



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 10 2005 004 643 A1** 2006.08.10

(12)

Offenlegungsschrift

(21) Aktenzeichen: **10 2005 004 643.6**

(22) Anmeldetag: **28.01.2005**

(43) Offenlegungstag: **10.08.2006**

(51) Int Cl.⁸: **A61K 31/728** (2006.01)

A61K 31/726 (2006.01)

A61P 31/12 (2006.01)

(71) Anmelder:

**Innovent e.V. Technologieentwicklung, 07745
Jena, DE**

(74) Vertreter:

**Bieber, B., Dipl.-Biol. Dr.rer.nat., Pat.-Anw., 07745
Jena**

(72) Erfinder:

**Möller, Stephanie, Dr., 07749 Jena, DE; Schmidtke,
Michaela, Dr., 07745 Jena, DE; Schnabelrauch,
Matthias, Dr., 07749 Jena, DE; Wutzler, Peter,
Prof.Dr., 99102 Windischholzhausen, DE**

(56) Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht
gezogene Druckschriften:

EP 11 75 907 A1

EP 09 40 410 A1

EP 02 70 317 A2

WO 00/44 367 A2

**May, G. und Willuhn, G., In: Arzneimittel-
forschung, 1978, Vol. 28, S. 1-7;**

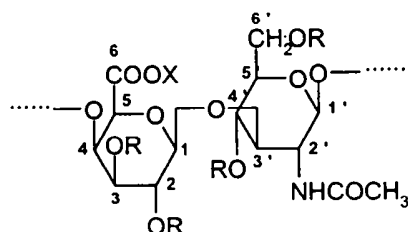
Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gemäß § 44 PatG ist gestellt.

(54) Bezeichnung: **Antivirale Kombinationen sowie ihre Verwendung**

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft antivirale Kombinationen mit sich gegenseitig verstärkender antiviraler Aktivität gegenüber umhüllten Viren und ihre Verwendung.

Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung, neuartige Zusammensetzungen bereitzustellen, die auch in kleinsten Konzentrationen bereits als Virustatika zur wirksamen Prophylaxe und Therapie von Virusinfektionen geeignet sind und die keine toxischen Nebenwirkungen bei ihrer Anwendung zeigen, wird dadurch gelöst, dass die antiviralen Kombinationen mit sich gegenseitig verstärkender antiviraler Aktivität gegenüber umhüllten Viren aus Hyaluronsäuresulfaten und/oder deren carboxyalkylierten Derivaten der allgemeinen Formel,



R = H, (CH₂)_nCOOX, SO₃X

X = H, Na

n = 1, 2

bei denen R H, (CH₂)_nCOOX und/oder SO₃X und X H und/oder Na sowie n = 1 oder 2 bedeuten und aus einem Naturstoff oder Naturstoffextrakt mit antiinflammatorischen und antiviralen Eigenschaften bestehen.

Beschreibung

[0001] Die Erfindung betrifft antivirale Kombinationen mit sich gegenseitig verstärkender antiviraler Aktivität gegenüber umhüllten Viren und ihre Verwendung.

Stand der Technik

[0002] Durch die Entwicklung hoch selektiver Nukleosid- und Nukleotidvirustatika wie z. B. Aciclovir, Penciclovir, Ganciclovir, Brivudin und Cidofovir für Herpesviren sowie z. B. Zidovudine, Diodanosine und Lamivudine für HIV (De Clercq, Nature Rev. Drug Disc., 11, 2002: 13–25) wurde ein bedeutender Fortschritt bei der Bekämpfung lebensbedrohlicher viraler Infektionen erreicht. Unter dem Aspekt der zunehmenden Resistenz von Viren gegenüber diesen Wirkstoffen wird es jedoch als dringend notwendig angesehen, neuartige antiviral wirksame Produkte zu entwickeln und für die Herstellung von kosmetischen Präparaten, von Mikrobiziden bzw. von Arzneimitteln bereitzustellen. Bei Langzeitanwendungen von Nukleosid- und Nukleotidvirustatika wurden beispielsweise häufig Resistenzentwicklungen gegenüber den genannten Wirkstoffen nachgewiesen (Arts et al., J. Virol. 72, 1998: 4858–65; Morfin and Thouvenot, J. Clin. Virol. 26, 2003: 29–37). Auf Grund des gleichen bzw. ähnlichen Wirkprinzips treten zudem Kreuzresistenzen auf. Um solche Kreuzresistenzen zu überwinden, wird nach neuen alternativen Wirkstoffen gesucht, die zur antiviralen Prophylaxe oder Therapie eingesetzt werden können. Ein weiterer Nachteil der genannten Verbindungen besteht darin, daß sie auch in den DNA-Stoffwechsel der infizierten Zellen eingreifen und deshalb die Gefahr in sich bergen, mutagene, teratogene oder onkogene Wirkungen hervorzurufen (Carr, Nature Rev. Drug Disc., 2, 2003: 624–634; Wutzler und Thust, Antivir. Res., 49, 2001: 55–74). Weiterhin hemmt keines der genannten Virustatika die Virusübertragung. Substanzen oder Substanzkombinationen, die bereits in einem sehr frühen Stadium in den viralen Vermehrungszyklus eingreifen und ein Anheften der Viren an die Zellen verhindern, würden beispielsweise die Palette der verfügbaren antiviralen Mittel erweitern. Damit könnten neben der Virusvermehrung auch die Virusausbreitung blockiert und Neuinfektionen wirksam vermieden werden.

