. Es gelten die vorstehend zu Darreichungsformen getroffenen Ausführungen analog.

Die Verabreichung des Kombinationspräparates kann als Mischung der Wirksubstanzen erfolgen. Die Wirksubstanzen können pro Verabreichung jedoch auch getrennt voneinander an dem gleichen Ort, beispielsweise systemisch durch intravenöse Injektion oder lokal, beispielsweise durch nasale, aerogene oder dermale

Verabreichung oder durch Injektion in ein Gewebe oder auch an voneinander getrennten Orten, gleichzeitig oder auch zu unterschiedlichen Zeitpunkten innerhalb eines Zeitraumes, in welchem die zuerst verabreichte Substanz noch Wirkung zeigt, beispielsweise in einem Zeitraum von drei Tagen, verabreicht werden.

Eine besondere Form der Verabreichung der erfindungsgemäßen Wirksubstanz im Sinne der Erfindung ist die aerogene, das heißt nasale oder bronchiale Verabreichung der Wirksubstanz zur Prophylaxe oder Therapie derjenigen Virusinfektionen, welche aerogen infizieren. Hierzu werden galenische Hilfsmittel und Zerstäuber der Wirksubstanz verwendet, wie sie dem Fachmann hinreichend bekannt sind.

Eine weitere Ausführungsform der vorliegenden Erfindung betrifft ein Testsystem zum Auffinden von Wirksubstanzen, welche mindestens eine Komponente des NF-kB Signalübertragungsweges derart hemmen, dass eine Virusvermehrung gehemmt wird, enthaltend a. mindestens eine mit mindestens einem Virus infizierbare Zelle, die den NF-kB Signalübertragungsweg enthält und mindestens einen die Zellen infizierenden Virus oder b. mindestens eine mit mindestens einem Virus infizierte Zelle, bei welcher mindestens eine Komponente des NF-kB Signalübertragungsweges fehlt oder defekt mutiert ist.

Zellen im Sinne der vorliegenden Erfindung sind Zellen aus unterschiedlichen Organen und Geweben, beispielsweise Zellen der Blut- und Lymphgefäße, Zellen, die Körperhöhlen auskleiden. Ebenfalls umfasst sind Zellkulturen, besonders solche, welche von Zellbanken, beispielsweise der ATCC, zu erwerben sind, insbesonders permissive, eukaryotische Zellkulturen, beispielsweise A549, 293, 293T und 293T7 (*Homo sapiens*), B82, NIH 3T3, L929 aus *Mus musculus*, BHK aus *Cricetus cricetus*, CHO aus *Cricetulus*

griseus, MDCK aus *Canis familiaris*, Vero, COS-1 und COS-7 aus *Cercopithecus aethiops*, sowie primäre Embryo-Fibroblasten aus *Gallus gallus* (CEF cells).

Beispielsweise wird in dem erfindungsgemäßen Testsystem zum Auffinden von Wirksubstanzen durch Zugabe von Substanzen, vorzugsweise in Konzentrationen von 0.001 µM bis 100 µM, und Viren in einer Partikelzahl, welche die ausgewählte Zelle infizieren können, geprüft, ob eine Substanz in der Lage ist, die Virusvermehrung zu hemmen, ohne die Zelle zu schädigen.

Vorzugsweise handelt es sich bei dem in dem erfindungsgemäßen Testsystem verwendeten Virus um ein RNA- oder DNA-Virus, vorzugsweise um ein Influenza-Virus.

In einer bevorzugten Ausführungsform enthält die Zelle a) des erfindungsgemäßen Testsystems mindestens eine überexprimierte Komponente des NF-kB Signalübertragungsweges, auch in Form von konstitutiv aktiven Mutanten dieser Komponenten, insbesondere durch Einführung eines oder mehrerer diese Komponente kodierenden Gens bzw. Gene. Durch diese Überexpression werden Substanzen entdeckt, welche diese Komponente sowohl stark inhibieren wie auch intrazellulär zur Inhibition der überexprimierten Komponente eine hohe Konzentration erreichen können. Zur Kontrolle ist in einer Zelle b) des erfindungsgemäßen Testsystems die Expression für mindestens eine Komponente des NF-kB Signalübertragungsweges inhibiert, beispielsweise durch die Einführung einer antisense DNA oder einer antisense RNA oder durch die Einführung mindestens eines Gens kodierend für mindestens eine dominant-negative Mutante mindestens einer Komponente des NF-kB Signalübertragungsweges.

Eine weitere Ausführungsform der vorliegenden Erfindung betrifft ein Verfahren zum Auffinden von mindestens einer

erfindungsgemäßen Wirksubstanz zur Prophylaxe und/oder Therapie von Viruserkrankungen, welche die Vermehrung von Viren bei Viruserkrankungen hemmt bzw. hemmen, enthaltend folgende Schritte: a. Inkontaktbringen mindestens eines erfindungsgemäßen Testsystems mit mindestens einer potentiellen Wirksubstanz, und b. Bestimmung der Auswirkung auf die Virusvermehrung.

Inkontaktbringen im Sinne dieser Erfindung kann beispielsweise durch Zugabe der Wirksubstanzen in das Nährmedium einer Zellkultur oder durch lokale oder systemische Verabreichung der Wirksubstanzen in einen Organismus erfolgen.

Inkontaktbringen im Sinne der vorliegenden Erfindung umfasst ebenfalls die nach dem Stand der Technik üblichen Verfahren, die das Einführen von Substanzen in intakte Zellen erlauben, beispielsweise Infektion, Transduktion, Transfektion und/oder Transformation und weitere dem Fachmann bekannte Methoden. Diese Verfahren sind insbesondere bevorzugt, wenn es sich bei der Substanz um Viren, nackte Nukleinsäuren, beispielsweise antisense DNA und/oder antisense RNA, Viroide, Virosomen und/oder Liposomen handelt, wobei Virosomen und Liposomen ebenfalls geeignet sind, neben einem Nukleinsäuremolekül weitere Wirksubstanzen in die Zelle zu bringen.

Das Bestimmen der Auswirkung auf die Virusvermehrung erfolgt beispielsweise durch Plaque-Assays oder durch Bestimmung der HA-Units zum Vergleich des Virustiters behandelter und nicht behandelter infizierter Zellen.

Eine weitere bevorzugte Ausführungsform der vorliegenden Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung eines Arzneimittels zur Prophylaxe und/oder Therapie von mindestens einer Viruserkrankung, welche die Vermehrung von Viren bei

Viruserkrankungen hemmt bzw. hemmen, enthaltend folgende Schritte: a. Durchführen eines erfindungsgemäßen Testsystems und b. Versetzen des/der aufgefundenen und in physiologisch wirksamer Dosis dosierten Wirksubstanz/en mit mindestens einem Hilfs- und/oder Zusatzstoff und definierter galenischer Herrichtung.

Vorzugsweise wird die Wirksubstanz gemäß vorliegender Erfindung für die lokale oder systemische Verabreichung in einen Organismus mit Hilfe der dem Fachmann geläufigen Methoden und Hilfs- und/oder Zusatzstoffen zu einem Arzneimittel zubereitet.

Geeignete Hilfs- und Zusatzstoffe, die beispielsweise der Stabilisierung oder Konservierung des Arzneimittels oder Diagnostikums dienen, sind dem Fachmann allgemein bekannt (siehe z. B. Sucker H et al., (1991) Pharmazeutische Technologie, 2. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart). Beispiele für solche Hilfs- und/oder Zusatzstoffe sind physiologische Kochsalzlösungen, Ringer-Dextrose, Dextrose, Ringer-Laktat, entmineralisiertes Wasser, Stabilisatoren, Antioxidantien, Komplexbildner, antimikrobielle Verbindungen, Proteinaseinhibitoren und/oder inerte Gase.

Die lokale Verabreichung kann beispielsweise auf die Haut, auf die Schleimhaut, in eine Körperhöhle, in ein Organ, in ein Gelenk oder in das Binde- oder Stützgewebe nasal oder aerogen erfolgen. Die systemische Verabreichung erfolgt vorzugsweise in den Blutkreislauf, in die Peritonealhöhle oder in die Bauchhöhle.

Die Arzneimittelzubereitung enthaltend die erfindungsgemäße Wirksubstanz richtet sich nach der Art der Wirksubstanz und der Art ihrer Verabreichung und kann beispielsweise eine Lösung, eine Suspension, eine Salbe, ein Puder, eine Sprayform oder eine

andere Inhalationszubereitung darstellen. Vorzugsweise werden Nukleotidsequenzen mit dem Fachmann bekannten Methoden in einen viralen Vektor oder ein Plasmid eingefügt und mit Hilfsstoffen für die Zelltransfektion versetzt. Zu diesen Hilfsstoffen gehören beispielsweise kationische Polymere oder kationische Lipide. Antisense-Oligonukleotide werden mit den dem Fachmann geläufigen Methoden derivatisiert, um sie vor dem enzymatischen Abbau durch DNAsen oder RNAsen zu schützen.

Die Wirksubstanz gemäß der Erfindung kann in Form eines Salzes, Esters, Amids oder als eine Vorstufe vorliegen, wobei vorzugsweise nur Modifikationen der Wirksubstanz verwendet werden, die keine übermäßige Toxizität, Irritationen oder allergische Reaktionen am Patienten auslösen.

Die Wirksubstanz wird unter sterilen Bedingungen, mit einem physiologisch akzeptablen Trägerstoff und möglichen Preservativen, Puffern oder Treibmitteln, je nach Bedarf, vermischt. Derartige Trägerstoffe für Arzneimittelzubereitungen sind dem Fachmann geläufig.

Bevorzugt wird die erfindungsgemäße Wirksubstanz in einer einmaligen Dosis, besonders bevorzugt in mehreren Dosen verabreicht, wobei die einzelnen Dosen die maximal tolerable Dosis (MTD) der jeweiligen Wirksubstanz für den Menschen nicht übersteigt. Vorzugsweise wird eine Dosis gewählt, welche die Hälfte der MTD beträgt. Die Tagesdosis kann einmalig am Tag oder in mehreren Teilportionen aufgeteilt über den Tag hinweg, vorzugsweise in etwa gleichen Zeitabständen verabreicht werden.

Gemäß der vorliegenden Erfindung kann die Verabreichung entweder lokal oder systemisch, nur an einem Tag oder über mehrere Tage

täglich oder an jedem zweiten oder dritten Tag über mehrere Wochen erfolgen, bis eine therapeutische Wirkung sichtbar wird.

Beispiel 1: Testsystem zur Auffindung von antiviralen Wirkstoffen

Mit Hilfe retroviraler Transduktion der humanen Lungenepithelzellen A549, der caninen Nierenepitehlzellen MDCK und der Affenzellen Vero wurden Zelllinien hergestellt, welche stabil entweder eine dominant negative Form der IKK (IKK KD) oder eine dominant-interferierende mutierte Form des Inhibitors von NF-kB, mIkB, exprimieren. Darüber hinaus wurden ebenfalls entsprechende Linien generiert, welche eine aktive Form der IKK (IKK EE) exprimieren. Sowohl die Konstrukte als auch Ihre Wirksamkeit auf die NF-kB vermittelte Genexpression in Zellen wurden bereits beschrieben (Denk et al J Biol Chem 276, 28451-28458, 2001).

Zur Generierung der stabilen Zelllinen wurde die entsprechenden cDNAs für IKK KD, mIkB und IKK EE in sense-Orientierung in den retroviralen Expressionsvektor pCFG5 IEGZ (Kuss et al. Eur J Immunol 29,3077-3088,1999) einkloniert. Neben der Boten-RNA des ´gene of interest´ kodiert die Vektor DNA noch für die Boten-RNA des "green fluorescent protein" (GFP), welches während der Proteinsynthese ausgehend von einer internen Ribosomenbindestelle exprimiert wird. Dies erlaubt die Identifizierung stabil transduzierter Zellen in der Durchflusszytometrie. Darüber hinaus vermittelt der Vektor eine Resistenz gegen das Antibiotikum Zeocin. Die verschiedenen Expressionskonstrukte sowie der Leervektor wurden mit Hilfe der Calciumphosphatprezipitationsmethode in die virusproduzierende Zelline ØNX (Grignani et al., Cancer Res 58,14-19,1998) transfiziert (Denk et al., J Biol Chem 276, 28451-28458, 2001). Die Transfektionseffizienz wurde nach 24h

anhand der GFP Expression kontrolliert und war in der Größenordnung von 70-80%. Die Zellen wurden darauf hin für ca. 2 Wochen mit 1mg/ml Zeocin im Medium selektioniert.

Zur Infektion der verschiedenen Zielzellen (A549, MDCK, Vero) mit den rekombinanten Retroviren wurden die retrovirushaltigen Mediumüberstände der virusproduzierenden Zellinien filtriert, mit 5 µg/ml Polybrene (Sigma) versetzt und auf frische Zellen gegeben. Die Infektion erfolgte während 2mal 3-stündiger Zentrifugation (1000xg) an zwei aufeinander folgenden Tagen. Stabil transduzierte Zellen wurden 24h nach Infektion für zwei weitere Wochen mit 400-600 µg/ml Zeozin im Mediumüberstand selektioniert. Nach der so erfolgten Generierung der stabilen Zellinien wurden sowohl diese als auch Wildtyp Influenza A Virus wie im folgenden beschrieben infiziert und die Virustiter von Zellen, welche stabil den Vektor, IKK KD, mIkB und IKK EE trugen im Vergleich zum Titer aus dem Überstand von Wildtyp Zellen bestimmt.