[0003] Polyanionische Verbindungen wie Polysulfate, -sulfonate oder -carboxylate sind in der Lage, mit viralen Glycoproteinen zu interagieren oder kompetitiv die Virus-Rezeptor-Bindung z. B. von Herpesviren oder HIV zu hemmen (Norkin, Clin. Microbiol. Rev., 8, 1995: 293–315; Stone, Nature Rev. Drug Disc., 1, 2002: 977–85; Coen und Schaffer, Nature. Rev. Drug Disc., 2, 2003: 278–88). Das große Molekulargewicht dieser Moleküle, schlechte Pharmakokinetiken sowie unzureichende Wirkungen in vivo trugen jedoch dazu bei, daß diese Substanzen bisher nicht zu einer Anwendung gelangten.

[0004] Es ist bekannt, daß sich sulfatierte Polysaccharide zur Behandlung von Viruserkrankungen eignen (DE 39 21 761, DE 40 21 066, EP 464759, EP 0940410, US 5861383 oder WO 2001013910).

[0005] Die Sulfatierung von Polysacchariden bzw. ihrer substituierten Derivate gehört zum Stand der Technik und kann auf unterschiedliche Weise geschehen (wie bspw. in US 27 15 09, WO 880 02 11, JP 719 67 02, DE 39 21 761 oder DE 698 03 362 offenbart). Ein bevorzugtes Verfahren zur Herstellung von Hyaluronsäuresulfaten ist die Sulfatierung von Hyaluronsäure mit Schwefeltrioxid/Pyridin- bzw. Schwefeltrioxid/DMF-Komplexen in einem aprotischen Lösungsmittel wie DMF (S. Möller, H.-P. Klöcking, P.-J. Müller, J.-H. Ozegowski, DE 198 13 234, 1998). Das Ausmaß der Umsetzungen an den Hydroxylgruppen der Hyaluronsäure wird üblicherweise durch den durchschnittlichen Substitutionsgrad (DS) beschrieben, der die Anzahl der funktionalisierten Hydroxylgruppen bezogen auf eine Disaccharid-Wiederholungseinheit der Hyaluronsäure angibt. Entsprechend der Anzahl der Hydroxylgruppen pro Disaccharid-Wiederholungseinheit der Hyaluronsäure sind DS-Werte zwischen 0 und 4,0 realisierbar. Der durchschnittliche Substitutionsgrad (DS) an SO₃-Gruppen (DS_S) liegt für die genannten Sulfatierungsverfahren zwischen 0,5 und 3,9.

[0006] Gleichfalls bekannt ist die Verwendung von medizinischen bzw. pharmazeutischen Kompositionen zur Herpes-Behandlung auf der Basis von pflanzlichen Produkten. In WO 95 110 35 wird eine kosmetische oder pharmazeutische Zubereitung mit antiviraler Wirkung auf der Basis eines Johanniskraut-Extrakts beschrieben, in DE 44 189 76 ein Phytotherapeutikum zur Behandlung von Infektionen des Herpes aus Extrakten aus Salbei, Spitzwegerich, Breitwegerich und Mistel.

[0007] US 65 090 42 beschreibt eine antivirale Komposition, die ein Extraktionsprodukt der Saubohne enthält.

[0008] Auch die antivirale und anti-inflammatorische Wirkung von wässrigen Melissenextrakten ist Gegenstand von Patenten (wie bspw. HU 208 255, DE 101 00 889, WO 2002 055 056 und EP 13 495 61), wobei ebenfalls die Behandlung von Lippenherpes erwähnt wird.