Parallel wurden MDCK Zellen mit Hilfe des Transfektionsreagenz Lipofectamine 2000 (Life Technologies) nach Standardmethoden (Ludwig et al., J Biol Chem 276,10990-10998, 2001) mit den gleichen Konstrukten transient transfiziert. Die Transfektionseffizienzen lagen bei >60%. 24h nach Transfektion erfolgte wie bei den stabilen Linien Infektion mit dem Influenza A Virusstamm fowl plaque virus (FPV) mit einer Multiplizität der Infektion von 1 (M.O.I.=1). Weitere 24h nach Infektion wurden die Titer der neu gebildeten Viren im Zellkulturüberstand in Standard Plaque-Assays auf MDCK Zellen überprüft. Verglichen wurde auch hier der Virustiter von Influenza A Virus-infizierten Zellen, welche entweder mit dem Leervektor oder Konstrukten welche IKK KD, mIkB und IKK EE exprimierten, transfiziert waren.

Es zeigten sich die folgenden Ergebnisse. Der Vergleich der Virustiter von Influenza A Virus-infizierten MDCK Zellen, welche zuvor entweder mit dem Leervektor oder einem Konstrukt, welches IKK KD oder mIkB exprimierte, transfiziert worden waren, zeigte, dass in IKK KD oder mIkB exprimierenden Zellen die Vermehrung der Viren nach 24h zu 50%-70% gehemmt war. Entsprechend fand man in Zellen, welche die aktive Form von IKK, IKK EE exprimierten, ein Steigerung der Virusvermehrung. Diese Ergebnisse waren in mehreren unabhängigen Ansätzen reproduzierbar. Entsprechende Ergebnisse konnten auch in den stabilen A549, MDCK und Vero Zelllinien erhalten werden, welche entweder IKK KD, mIkB oder IKK EE exprimierten, wobei die größten Effekte in stabil transfizierten A549 Zellen beobachtet wurden. Hier führte eine Hemmung der NF-kB Aktivierung durch IKK KD oder mIkB zu einer bis zu 10-fachen Reduktion der Virustiter, während konstitutive Aktivierung des Signalwegs durch stabile Expression von IKK EE die Virusausbeute um das zehnfache verstärkte. Diese Befunde zeigen, dass Aktivierung von IKK und NF-kB essentiell für die Influenza Virus Vermehrung ist und die spezifische Inhibition des IKK/NF-kB Signalmoduls s zu einer signifikanten Reduktion der Virusproduktion führt.

Beispiel 2: Hemmung der viralen NF-kB Aktivierung und Reduktion der Influenza Virus in vitro

2.1: Acetylsalizylsäure (ASS)

Salicylate, wie ASS oder Sulfosalazine finden weitgehende klinische Anwendung als Schmerzmittel und antiinflammatorische Agenzien. Neuere Publikationen zeigen, dass diese Substanzen direkte und effektive Inhibitoren der IKK sind (Yin et al., Nature 396, 77-80, 1998; Weber et al., Gastroenterology

119,1209-1218, 2000) wie auch in vitro die Vermehrung von Influenzaviren hemmen können (Huang und Dietsch, New Engl J Med 319,797,1988). Als Positivkontrolle diente somit ASS. A549 Lungenepithelzellen wurden mit ansteigenden Konzentrationen von ASS im Bereich 0,01 mM-5mM behandelt. Diese Konzentrationen verblieben über das gesamte Experiment im Kulturmedium. Eine Stunde nach Behandlung erfolgte Infektion mit dem Influenza A Virusstamm fowl plaque virus (FPV) mit einer Multiplizität der Infektion von 1 (M.O.I.=1). Weitere 24h nach Infektion wurden die Titer der neu gebildeten Viren im Zellkulturüberstand in Standard Plaque-Assays auf MDCK Zellen überprüft.

In einem zweiten Ansatz wurden MDCK Zellen ein Stunde vor Infektion bzw. zwei und vier Stunden nach Infektion mit 5 mM ASS behandelt. Infektion und Nachweis der neu-gebildeten Viren erfolgte wie oben.

Es zeigten sich die folgenden Ergebnisse. Nach Vergleich der Virustiter aus A549 Kulturüberständen 24h p.i. von nicht ASS-behandelten mit ASS-behandelten Zellen ergab sich ein konzentrationsabhängige Inhibition der Virusvermehrung, die jedoch erst deutlich war bei 5mM und hier 2 log Stufen umfasste. Eine entsprechende hemmende Wirkung (> 2 log Stufen) von 5mM ASS konnte auch bei infizierten MDCK Zellen beobachtet werden, wobei hier bei Zugabe von ASS 4h nach Infektion immer noch eine Reduktion der Virustiter um das 10-fache bewirkte.

2.2: Pyrrolidine-dithiocarbamate (PDTC)

Antioxidantien wie Pyrrolidine-dithiocarbamate (PDTC) sind hinlänglich als Inhibitoren von NF-kB Aktivierung bekannt (Übersicht in: Piette et al., Biol Chem 378, 1237-1245, 1997). Daher

wurde untersucht, ob auch diese Substanzklasse hemmend auf die Influenza Virus Vermehrung wirken kann. A549 Zellen wurden eine Stunde vor Infektion mit PDTC in Konzentrationen von 3-24 micromolar behandelt. Infektion und Nachweis der neu-gebildeten Viren 24h p.i. erfolgte wie für ASS beschrieben in An- bzw. Abwesenheit von PDTC über das gesamte Experiment.

Es zeigten sich die folgenden Ergebnisse. Auch PDTC Behandlung führte zu einer konzentrationsabhängigen Inhibition der Virustiter in A549 Zellen bis zu hin zu einer etwa 10-fachen Reduktion bei Gabe der maximal eingesetzten Konzentration von 24 micromolar. Diese Daten zeigen, dass die IKK und NF-kB hemmenden Agenzien ASS und PDTC, analog der Wirkung dominant-negativer Mutanten aus dem NF-kB Signalmodul, einen signifikant hemmenden Effekt auf die Influenza Virus-Vermehrung in Zellkultur haben.

Beispiel 3: Wirkung von ASS auf die Influenzainfektion in der Maus

3.1: i.p./parenterale Verabreichung

C57 Bl/6 Mäuse wurden mit 5000 pfu/20µl Influenza-Virus (Fowl Plague Virus ,FPV) nasal infiziert. 30 min vor Infektion wurden 500µl ASS (50mM = 9mg/ml PBS, Sigma-Aldrich Steinheim) i.p. injiziert, nachfolgend wurde ASS (50 mM = 9mg/ml) kontinuierlich im Trinkwasser verabreicht. Zur Kontrolle wurde PBS injiziert bzw, verabreicht. Körpergewicht, Todesrate und Überlebensdauer wurde bestimmt. Pro Gruppe wurden 30 Mäuse behandelt.

Es zeigten sich die folgenden Ergebnisse. Während in der Kontrollgruppe alle Tiere an Influenza starben, überlebten in der ASS Gruppe etwa 20% der Tiere die Infektion. Des weiteren war die mittlere Überlebenszeit der verstorbenen Tiere im Vergleich

zur Kontrollgruppe deutlich verlängert. ASS in Konzentrationen von 50 mM verabreicht führte jedoch zu einer deutlichen Verminderung des Körpergewichtes aufgrund der toxischen Dosis.