[0009] Die Schriften US 64 755 26, US 2004 086 575 und US 67 303 29 haben Zink enthaltende Verbindungen in Kombination mit phenolischen Antioxidanzien und pflanzlichen Extrakten wie Melissenöl für eine antivirale Nutzung zum Gegenstand.

[0010] Eine pharmazeutische Komposition zur Behandlung von Herpes, bestehend aus einer quarternären Ammoniumverbindung (z. B. Benzalkoniumchlorid), einem antiviralen Wirkstoff (z. B. Acyclovir) und einem Pflanzenextrakt (z. B. Aloe vera, Melisse) beschreiben u.a. die Schriften WO 96 243 67, DE 696 24 340 und EP 80 81 68.

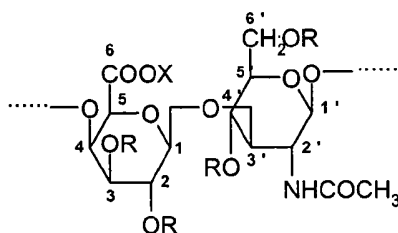
[0011] Synergistische Effekte unterschiedlicher antiviral wirkender Verbindungen sind wenig beschrieben worden. Die DD 21 41 92 beschreibt ein Verfahren zur Erhöhung der lokalen biologischen Wirkung bekannter Antiherpetika durch Zusatz von Phosphocholinen zu den ein herkömmliches Virostatika enthaltenden pharmazeutischen Zubereitungen, wobei aufgrund erhöhter viraler Wirksamkeit die Dosierung des Virustatikums reduziert werden konnte. Die zugesetzten Phosphocholine sind dabei selbst nicht oder nur sehr schwach antiviral wirksam und es sind auch keine Kombinationen von Phosphocholinen mit polyionischen Verbindungen bekannt. EP 049 73 41 hat eine synergistische Komposition mit antiviraler Wirkung, bestehend aus einem Fibroblastenwachstumsfaktor und sulfatierten Polysacchariden wie Heparin, Dextransulfat, Pentosanpolysulfat oder Dermatansulfat zum Gegenstand. Ein wesentlicher Nachteil dieser Kombinationen ist darin zu sehen, daß zur Bereitstellung der Fibroblastenwachstumsfaktoren aufwendige und kostenintensive Verfahren erforderlich sind, die einen Einsatz der beschriebenen Kombinationen aus ökonomischen Gründen stark einschränken.

[0012] Obwohl, wie oben beschrieben, eine Vielzahl von Substanzen oder Substanzkombinationen mit antiviralen Eigenschaften bekannt ist, besteht auf Grund der teilweise ungenügenden in vivo-Wirksamkeit dieser Verbindungen, ihrer zum Teil nicht unbedenklichen toxischen Nebenwirkungen sowie vermehrt auftretender Resistenzen von Viren gegenüber bekannten Wirkstoffen ein großer Bedarf an neuen antiviral wirkenden Verbindungen.

Aufgabenstellung

[0013] Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es deshalb, neuartige Zusammensetzungen bereit zu stellen, die auch in kleinsten Konzentrationen bereits als Virustatika zur wirksamen Prophylaxe und Therapie von Virusinfektionen geeignet sind und die keine toxischen Nebenwirkungen bei ihrer Anwendung zeigen.

[0014] Der vorliegenden Erfindung liegt der überraschende Befund zugrunde, daß eine beliebige Kombination von antiviral wirksamen Hyaluronsäuresulfaten und/oder deren carboxyalkylierten Derivaten mit antiviral und zusätzlich antiinflammatorisch wirkenden Melisseextrakten zu einer enormen Wirkungsverstärkung führt. Überraschenderweise hemmen sogar Konzentrationen, die bei Einzelanwendung der Wirkstoffe keine antivirale Wirkung zeigen, bei kombinierter Anwendung sehr gut den HSV-1 induzierten zytopathischen Effekt. Die vorliegende Erfindung betrifft demzufolge eine Kombination von Hyaluronsäuresulfaten und/oder carboxyalkylierten Hyaluronsäuresulfaten der allgemeinen Formel,