3.2: aerogene Verabreichung

C57 Bl/6 Mäuse wurden mit 5000 pfu/20µl bzw mit 10.000 pfu/20 ml Influenza-Virus (Fowl Plague Virus ,FPV) nasal infiziert. Bei Behandlungsbeginn am Tag 0 wurde 30 min nach der Infektion in die Mäuse unter Betäubung (i.p. Injektion von 300µl Ketamin/Rompun; Serum Werk Bernburg; Bayer Ag Leverkusen) ein Tracheotubus eingeführt und mit Hilfe eines Nebulizers (Hugo Sachs Elektronik-Harvard App.GmbH March-Hugstetten) Aerosol (Verabreichung von 600 µl) enthaltend 2mM (= 0,36mg/ml PBS), 10 mM, 20mM oder 50 mM ASS (Sigma-Aldrich Steinheim) oder zur Kontrolle nur PBS verabreicht. Diese aerogene Verabreichung der Prüfsubstanzen wurde in einigen Gruppen an den Tagen 1, 2, 3 oder 1, 2, 5 und 6 wiederholt. In weiteren Gruppen wurde die Behandlung mit ASS an den Tagen 3, 4, 5, 6 nach Infektion durchgeführt. Pro Gruppe wurden 5-6 Tiere behandelt. Körpergewicht, Todesrate und Überlebensdauer wurde bestimmt. In einem weiteren Versuch wurden nach Behandlung mit ASS am Tag 1 am Tag 3 die Tiere getötet und die Viruskonzentration in dem Lungengewebe bestimmt.

Es zeigten sich die folgenden Ergebnisse. Geringere Dosen von ASS reduzierten die Viren in der Lunge deutlicher als hohe Dosen. ASS erwies sich ab 20 mM als toxisch (Abnahme des Körpergewichtes). Während in der Kontrollgruppe alle Tiere an Influenza starben, überlebten in den Gruppen behandelt mit niedrigen nichttoxischen Dosen (2mM) von ASS etwa 40% die Infektion. Des weiteren war die mittlere Überlebenszeit der

verstorbenen Tiere nach ASS im Vergleich zur Kontrollgruppe deutlich verlängert.

Die Ergebnisse in vivo Experimente gemäß der Beispiele 3.1 und 3.2 zeigen, dass die einfache oder mehrfache (bis zu 3x) tägliche aerogene Verabreichung von ASS in niedriger nichtoxischer Dosis, i.e. in Dosen von 0,1 mg/kg bis 300 mg/kg Körpergewicht, insbesondere 10 mg/kg bis 100 mg/kg, vorzugsweise 20 mg/kg bis 50 mg/kg, beispielsweise 30 mg/kg, zu einer deutlichen therapeutischen Wirkung gegen eine tödliche durch nasale Verabreichung des Influenza-Virus induzierte Erkrankung führt. Dabei sollte die Formulierung so gewählt sein, dass die aerogen zu verabreichende pharmazeutische Zusammensetzung ASS in Konzentrationen unterhalb 2 mM, vorzugsweise 0,01 mM bis 1,99 mM, höchstvorzugsweise 0,1 mM oder 0,5 mM bis 1,5 mM, beispielsweise 1 mM liegt. Die Flüssigphasenmenge an Aerosol ist dabei entsprechend der oben angegebenen Tagesdosen unter Berücksichtigung der eingesetzten Konzentration in der Flüssigphase auszurechnen und einzurichten. Letzteres läßt sich beispielsweise mit üblichen Zerstäubungsvorrichtungen erreichen, welche definierte Mengen einer Lösung zu einem Aerosol versprühen.

Patentansprüche

1) Verwendung mindestens einer Wirksubstanz, welche eine Komponente des NF-kB Signalübertragungsweges derart hemmt, dass eine Virusvermehrung gehemmt wird zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Prophylaxe und/oder Therapie von mindestens einer Viruserkrankung.

2) Verwendung mindestens einer Wirksubstanz nach Anspruch 1, wobei die Komponente des NF-kB Signalübertragungsweges ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus "Tumor necrosis factor receptor associated factor (TRAF), NF-kB inducing kinase (NIK), Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1 (MEKKK1), Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 3 (MEKKK3), AKR mouse thymoma Kinase (AKT), TGFß activated kinase (TAK1), Inhibitor of NF-kB kinase alpha (IKKalpha), Inhibitor of NF-kB kinase beta (IKKbeta), NEMO, Inhibitor von kB (IkB), RELA (p65), C-REL, RELB, NF-kB1 (p105), NF-kB2 (p100), P50, P52

3) Verwendung mindestens einer Wirksubstanz nach einem der Ansprüche 1 bis 2, wobei die Wirksubstanz(en) aus der Gruppe bestehend aus "Inhibitoren einer Kinase des NF-kB Signalübertragungsweges, z.B. nicht-steroidale anti-inflammatorische, die NF-kB Aktivierung inhibierende Substanzen wie beispielsweise Phenylalkylsäurederivate wie beispielsweise Sulindac oder Derivate von Sulindac wie Sulindac- Sulfoxid, Sulidac-Sulfon, Sulindac- Sulfid, Benzylamid Sulindac-Analoga, Salicylsäurederivate, wie beispielsweise Salicylsäure oder Acetylsalizylsäure, Salicylamid, Salacetamid, Ethenzamid, Diflunisal, Olsalazin oder Salazosulfapyridin, Curcumin, Antioxidantien wie Pyrrolidine-dithiocarbamate (PDTC), Oxicame wie beispielsweise Piroxicam, Vitamin E und Derivate hiervon,

wie beispielsweise Pentamethyl-hydroxychroman (PMC), 17 beta Oestradiol und Derivate hiervon, Polyphenole des Tees wie beispielsweise (-) - epigallocatechin-3-gallat (EGCG), Bay11-7182, Peptide, welche die Interaktion von mindestens zwei Komponenten des NF-kB Signalübertragungsweges inhibieren, beispielsweise an NEMO bindende Peptide, Inhibitoren des Proteosoms, beispielsweise PS-341 und Lactacystin, Antisense-Oligonukleotide, welche sich spezifisch an die DNA-Sequenz oder m-RNA Sequenz kodierend für eine Komponente des NF-kB Signalübertragungsweges anlagern und deren Transkription oder Translation inhibieren, beispielsweise Antisense Nukleotidsequenzen spezifisch für p65 oder p50, Dominant negative Mutanten einer Komponente des NF-kB Signalübertragungsweges, dsOligonukleotide, die geeignet sind zur gezielten Degradierung der mRNAs einer Komponente des NF-kB Signalübertragungsweges durch die RNAi-Technologie, Antikörper oder Antikörperfragmente spezifisch für eine Komponente des NF-kB Signalübertragungsweges, oder Fusionsproteine, enthaltend mindestens ein Antikörperfragment, beispielsweise ein Fv-Fragment, welche mindestens eine Komponente des NF-kB Signalübertragungsweges inhibieren

4) Verwendung mindestens einer Wirksubstanz nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei die Viruserkrankung durch Infektion mit RNA- oder DNA-Viren, vorzugsweise Influenza-Viren, hervorgerufen wird.