$R = H, (CH_2)_nCOOX, SO_3X$

$X = H, Na$

$n = 1, 2$

in der X identisch oder unabhängig voneinander H und/oder Na darstellen sowie R H, $(CH_2)_nCOOX$ und/oder SO_3X sowie $n = 1$ oder 2 bedeuten, wobei, jeweils bezogen auf die in Formel 1 angegebene Disaccharid-Wiederholungseinheit der durchschnittliche Substitutionsgrad der $(CH_2)_nCOOX$ -Gruppierung (DS_{CA}) zwischen 0,1 und 1,0 und der durchschnittliche Substitutionsgrad der SO_3X -Gruppierung (DS_S) zwischen 0,5 und 3,9 beträgt sowie der nichtsubstituierte Anteil $R = H$ sich jeweils zu $4 - (DS_{CA} + DS_S)$ ergänzt mit einem antiviral wirkenden Pflanzenextrakt oder dessen pflanzlichen Inhaltsstoffen, vorzugsweise mit einem wässrigen Extrakt aus Melisse.

[0015] Die Herstellung der als Komponente der erfindungsgemäßen antiviralen Kombination bereitzustellen-

den carboxyalkylierten Hyaluronsäuresulfate erfolgt durch Sulfatierung von carboxyalkylierten Hyaluronsäuren, die entsprechend einem Verfahren aus dem Stand der Technik, z. B. nach DE 39 21 761, synthetisiert werden können. Bevorzugt erfolgt die anschließende Sulfatierung der carboxyalkylierten Hyaluronsäuren mit dem SO_3/DMF -Komplex, da in diesem Fall der durchschnittliche Substitutionsgrad an Sulfatgruppen pro Disaccharid-Wiederholungseinheit der Hyaluronsäure (DS_s) des carboxyalkylierten Hyaluronsäuresulfats über eine geeignete Wahl der Reaktionsbedingungen genau eingestellt werden kann. Ein wesentlicher Vorteil des genannten Herstellungsverfahrens liegt weiterhin in der Durchführbarkeit der Sulfatierungsreaktion und der Produktaufarbeitung in homogener Phase, wodurch eine gleichmäßige Sulfatierung mit einstellbarem DS_s -Wert ermöglicht wird.

[0016] Die erfindungsgemäßen Substanzkombinationen zeigen eine hohe antivirale Wirksamkeit. Sie hemmen in starkem Maße die Vermehrung von umhüllten Viren, wie z. B. Herpesviren.

[0017] Die erfindungsgemäßen Substanzkombinationen sind demzufolge für die Herstellung von kosmetischen Darreichungsformen, Mikrobiziden oder von Arzneimitteln zur Prophylaxe und Behandlung von Viruserkrankungen geeignet. Sie können z. B. in Form eines antiviral wirksamen Lippenpflegestiftes bzw. Hydrogels oder auch als mikrobiozide Vaginalgele Verwendung finden und aufgrund ihrer Zusammensetzung zur Prophylaxe und Heilung von Virusinfektionen dienen. Als Wirkstoffe werden die Hyaluronsäurederivate in fester bzw. flüssiger Form und/oder als Hydrogel in Kombination mit den ebenfalls antiviral bzw. antiinflammatorisch wirksamen pflanzlichen Naturheilstoffen wie z. B. Melisse in die oben erwähnten Darreichungsformen eingebracht.

[0018] Die erfindungsgemäßen Kombinationen eignen sich somit zur Entwicklung von Virustatika, die im Vergleich zu den im Stand der Technik genannten Verbindungen einen völlig anderen Wirkmechanismus bei gleich guter bzw. höherer antiviraler Wirkung besitzen, und können aufgrund dieser antiviralen Eigenschaften zur Herstellung von kosmetischen Zubereitungen, mikrobioziden Vaginalgelen und Arzneimitteln zur Bekämpfung viraler Infektionen dienen. Spezielle Verwendungen ergeben sich beispielsweise zur Prophylaxe und Therapie von Herpesinfektionen. Sie können sowohl allein als auch in Kombination mit bekannten Virustatika sowie mit physiologisch verträglichen Hilfs- und Trägerstoffen angewandt werden. Des weiteren können sie bei topischer Anwendung als Prophylaktika eingesetzt werden und die Virusübertragung verhindern.

[0019] Die folgenden Ausführungsbeispiele sollen die Erfindung näher erläutern, jedoch in keiner Weise einschränken.