5) Kombinationspräparat zur Prophylaxe und/oder Therapie von mindestens einer Viruserkrankung, enthaltend mindestens zwei voneinander verschiedene Wirksubstanzen, wobei mindestens eine Wirksubstanz aus der Gruppe gemäß Anspruch 3 ausgewählt ist, wobei das Kombinationspräparat in Form eines Gemisches oder als einzelne Komponenten zur gleichzeitigen oder

zeitlich unterschiedlichen Anwendung an gleichen oder unterschiedlichen Orten anwendbar ist.

6) Kombinationspräparat nach Anspruch 5, bei welchem mindestens eine antiviral wirkende Substanz 1-Adamantanamin, Rimantadine, ein Neuraminidaseinhibitor oder ein Nukleosidanalogon wie Ribavirin ist.

7) Verwendung eines Wirkstoffes oder Kombinationspraeparates nach einem der Ansprüche 1 bis 6 für die Prophyllaxe und/oder Therapie einer Infektion mit Negativstrang-RNA Viren, im besonderen Influenza Viren oder Bornaviren.

8) Verwendung eines Wirkstoffes oder Kombinationspräparat nach einem der Ansprüche 1 bis 7 in einer Zubereitung für die nasale, bronchiale oder aerogene Verabreichung, wobei der Wirkstoff in einer Konzentration von 0,1 bis 4 mM in der Zubereitung vorliegt, wobei die Gesamtmenge des Wirkstoffes pro Gabeeinheit vorzugsweise im Bereich von 0,1 bis 70 mg liegt, wobei die pharmazeutische Zusammensetzung mit der Maßgabe hergerichtet und konfektioniert ist, dass die Tagesdosis beim Menschen 70 mg nicht überschreitet.

9) Testsystem zum Auffinden von Wirksubstanzen, welche auf mindestens eine Komponente des NF-kB Signalübertragungsweges derart wirken dass eine Virusvermehrung im wesentlichen gehemmt wird, enthaltend a. mindestens eine mit mindestens einem Virus infizierbare Zelle, die den NF-kB Signalübertragungsweg enthält und mindestens einen die Zellen infizierenden Virus oder b. mindestens eine mit mindestens einem Virus infizierte Zelle, die den NF-kB Signalübertragungsweg überexprimiert.

10) Testsystem nach Anspruch 9, wobei es sich bei dem Virus um ein RNA- oder DNA-Virus, vorzugsweise um ein Influenza-Virus handelt.

11) Testsystem nach Anspruch 9 oder 10, wobei die Zelle mindestens eine überexprimierte Komponente des NF-kB Signalübertragungsweg, auch in konstitutiv aktiv mutierter Form, enthält.

12) Testsystem nach einem der Ansprüche 9 bis 12, wobei es eine Zelle enthält, in welcher mindestens ein Gen kodierend für mindestens eine dominant negative Mutante mindestens einer Komponente des NF-kB Signalübertragungsweges überexprimiert ist.

13) Testsystem nach einem der Ansprüche 9 bis 12, wobei es eine Zelle enthält, in der die Expression für mindestens eine Komponente des NF-kB Signalübertragungsweges überexprimiert ist.

14) Verfahren zum Auffinden von mindestens einer Wirksubstanz zur Prophylaxe und/oder Therapie von Viruserkrankungen, welche die Vermehrung von Viren bei Viruserkrankungen im wesentlichen hemmen, enthaltend folgende Schritte: a. In- kontaktbringen mindestens eines Testsystems nach einem der Ansprüche 9 bis 13 mit mindestens einer potentiellen Wirksubstanz, b. Bestimmung der Auswirkung auf die Virusvermehrung und c. Selektion einer potentiellen Wirksubstanz als Wirkstoff, wenn die Virusvermehrung gegenüber einer Durchführung der Stufe a. jedoch ohne potentielle Wirksubstanz oder mit einer Wirk-Referenzsubstanz oder mit einer Kontrollsubstanz verringert ist.

15) Verfahren zur Herstellung eines Arzneimittels zur Prophylaxe und/oder Therapie von mindestens einer Viruserkrankung, welches die Vermehrung von Viren bei Viruserkrankungen im wesentlichen hemmt bzw. hemmen, enthaltend folgende Schritte: a. Durchführen eines Testsystems nach einem der Ansprüche 9 bis 14, b. Versetzen des/der aufgefundenen Wirksubstanz/en in physiologisch wirksamer Dosis mit mindestens einem Hilfs- und/oder Zusatzstoff und definierter galenischer Herrichtung.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/DE2004/000012

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 A61K31/00 A61K31/60 A61K31/19 A61K31/40 A61K31/54
A61K31/335 A61K35/78 A61K31/35 A61K31/13 A61K31/70
A61P31/12 A61P31/16

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

B. FIELDS SEARCHED

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

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

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

EPO-Internal, BIOSIS, PAJ, WPI 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 01/83547 A (MAY MICHAEL J ; UNIV YALE (US); GHOSH SANKAR (US)) 8 November 2001 (2001-11-08)	1-5,7
Y	abstract page 4, line 1 - page 5, line 26 page 11, lines 4-16 page 15, line 1 - page 21, line 2 page 25, line 4 - page 30, line 26 claims 1-35; examples 6,8,10	6,8

-/--

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

[X] Patent family members are listed in annex.

° Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

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

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

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

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
1 June 2004	14/06/2004

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/DE2004/000012

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	PRIMACHE V ET AL: "In vitro activity of acetylsalicylic acid on replication of varicella-zoster virus." THE NEW MICROBIOLOGICA : OFFICIAL JOURNAL OF THE ITALIAN SOCIETY FOR MEDICAL, ODONTOIATRIC, AND CLINICAL MICROBIOLOGY (SIMMOC). OCT 1998, vol. 21, no. 4, October 1998 (1998-10), pages 397-401, XP009031179 ISSN: 1121-7138	1-4,7, 9-14
Y	the whole document	5,6,8
X	BROGGINI M ET AL: "Flurbiprofen versus ASA in influenza symptomatology: a double-blind study." INTERNATIONAL JOURNAL OF CLINICAL PHARMACOLOGY RESEARCH. 1986, vol. 6, no. 6, 1986, pages 485-488, XP009031176 ISSN: 0251-1649	1-4,7
Y	the whole document	5,6,8
X	INGLOT A D: "Comparison of the antiviral activity in vitro of some non-steroidal anti-inflammatory drugs." THE JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY. MAR 1969, vol. 4, no. 2, March 1969 (1969-03), pages 203-214, XP009031196 ISSN: 0022-1317	1-4,7
X		5,6,8-15
X	BETTINI R ET AL: "Diclofenac sodium versus acetylsalicylic acid: a randomized study in febrile patients." THE JOURNAL OF INTERNATIONAL MEDICAL RESEARCH. 1986, vol. 14, no. 2, 1986, pages 95-100, XP009031192 ISSN: 0300-0605	1-4,7
Y	the whole document	5,6,8
X	YOUNKIN S W ET AL: "Reduction in fever and symptoms in young adults with influenza A/Brazil/78 H1N1 infection after treatment with aspirin or amantadine." ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY. APR 1983, vol. 23, no. 4, April 1983 (1983-04), pages 577-582, XP009031195 ISSN: 0066-4804	1-4,7
Y	the whole document	5,6,8

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/DE2004/000012

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BERNASCONI P ET AL: "Evaluation of a new pharmaceutical form of nimesulide for the treatment of influenza." DRUGS UNDER EXPERIMENTAL AND CLINICAL RESEARCH. 1985, vol. 11, no. 10, 1985, pages 739-743, XP009031193 ISSN: 0378-6501	1-4,7
Y	abstract	5,6,8
X	MILVIO C: "TREATMENT OF INFLUENZA SYNDROME A DOUBLE-BLIND CONTROLLED TRIAL OF NIMESULIDE VS. ASPIRIN" CLINICAL TRIALS JOURNAL, vol. 22, no. 1, 1985, pages 111-117, XP009031194 ISSN: 0009-9325	1-4,7
Y	abstract	5,6,8
X	HUANG R T ET AL: "Anti-influenza viral activity of aspirin in cell culture." THE NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE. 22 SEP 1988, vol. 319, no. 12, 22 September 1988 (1988-09-22), page 797, XP009031184 ISSN: 0028-4793 cited in the application	1-4,7
Y	the whole document	5,6,8
X	WO 98/52540 A (BARRETT DAVID MICHAEL ; JONES HUW LYN (GB); JONES IDWAL (GB); BOOTS CO) 26 November 1998 (1998-11-26) the whole document	1-8
X	US 6 107 281 A (FURUKAWA SATORU ET AL) 22 August 2000 (2000-08-22)	1-5,7
Y	claims 1-3	6
X	EP 0 417 385 A (SHIMAMURA TADAKATSU ; MITSUI NORIN KK (JP)) 20 March 1991 (1991-03-20) the whole document	1-4,7
Y	COX N J N J ET AL: "Influenza" LANCET, XX, XX, vol. 354, no. 9186, 9 October 1999 (1999-10-09), pages 1277-1282, XP004262683 ISSN: 0140-6736 abstract page 1281, left-hand column, paragraph 4 - page 1281, right-hand column, paragraph 1	5,6,8

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/DE2004/000012

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,Y	MONTO A S: "The role of antivirals in the control of influenza" VACCINE, BUTTERWORTH SCIENTIFIC. GUILDFORD, GB, vol. 21, no. 16, 1 May 2003 (2003-05-01), pages 1796-1800, XP004418060 ISSN: 0264-410X the whole document	5,6
X	YU K-L ET AL: "Novel quinolizidine salicylamide influenza fusion inhibitors" BIOORGANIC & MEDICINAL CHEMISTRY LETTERS, OXFORD, GB, vol. 9, no. 15, 2 August 1999 (1999-08-02), pages 2177-2180, XP004174154 ISSN: 0960-894X the whole document	1-4,7
X	DE 38 32 799 A (HUANG TZONG CHOU PROF DR) 29 March 1990 (1990-03-29)	1-4,7,8
Y	the whole document	5,6
X	GB 2 374 008 A (CARTER JOHN) 9 October 2002 (2002-10-09)	1-5,7
Y	claims 1-3	6,8
X	WO 02/051413 A (SHIRE BIOCHEM INC ; BEDARD JEAN (CA); FALARDEAU GUY (CA); KONG LAVAL C) 4 July 2002 (2002-07-04) page 4, line 3 - page 7, line 10 page 15, line 18 - page 16, line 19 page 19, line 10 - page 23, line 29 claims 1,16	1-4
P,X	US 6 514 955 B1 (VAN DYKE KNOX) 4 February 2003 (2003-02-04) the whole document	1-8
X	US 6 130 226 A (MULLER GEORGE W ET AL) 10 October 2000 (2000-10-10) the whole document	1-4
Y	YIN M-J ET AL: "THE ANTI-INFLAMMATORY AGENTS ASPIRIN AND SALICYLATE INHIBIT THE ACTIVITY OF IKAPPAB KINASE-BETA" NATURE, MACMILLAN JOURNALS LTD. LONDON, GB, vol. 396, 5 November 1998 (1998-11-05), pages 77-80, XP002938591 ISSN: 0028-0836 cited in the application the whole document	1-15

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/DE2004/000012

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	MAY M J ET AL: "Selective inhibition of NF-kB activation by a peptide that blocks the interaction of NEMO with the IkB kinase complex" SCIENCE, AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE,, US, vol. 289, 1 September 2000 (2000-09-01), pages 1550-1554, XP002189523 ISSN: 0036-8075 cited in the application the whole document	1-15
Y	CHU WEN-MING ET AL: "JNK2 and IKKbeta are required for activating the innate response to viral infection" IMMUNITY, vol. 11, no. 6, December 1999 (1999-12), pages 721-731, XP002282727 ISSN: 1074-7613 cited in the application the whole document	1-15
Y		9-15
X	WO 00/50633 A (GEN HOSPITAL CORP ; TING ADRIAN (US); SEED BRIAN (US)) 31 August 2000 (2000-08-31) abstract page 3, line 1 - page 6, line 13 page 14, line 1 - page 29, line 6	1,2,7
Y	claims 1-43	1-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/DE2004/000012

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0183547 A	08-11-2001	AU 5763101 A	12-11-2001
		AU 6116401 A	12-11-2001
		CA 2414290 A1	08-11-2001
		CA 2414296 A1	08-11-2001
		EP 1282643 A2	12-02-2003
		EP 1280820 A2	05-02-2003
		JP 2003531636 T	28-10-2003
		JP 2003531918 T	28-10-2003
		WO 0183554 A2	08-11-2001
		WO 0183547 A2	08-11-2001
		US 2002156000 A1	24-10-2002
		US 2003054999 A1	20-03-2003
WO 9852540 A	26-11-1998	AU 8107998 A	11-12-1998
		WO 9852540 A1	26-11-1998
US 6107281 A	22-08-2000	US 6013632 A	11-01-2000
		AU 5910998 A	03-08-1998
		CA 2277911 A1	16-07-1998
		EP 1007077 A1	14-06-2000
		JP 2001511770 T	14-08-2001
		WO 9830228 A1	16-07-1998
EP 0417385 A	20-03-1991	JP 2727471 B2	11-03-1998
		JP 3101623 A	26-04-1991
		AT 108660 T	15-08-1994
		AU 628513 B2	17-09-1992
		AU 5319490 A	21-03-1991
		CA 2014555 A1	14-03-1991
		DE 69010807 D1	25-08-1994
		DE 69010807 T2	27-10-1994
		EP 0417385 A2	20-03-1991
		KR 180001 B1	20-03-1999
		US 5137922 A	11-08-1992
DE 3832799 A	29-03-1990	DE 3832799 A1	29-03-1990
GB 2374008 A	09-10-2002	EP 1372676 A1	02-01-2004
		WO 02080942 A1	17-10-2002
WO 02051413 A	04-07-2002	WO 02051413 A2	04-07-2002
		US 2002137733 A1	26-09-2002
US 6514955 B1	04-02-2003	US 5686436 A	11-11-1997
		AU 699871 B2	17-12-1998
		AU 3760395 A	26-04-1996
		CA 2201774 A1	11-04-1996
		EP 0784471 A2	23-07-1997
		WO 9610402 A1	11-04-1996
		US 5846961 A	08-12-1998
US 6130226 A	10-10-2000	US 5929117 A	27-07-1999
		US 6262101 B1	17-07-2001
		US 2003045726 A1	06-03-2003
		US 2004019106 A1	29-01-2004
		US 2001056107 A1	27-12-2001
		AT 236872 T	15-04-2003
		AU 729247 B2	25-01-2001

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/DE2004/000012

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 6130226 A		AU 3913897 A	06-03-1998
		CA 2262906 A1	19-02-1998
		CN 1228080 A	08-09-1999
		CZ 9900439 A3	14-07-1999
		DE 69720735 D1	15-05-2003
		DE 69720735 T2	04-03-2004
		DK 918746 T3	04-08-2003
		EP 1361210 A2	12-11-2003
		EP 0918746 A1	02-06-1999
		ES 2197359 T3	01-01-2004
		FI 990180 A	08-03-1999
		HK 1021814 A1	05-12-2003
		HU 9904569 A2	28-05-2000
		JP 2000516616 T	12-12-2000
		KR 2000029913 A	25-05-2000
		NZ 334148 A	21-12-2001
		PL 331605 A1	02-08-1999
		PT 918746 T	29-08-2003
		RU 2188819 C2	10-09-2002
		SK 17799 A3	08-11-1999
		WO 9806692 A1	19-02-1998
WO 0050633 A	31-08-2000	AU 3380200 A	14-09-2000
		EP 1157126 A1	28-11-2001
		JP 2002541779 T	10-12-2002
		WO 0050633 A1	31-08-2000

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/DE2004/000012

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 A61K31/00 A61K31/60 A61K31/19 A61K31/40 A61K31/54
A61K31/335 A61K35/78 A61K31/35 A61K31/13 A61K31/70
A61P31/12 A61P31/16

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

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 A61K

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

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

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 01/83547 A (MAY MICHAEL J ; UNIV YALE (US); GHOSH SANKAR (US)) 8. November 2001 (2001-11-08)	1-5,7
Y	Zusammenfassung Seite 4, Zeile 1 - Seite 5, Zeile 26 Seite 11, Zeilen 4-16 Seite 15, Zeile 1 - Seite 21, Zeile 2 Seite 25, Zeile 4 - Seite 30, Zeile 26 Ansprüche 1-35; Beispiele 6,8,10	6,8

-/--

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

[X] Siehe Anhang Patentfamilie

° Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

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

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

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

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

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

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

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

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

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
1. Juni 2004	14/06/2004

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

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/DE2004/000012

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	PRIMACHE V ET AL: "In vitro activity of acetylsalicylic acid on replication of varicella-zoster virus." THE NEW MICROBIOLOGICA : OFFICIAL JOURNAL OF THE ITALIAN SOCIETY FOR MEDICAL, ODONTOIATRIC, AND CLINICAL MICROBIOLOGY (SIMMOC). OCT 1998, Bd. 21, Nr. 4, Oktober 1998 (1998-10), Seiten 397-401, XP009031179 ISSN: 1121-7138	1-4,7, 9-14
Y	das ganze Dokument	5,6,8
X	BROGGINI M ET AL: "Flurbiprofen versus ASA in influenza symptomatology: a double-blind study." INTERNATIONAL JOURNAL OF CLINICAL PHARMACOLOGY RESEARCH. 1986, Bd. 6, Nr. 6, 1986, Seiten 485-488, XP009031176 ISSN: 0251-1649	1-4,7
Y	das ganze Dokument	5,6,8
X	INGLOT A D: "Comparison of the antiviral activity in vitro of some non-steroidal anti-inflammatory drugs." THE JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY. MAR 1969, Bd. 4, Nr. 2, März 1969 (1969-03), Seiten 203-214, XP009031196 ISSN: 0022-1317	1-4,7
X		5,6,8-15
X	BETTINI R ET AL: "Diclofenac sodium versus acetylsalicylic acid: a randomized study in febrile patients." THE JOURNAL OF INTERNATIONAL MEDICAL RESEARCH. 1986, Bd. 14, Nr. 2, 1986, Seiten 95-100, XP009031192 ISSN: 0300-0605	1-4,7
Y	das ganze Dokument	5,6,8
X	YOUNKIN S W ET AL: "Reduction in fever and symptoms in young adults with influenza A/Brazil/78 H1N1 infection after treatment with aspirin or amantadine." ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY. APR 1983, Bd. 23, Nr. 4, April 1983 (1983-04), Seiten 577-582, XP009031195 ISSN: 0066-4804	1-4,7
Y	das ganze Dokument	5,6,8

-/--

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/DE2004/000012

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	BERNASCONI P ET AL: "Evaluation of a new pharmaceutical form of nimesulide for the treatment of influenza." DRUGS UNDER EXPERIMENTAL AND CLINICAL RESEARCH. 1985, Bd. 11, Nr. 10, 1985, Seiten 739-743, XP009031193 ISSN: 0378-6501	1-4,7
Y	Zusammenfassung	5,6,8
X	MILVIO C: "TREATMENT OF INFLUENZA SYNDROME A DOUBLE-BLIND CONTROLLED TRIAL OF NIMESULIDE VS. ASPIRIN" CLINICAL TRIALS JOURNAL, Bd. 22, Nr. 1, 1985, Seiten 111-117, XP009031194 ISSN: 0009-9325	1-4,7
Y	Zusammenfassung	5,6,8
X	HUANG R T ET AL: "Anti-influenza viral activity of aspirin in cell culture." THE NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE. 22 SEP 1988, Bd. 319, Nr. 12, 22. September 1988 (1988-09-22), Seite 797, XP009031184 ISSN: 0028-4793 in der Anmeldung erwähnt	1-4,7
Y	das ganze Dokument	5,6,8
X	WO 98/52540 A (BARRETT DAVID MICHAEL ; JONES HUW LYN (GB); JONES IDWAL (GB); BOOTS CO) 26. November 1998 (1998-11-26) das ganze Dokument	1-8
X	US 6 107 281 A (FURUKAWA SATORU ET AL) 22. August 2000 (2000-08-22)	1-5,7
Y	Ansprüche 1-3	6
X	EP 0 417 385 A (SHIMAMURA TADAKATSU ; MITSUI NORIN KK (JP)) 20. März 1991 (1991-03-20) das ganze Dokument	1-4,7
Y	COX N J N J ET AL: "Influenza" LANCET, XX, XX, Bd. 354, Nr. 9186, 9. Oktober 1999 (1999-10-09), Seiten 1277-1282, XP004262683 ISSN: 0140-6736 Zusammenfassung Seite 1281, linke Spalte, Absatz 4 - Seite 1281, rechte Spalte, Absatz 1	5,6,8

-/--

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/DE2004/000012

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
P,Y	MONTO A S: "The role of antivirals in the control of influenza" VACCINE, BUTTERWORTH SCIENTIFIC. GUILDFORD, GB, Bd. 21, Nr. 16, 1. Mai 2003 (2003-05-01), Seiten 1796-1800, XP004418060 ISSN: 0264-410X das ganze Dokument	5,6
X	YU K-L ET AL: "Novel quinolizidine salicylamide influenza fusion inhibitors" BIOORGANIC & MEDICINAL CHEMISTRY LETTERS, OXFORD, GB, Bd. 9, Nr. 15, 2. August 1999 (1999-08-02), Seiten 2177-2180, XP004174154 ISSN: 0960-894X das ganze Dokument	1-4,7
X	DE 38 32 799 A (HUANG TZONG CHOU PROF DR) 29. März 1990 (1990-03-29)	1-4,7,8
Y	das ganze Dokument	5,6
X	GB 2 374 008 A (CARTER JOHN) 9. Oktober 2002 (2002-10-09)	1-5,7
Y	Ansprüche 1-3	6,8
X	WO 02/051413 A (SHIRE BIOCHEM INC ; BEDARD JEAN (CA); FALARDEAU GUY (CA); KONG LAVAL C) 4. Juli 2002 (2002-07-04) Seite 4, Zeile 3 - Seite 7, Zeile 10 Seite 15, Zeile 18 - Seite 16, Zeile 19 Seite 19, Zeile 10 - Seite 23, Zeile 29 Ansprüche 1,16	1-4
P,X	US 6 514 955 B1 (VAN DYKE KNOX) 4. Februar 2003 (2003-02-04) das ganze Dokument	1-8
X	US 6 130 226 A (MULLER GEORGE W ET AL) 10. Oktober 2000 (2000-10-10) das ganze Dokument	1-4
Y	YIN M-J ET AL: "THE ANTI-INFLAMMATORY AGENTS ASPIRIN AND SALICYLATE INHIBIT THE ACTIVITY OF IKAPPAB KINASE-BETA" NATURE, MACMILLAN JOURNALS LTD. LONDON, GB, Bd. 396, 5. November 1998 (1998-11-05), Seiten 77-80, XP002938591 ISSN: 0028-0836 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument	1-15

-/--

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/DE2004/000012

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	MAY M J ET AL: "Selective inhibition of NF-kB activation by a peptide that blocks the interaction of NEMO with the IkB kinase complex" SCIENCE, AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE,, US, Bd. 289, 1. September 2000 (2000-09-01), Seiten 1550-1554, XP002189523 ISSN: 0036-8075 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument	1-15
Y	CHU WEN-MING ET AL: "JNK2 and IKKbeta are required for activating the innate response to viral infection" IMMUNITY, Bd. 11, Nr. 6, Dezember 1999 (1999-12), Seiten 721-731, XP002282727 ISSN: 1074-7613 in der Anmeldung erwähnt	1-15
Y	das ganze Dokument	9-15
X	WO 00/50633 A (GEN HOSPITAL CORP ; TING ADRIAN (US); SEED BRIAN (US)) 31. August 2000 (2000-08-31) Zusammenfassung Seite 3, Zeile 1 - Seite 6, Zeile 13 Seite 14, Zeile 1 - Seite 29, Zeile 6	1,2,7
Y	Ansprüche 1-43	1-15

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen
PCT/DE2004/000012

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO 0183547	A	08-11-2001	AU	5763101 A	12-11-2001
			AU	6116401 A	12-11-2001
			CA	2414290 A1	08-11-2001
			CA	2414296 A1	08-11-2001
			EP	1282643 A2	12-02-2003
			EP	1280820 A2	05-02-2003
			JP	2003531636 T	28-10-2003
			JP	2003531918 T	28-10-2003
			WO	0183554 A2	08-11-2001
			WO	0183547 A2	08-11-2001
			US	2002156000 A1	24-10-2002
			US	2003054999 A1	20-03-2003
WO 9852540	A	26-11-1998	AU	8107998 A	11-12-1998
			WO	9852540 A1	26-11-1998
US 6107281	A	22-08-2000	US	6013632 A	11-01-2000
			AU	5910998 A	03-08-1998
			CA	2277911 A1	16-07-1998
			EP	1007077 A1	14-06-2000
			JP	2001511770 T	14-08-2001
			WO	9830228 A1	16-07-1998
EP 0417385	A	20-03-1991	JP	2727471 B2	11-03-1998
			JP	3101623 A	26-04-1991
			AT	108660 T	15-08-1994
			AU	628513 B2	17-09-1992
			AU	5319490 A	21-03-1991
			CA	2014555 A1	14-03-1991
			DE	69010807 D1	25-08-1994
			DE	69010807 T2	27-10-1994
			EP	0417385 A2	20-03-1991
			KR	180001 B1	20-03-1999
			US	5137922 A	11-08-1992
DE 3832799	A	29-03-1990	DE	3832799 A1	29-03-1990
GB 2374008	A	09-10-2002	EP	1372676 A1	02-01-2004
			WO	02080942 A1	17-10-2002
WO 02051413	A	04-07-2002	WO	02051413 A2	04-07-2002
			US	2002137733 A1	26-09-2002
US 6514955	B1	04-02-2003	US	5686436 A	11-11-1997
			AU	699871 B2	17-12-1998
			AU	3760395 A	26-04-1996
			CA	2201774 A1	11-04-1996
			EP	0784471 A2	23-07-1997
			WO	9610402 A1	11-04-1996
			US	5846961 A	08-12-1998
US 6130226	A	10-10-2000	US	5929117 A	27-07-1999
			US	6262101 B1	17-07-2001
			US	2003045726 A1	06-03-2003
			US	2004019106 A1	29-01-2004
			US	2001056107 A1	27-12-2001
			AT	236872 T	15-04-2003
			AU	729247 B2	25-01-2001

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen
PCT/DE2004/000012

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 6130226 A		AU 3913897 A	06-03-1998
		CA 2262906 A1	19-02-1998
		CN 1228080 A	08-09-1999
		CZ 9900439 A3	14-07-1999
		DE 69720735 D1	15-05-2003
		DE 69720735 T2	04-03-2004
		DK 918746 T3	04-08-2003
		EP 1361210 A2	12-11-2003
		EP 0918746 A1	02-06-1999
		ES 2197359 T3	01-01-2004
		FI 990180 A	08-03-1999
		HK 1021814 A1	05-12-2003
		HU 9904569 A2	28-05-2000
		JP 2000516616 T	12-12-2000
		KR 2000029913 A	25-05-2000
		NZ 334148 A	21-12-2001
		PL 331605 A1	02-08-1999
		PT 918746 T	29-08-2003
		RU 2188819 C2	10-09-2002
		SK 17799 A3	08-11-1999
		WO 9806692 A1	19-02-1998
WO 0050633 A	31-08-2000	AU 3380200 A	14-09-2000
		EP 1157126 A1	28-11-2001
		JP 2002541779 T	10-12-2002
		WO 0050633 A1	31-08-2000