Ausführungsbeispiel

1. Synthese von carboxymethylierter Hyaluronsäure

Beispiel 1 (CH-1)

[0020] 2 g (4,98 mmol Hyaluronsäure, Na-Salz, Molmasse ca. 1 Mio) werden bei Raumtemperatur unter Schutzgasatmosphäre in Wasser gelöst. Es werden 3,5 ml (49,8 mmol) 40%-ige wässrige Natronlauge (14,3 mol) und nach 15 min 2,36 g (24,9 mmol) Chloressigsäure zugegeben. Die Lösung wird auf 60 °C erwärmt und 2 h gerührt. Anschließend wird die Reaktionslösung auf Raumtemperatur abgekühlt, neutralisiert, dialysiert und gefriergetrocknet.

Ausbeute: 80%.

[0021] Durchschnittlicher Substitutionsgrad an Carboxymethylgruppen (DS_{CM} , bestimmt durch Säure-Basen-Titration): siehe Tabelle 1.

2. Synthese von carboxymethyliertem Hyaluronsäuresulfat

Beispiel 2 (CS-1, 2)

[0022] 1,15 mmol carboxymethylierte Hyaluronsäure ($\text{DS}_{\text{CM}} \sim 0,4$) werden unter Schutzgas bei Raumtemperatur in 50 ml DMF gebracht und nach Zugabe von 1,84 mmol p-Toluol-sulfonsäure etwa 30 min suspendiert. Die Suspension wird auf 4 °C gekühlt. Nach Zugabe von Molsieb A3 und den entsprechenden Mengen SO_3/DMF -Komplex (CS-1: $\text{OH}/\text{SO}_3 = 1:3$, CS-2: $\text{OH}/\text{SO}_3 = 1:5$) wird die Reaktionsmischung 1 h gerührt. Anschließend wird das Molsieb abfiltriert, das Polymer in 400 ml Aceton ausgefällt und mit Natronlauge neutralisiert. Der Niederschlag wird abzentrifugiert, gewaschen, gegen Wasser dialysiert, 24 h gefriergetrocknet und bei 40 °C im Vakuum getrocknet.

Ausbeute: 80–90%.

[0023] Schwefelgehalt (elementaranalytisch bestimmt) und DS_s -Wert: siehe Tabelle 1.

Beispiel 3 (HS-1, CHS-3-6)

[0024] 1 g Hyaluronsäure bzw. ihres carboxymethylierten Derivats (Na-Salz) und 80 ml Wasser (bidest.) werden in einem geschlossenen Reaktionsgefäß bei Raumtemperatur bis zur vollständigen Lösung des Polymers gerührt. Die klare Lösung wird auf 0 °C gekühlt, mit 5 g Ionenaustauscher (Dowex WX 8, H-Form) versetzt und 30 min gerührt. Die vom Ionenaustauscher abzentrifugierte Polymerlösung wird durch Zugabe von 10%-iger ethanolischer Tributylaminlösung auf pH-Wert 9 eingestellt. Anschließend wird die Lösung dreimal mit Diethylether extrahiert, die Lösung gefriergetrocknet und bei 40 °C im Ölpumpenvakuum getrocknet.

[0025] 500 mg des so erhaltenen Ammoniumsalzes der Hyaluronsäure bzw. ihres carboxymethylierten Derivats werden in 50 ml absolutem DMF unter Argon bei Raumtemperatur gelöst, auf 0 °C gekühlt und mit entsprechenden Mengen an SO_3 /DMF-Komplex (HS-1: $OH/SO_3 = 1:20$, CHS-3, CHS-4: $OH/SO_3 = 1:20$, CHS-5: $OH/SO_3 = 1:5$, CHS-6: $OH/SO_3 = 1:3$) versetzt. Es wird 1 h bei 0 °C gerührt. Die klare Reaktionslösung wird in ca. 500 ml Aceton ausgefällt und mit ethanolischer NaOH neutralisiert. Der Niederschlag wird mehrmals mit Aceton gewaschen, in Wasser (bidest.) gelöst, in Wasser dialysiert und anschließend gefriergetrocknet. Das erhaltene Produkt wird bei 50 °C im Vakuum bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

Ausbeute: 80–90%.

[0026] Schwefelgehalt (elementaranalytisch bestimmt) und DS_s -Wert: siehe Tabelle 1.

3. Verwendungsbeispiele

3.1. Zytotoxizität und antivirale Wirkung von carboxymethylierten Hyaluronsäuresulfaten

[0027] Anhand der in Tabelle 1 aufgeführten Substanzen soll beispielhaft die zytotoxische und antivirale Wirkung von carboxylierten Hyaluronsäuresulfaten aufgezeigt werden.

Tabelle 1: Beispiele synthetisierter Hyaluronsäurederivate und Kontrollsubstanzen.

Name	Verbindung	DS_{CM}	DS_s	Variante Sulfatierung
PFA	Phosphonoameisensäure	0	0	-
Hya	Hyaluronsäure	0	0	-
CH-1	carboxymethylierte Hyaluronsäure	0,82	0	-
HS-1	Hyaluronsäuresulfat	0	3,39	2
CHS-1	carboxymethylierte Hyaluronsäuresulfate	0,35	0,64	1
CHS-2		0,35	1,86	1
CHS-3		0,23	3,77	2
CHS-4		0,44	2,90	2
CHS-5		0,47	0,57	2
CHS-6		0,66	0,17	2

3.2. Zytotoxizität

Testbeschreibung

[0028] Die Zytotoxizität der Testverbindungen wird auf zwei Tage-alten GMK-Zell-Monolayern bestimmt (Schmidtke et al., J. Virol. Meth. 95, 2001: 133–143). Dazu werden 9 Verdünnungen der Substanz in 100 µl Testmedium zugegeben. Zellen ohne Substanz dienen als Kontrolle. Nach einer Inkubationszeit von 72 h bei 37 °C mit 5% CO_2 , erfolgt die weitere Bearbeitung. Nach Entfernen des Zellkulturüberstandes werden die

Zell-Monolayer 3 × mit 300 µl physiologischer Kochsalzlösung gewaschen, um tote Zellen zu entfernen. Die Fixierung und Färbung der Zellen erfolgt mit 50 µl einer 0,3%igen Kristallviolett-Lösung für 10 min. Nach 6-maligem Waschen mit 300 µl Wasser werden die gefärbten Monolayer 20 min mit 100 µl Lyse-Puffer (0,8979 g Natriumcitrat, 1,25 ml 1N HCl in 98,05 ml 47,5% Ethanol) behandelt und das Kristallviolett herausgelöst. Die optische Dichte der einzelnen Vertiefungen wird bei 550/630 nm bestimmt. Die optische Dichte der 6 Kontrollen ohne Substanz wird 100% gesetzt. Anhand der mittleren Dosis-Wirkungs-Kurve von 3 unabhängigen Testen werden die 50% zytotoxische Konzentration (CC_{50}) und maximal tolerierte Dosis (MTD = CC_{10}) errechnet.

Testergebnis

[0029] Die untersuchten, in Tabelle 1 aufgeführten, Substanzen und Melisse erwiesen sich im getesteten Konzentrationsbereich als sehr gut verträglich für GMK-Zellen. Sowohl die CC_{50} als auch die MTD lagen bei > 200 µg/ml.

3.3. Antivirale Wirkung im zytopathischen Effekt (zpE)-Hemmtest

[0030] Der zpE-Hemmtest wird auf 2 Tage alten GMK-Zellrasen in Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen durchgeführt (Schmidtke et al., J. Virol. Meth. 95, 2001: 133–143). Nach dem Absaugen des Zellwachstums-Mediums werden 50 µl der Testsubstanz, gelöst im Testmedium, und eine bestimmte Viruskonzentration (HSV-1) in 50 µl des Testmediums zugegeben. 6 Vertiefungen mit Zellen ohne Virus und 6 Vertiefungen mit Virus, aber ohne Testsubstanz, dienen als Zell- bzw. Viruskontrolle auf jeder Platte. In jedem Test wird von Phosphonoameisensäure (PFA), die zuvor im Plaque-Reduktions-Test bestimmte 50%ige und 100%ige Hemmkonzentration (IC_{50} = 12,5 µg/ml und IC_{100} = 125 µg/ml) als Kontrolle mitgeführt. Die Platten werden bei 37 °C und 5% CO_2 inkubiert. Die Entwicklung des zytopathischen Effektes (zpE) wird mikroskopisch verfolgt. Circa 48 h nach Infektion, wenn die Viruskontrollen den maximalen zytopathischen Effekt zeigen und die Referenzverbindung (PFA) eine etwa 50 bzw. 100%-ige Hemmung, werden die Zellen fixiert und mit 0,3% Kristallviolett in Ethanol/Formalin-Lösung gefärbt. Nach dreimaligem Waschen und anschließendem Herauslösen des Farbstoffes mit einem Lyse-puffer wird die optische Dichte bei 550/630 nm bestimmt und die antivirale Aktivität berechnet. Anhand der mittleren Dosis-Wirkungskurven von 3 unabhängigen Testen wird die 50%ige Hemmkonzentration ermittelt.

Tabelle 2: 50%ige Hemmkonzentration (IC_{50}) der Beispielsubstanzen

Substanz	Sulfatierungsgrad (DS _S)	IC_{50} (µg/ml)
PFA	nicht relevant	12,5
Hya	0	unwirksam
CH-1	0	unwirksam
HS-1	3,39	0,5
CHS-1	0,64	>100
CHS-2	1,86	2,7
CHS-3	3,77	0,7
CHS-4	2,90	0,7
CHS-5	0,57	132,4
CHS-6	0,17	175,7
Melisse	-	192,4

Testergebnis

[0031] Die antivirale Wirkung der caboxymethylierten Hyaluronsäuresulfate steht in einem engen Zusammenhang mit ihrem Sulfatierungsgrad (Tabelle 2). Je stärker die Sulfatierung, desto stärker war die nachgewiesene Hemmung des HSV-1-induzierten zpE in GMK-Zellen und desto niedriger war die 50%ige Hemmkonzentration. Für die Verbindungen mit einem Schwefelgehalt von > 11% (CHS-3 und CHS-4) wurden IC_{50} -Werte von 0,7 µg/ml ermittelt. Diese Werte entsprachen in etwa der 50%igen Hemmkonzentration des Hyaluronsäuresulfats (HS-1) und liegen um ein Vielfaches niedriger als die der Kontrollsubstanz PFA. Nichtsulfatierte Hyaluronsäure

bzw. deren caboxymethyliertes Derivat (CH-1) sind im verwendeten Konzentrationsbereich bis 100 µg/ml nicht antiviral wirksam.

3.4. Antivirale Wirkung von HS-1 und CHS-4 in Kombination mit Melisse

[0032] Für die vergleichenden Untersuchungen zur antiviralen Wirkung von HS-1 und CHS-4 in Kombination mit Melisse wurden die unter Punkt 2 bereits beschriebenen zpE-Hemmteste eingesetzt. Die dabei einzeln sowie in Kombination eingesetzten Konzentrationen betrugen für Melisse 12,5, 25, 50, 100 und 200 µg/ml, für HS-1 und CHS-4 0,1, 0,2, 0,4, 0,8 und 1,6 µg/ml. Die mit HS-1 und Melisse bzw. CHS-4 und Melisse erzielten antiviralen Wirkungen sind in den Tabellen 3 bzw. 4 zusammenfassend dargestellt.

Tabelle 3: Hemmung des HSV-1-induzierten zpE durch kombinierte Behandlung mit HS-1 und Melisse (Mittelwert aus 3 unabhängigen Versuchen)

Hemmung des HSV-1-induzierten zpE (%) nach Behandlung mit							
HS-1 (µg/ml)	Melisse (µg/ml)						
	0	6,25	12,5	25	50	100	200
0	0	0	0	0	0	0	41,9
0,1	0,9	0	0	0	0	21,7	67,1
0,2	0,7	26,2	34,8	29,9	42,7	60,8	84,5
0,4	8,8	71,1	64,1	67,8	56,5	77,5	79,7
0,8	64,8	79,1	81,8	81,6	72,6	84,2	78,3
1,6	87,5	75,9	88,4	83,5	77,3	79,5	77,1

Tabelle 4: Hemmung des HSV-1-induzierten zpE durch kombinierte Behandlung mit CHS-4 und Melisse (Mittelwert aus 3 unabhängigen Versuchen)

Hemmung des HSV-1-induzierten zpE (%) nach Behandlung mit							
CHS-4 (µg/ml)	Melisse (µg/ml)						
	0	6,25	12,5	25	50	100	200
0	0	0	0	0	0	2,9	37,9
0,1	0	0	0	0	6,8	53,3	74,1
0,2	3,6	8,6	37,6	30,3	58,5	68,1	85,8
0,4	3,2	59,7	74,2	72,8	56,5	87,0	81,9
0,8	62,6	68,5	72,6	80,6	77,8	79,9	81,4
1,6	84,1	84,7	82,4	82,9	79,6	79,3	77,1

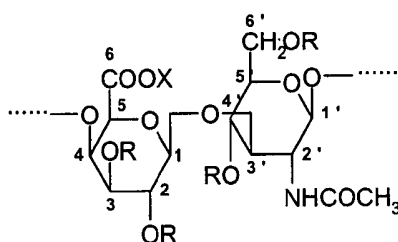
[0033] Aus den Daten wird ersichtlich, dass sowohl die Kombination von Hyaluronsäuresulfat mit Melisse (Tabelle 3) als auch von caboxymethyliertem Hyaluronsäuresulfat (Tabelle 4) mit Melisse zu einer starken Steigerung der antiviralen Wirkung führte. Überraschenderweise hemmten sogar Konzentrationen, die bei Einzelanwendung der Wirkstoffe keine antivirale Wirkung zeigten, bei kombinierter Anwendung sehr gut den HSV-1 induzierten zytopathischen Effekt (fett gedruckt).

[0034] Alle in der Beschreibung, den Tabellen und den nachfolgenden Ansprüchen dargestellten Merkmale können sowohl einzeln als auch in beliebiger Kombination miteinander erfindungswesentlich sein.

Patentansprüche

1. Antivirale Kombinationen mit sich gegenseitig verstärkender antiviraler Aktivität gegenüber umhüllten Vi-

ren bestehend aus Hyaluronsäuresulfaten und/oder deren carboxyalkylierten Derivaten der allgemeinen Formel



$R = H, (CH_2)_nCOOX, SO_3X$

$X = H, Na$

$n = 1, 2$

bei denen R H , $(CH_2)_nCOOX$ und/oder SO_3X und X H und/oder Na sowie $n = 1$ oder 2 bedeuten und einem Naturstoff oder Naturstoffextrakt mit antiinflammatorischen und antiviralen Eigenschaften.

2. Antivirale Kombinationen nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Hyaluronsäuresulfate Substitutionsgrade an Sulfatgruppen im Bereich von 0,5 bis 4,0, bezogen auf eine Disaccharid-Wiederholungseinheit der Hyaluronsäure, aufweisen.

3. Antivirale Kombinationen nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die carboxyalkylierten Hyaluronsäuresulfate durchschnittliche Substitutionsgrade an Carboxyalkylgruppen im Bereich von 0,1 bis 1,0 sowie durchschnittliche Substitutionsgrade an Sulfatgruppen im Bereich von 0,5 bis 4,0, jeweils bezogen auf eine Disaccharid-Wiederholungseinheit der Hyaluronsäure aufweisen.

4. Antivirale Kombinationen nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der Naturstoff oder der Naturstoffextrakt Melisse oder einen Extrakt aus Melisse ist.

5. Antivirale Kombinationen nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Hyaluronsäuresulfate und/oder deren carboxyalkylierten Derivate sowie der Naturstoff oder Naturstoffextrakt in einem beliebigen Mischungsverhältnis vorliegen.

6. Antivirale Kombinationen nach Anspruch 1 oder 5, dadurch gekennzeichnet, dass zusätzlich weitere antiviral, antibakteriell und/oder antiinflammatorisch wirkende Verbindungen enthalten sind.

7. Antivirale Kombinationen nach den Ansprüchen 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass zusätzlich organische oder anorganische Hilfsstoffe enthalten sind.

8. Antivirale Kombinationen nach den Ansprüchen 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass die antiviralen Kombinationen flüssige, viskose, gelförmige, pastöse oder partikuläre Gestalt aufweisen.

9. Verwendung der antiviralen Kombinationen gemäß einem oder mehrerer der voran stehenden Ansprüche zur Prophylaxe und Therapie von Viruserkrankungen.

10. Verwendung der antiviralen Kombinationen gemäß einem oder mehrerer der voran stehenden Ansprüche zur Prophylaxe und Therapie von Viruserkrankungen, die speziell durch eine Infektion mit dem Herpes Simplex Virus hervorgerufen werden.

11. Verwendung der antiviralen Kombinationen gemäß einem oder mehrerer der voran stehenden Ansprüche als pharmazeutische Formulierungen zur Prophylaxe und Therapie von Viruserkrankungen.

12. Verwendung der antiviralen Kombinationen gemäß einem oder mehrerer der voran stehenden Ansprüche als kosmetische Zubereitungen oder kosmetische Artikel mit antiviralen Eigenschaften.

13. Verwendung der antiviralen Kombinationen gemäß Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass in den kosmetischen Zubereitungen oder kosmetischen Artikeln zusätzliche Träger- und Hilfsstoffe verwendet werden.

14. Verwendung der antiviralen Kombinationen gemäß den Ansprüchen 12 oder 13, dadurch gekennzeichnet,

net, dass es sich bei den kosmetischen Zubereitungen oder kosmetischen Artikeln um Lippenpflegestifte, Hydrogele, Vaginalgele oder Pflegecremes handelt.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen