



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 699 21 119 T2** 2006.02.16

(12)

Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 1 079 790 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **699 21 119.0**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US99/10956**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **99 923 192.1**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 99/059525**

(86) PCT-Anmeldetag: **19.05.1999**

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: **25.11.1999**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **07.03.2001**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **13.10.2004**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **16.02.2006**

(51) Int Cl.⁸: **A01N 41/02** (2006.01)

A01N 37/02 (2006.01)

A61L 2/00 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

81199 **19.05.1998** **US**

(73) Patentinhaber:

**The Pennsylvania State University, University
Park, Pa., US**

(74) Vertreter:

Andrae Flach Haug, 83022 Rosenheim

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(72) Erfinder:

**HOWETT, K., Mary, Harrisburg, US; KREIDER, W.,
John, Palmyra, US**

(54) Bezeichnung: **VERWENDUNG VON MIKROBIZIDEN UND SPERMIZIDEN ZUSAMMENSETZUNGEN ZUR INAKTIVIERUNG VON NICHTUMHÜLLTEN VIREN**

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

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

Beschreibung

GEBIET DER ERFINDUNG

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft die Verhütung von Schwangerschaft und die Vorbeugung und Kontrolle sexuell übertragbarer und anderer Erkrankungen durch die Verwendung von Zusammensetzungen mit mikrobizider Breitspektrumaktivität und spermizider Aktivität, einschließlich der Befähigung zur Inaktivierung besonders resistenter Pathogene, wie etwa humanen Papillomaviren, und anderen nicht umhüllten Viren.

HINTERGRUND DER ERFINDUNG

[0002] Sexuell übertragbare Erkrankungen (STDs) gehören zu den häufigsten und am leichtesten übertragbaren Erkrankungen und stellen nach wie vor ein signifikantes öffentliches Gesundheitsproblem dar. Es wird geschätzt, dass sich über 250 Millionen Menschen weltweit und nahezu 3 Millionen Menschen in den Vereinigten Staaten jährlich mit Gonorrhö infizieren. Die jährliche weltweite Häufigkeit von Syphilis wird auf 50 Millionen Menschen geschätzt, mit 400.000 jährlichen Fällen in den USA, die einer Behandlung bedürfen. In jüngerer Zeit hat sich das humane Immundefizienzvirus (HIV), das in dem tödlichen erworbenen Immunschwächesyndrom (acquired immunodeficiency syndrome, AIDS) resultiert, sowohl in homosexuellen als auch in heterosexuellen Gruppen schnell verbreitet. Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) und das Nationale Gesundheitsinstitut (NIH) empfehlen Müttern, die HIV-positiv sind, ihre Babys nicht zu stillen, da ein hohes Risiko besteht, HIV über die Muttermilch zu übertragen. Jedoch führt der Wegfall des Stillens oft zur Unterernährung des Babys, sowie zu Diarrhö, Ruhr und anderen Infektionskrankheiten, da Gebiete mit hoher endogener HIV-Rate oft auch geringe Nahrungsmittelvorräte und schlechte hygienische Bedingungen bei Lebensmitteln und Wasser aufweisen.

[0003] Deutliche Zusammenhänge sind nun auch zwischen Gebärmutterhalskrebs und Papillomaviren (PVs) entdeckt worden. Es wird geschätzt, dass etwa 25% der Frauen weltweit von einer Genitalinfektion mit humanem Papillomavirus (HPV) betroffen sind. Die humanen Papillomaviren (HPVs), von denen es derzeit über 90 bekannte Typen gibt, verursachen Papillome (Warzen) bei einer Vielzahl von humanen Zielepithelien, einschließlich der gewöhnlichen Warzen an den Händen (*verruca vulgaris*) und den Füßen (Fußsohlenwarzen), sowie genitaler Warzen in den Epithelien der Vulva, Vagina, des Gebärmutterhalses und des Penis. Genitalwarzen stellen eine allgegenwärtige STD dar. Frauen mit Genitalverletzungen, die bestimmte HPV-Typen, einschließlich der Typen 16, 18, 31, 33 und 35, aufweisen, besitzen ein erhöhtes Risiko zur Entwicklung von Gebärmutterhalskrebs. In den vereinigten Staaten wird bei 15.000 Frauen pro Jahr Gebärmutterhalskrebs diagnostiziert, und es gibt etwa 5.000 Todesfälle pro Jahr. In Entwicklungsländern ist Gebärmutterhalskrebs die vorherrschende Ursache für krebserkrankte Todesfälle bei Frauen.

[0004] PVs stellen für Forscher eine einzigartige Herausforderung dar, um die Identifizierung viruzider Mittel zu versuchen. PVs besitzen die inhärente Eigenschaft, extrem resistent gegenüber dem Angriff durch antimikrobielle Mittel zu sein. Zusätzlich liegen PVs nicht frei in der Natur vor, genau wie es bei vielen nicht umhüllten Viren der Fall ist – vielmehr liegen PVs eingeschlossen in der Schuppenstruktur differenzierter Epithelzellen vor. Somit sind die PVs nicht nur durch ihre eigenen, sehr schwer zu durchdringenden Capsid geschützt, sondern auch durch die umgebenden, stark keratinisierten und quervernetzten Schuppenstrukturen epithelialer Zellen.

[0005] Ein Ansatz zur allgemeinen Kontrolle von STDs ist die Anwendung topisch applizierter, von Frauen angewandter Mikrobizide, die die relevanten Pathogene inaktivieren. In den häufigsten Fällen sind diese Mikrobizide spermizide Zubereitungen, die NONOXYL-9 (N-9) Detergens enthalten, das umhüllte Viren wie etwa HSV-2 und HIV-1 inaktiviert. Bislang haben sich diese Zubereitungen jedoch gegenüber nicht umhüllten Viren, wie etwa den HPVs, nicht als wirksam erwiesen.

[0006] Seine Unfähigkeit, HPVs zu inaktivieren, macht N-9 zu einem ungeeigneten Viruzid gegen diese STD. Zusätzlich wurde die chronische Anwendung von N-9 kürzlich mit einer erhöhten Serokonversion zum Befund „positiv“ für HIV-1-Antikörper bei einer Gruppe von Prostituierten in Verbindung gebracht, was die Möglichkeit aufwirft, dass N-9 das Vaginalepithel erodieren kann. Die häufige Verwendung von N-9 steht auch in positivem Zusammenhang mit bakterieller Vaginose, Genitalgeschwüren und Vulvitis, Candida-Infektionen der Vagina, toxischem Schocksyndrom und Epithelbeschädigung des Gebärmutterhalses und der Vagina. Dieses Detergens ist jedoch spermizid und hat gezeigt, dass es umhüllte Viren inaktiviert. Es ist bei einer großen Anzahl von Kondomen und anderen spermiziden Mitteln zu finden.

[0007] Andere Mikrobizide, wie etwa Octoxynol-9 (O-9), Benzalkoniumchlorid (BZK) und Chlorhexidin, sind ebenfalls Tenside, die über ihre Wirkung als Tensid/Detergens die Hüllen von HSV-2 und HIV-1 aufbrechen können. Ebenso wie N-9 inaktivieren diese Mikrobizide jedoch nicht die nicht umhüllten PVs. Topische Mikrobizide für die Inaktivierung der PVs und die Verhinderung der Übertragung bei Mensch und Tier sind derzeit nicht verfügbar, wären in Anbetracht der ubiquitären Natur der HPV-Infektionen jedoch hochgradig wünschenswert.

[0008] Das US-Patent 5,004,757 betrifft ein Verfahren zur Inaktivierung von Viren auf Oberflächen durch Applikation einer dreiteiligen Zusammensetzung, die Glutraldehyd enthält. Die Zusammensetzung enthält auch wasserstoffgebundene Glykol-Moleküle zur Beseitigung des Aldehydgeruchs, sowie ein anionisches Tensid wie etwa Natriumdodecylsulfat (SDS) als Verstärker der viruziden Aktivität der Glutraldehyd-Komponente. Dieses Patent weist darauf hin, dass SDS alleine eine begrenzte viruzide Aktivität besitzt, jedoch eine synergistische Wirkung aufweist, wenn es mit Glutraldehyd kombiniert wird. Aufgrund des Vorliegens von Glutraldehyd, einem wohlbekannten Mutagen, ist die Formulierung nicht nutzbar gegen STDs oder andere Erkrankungen, da sie nicht auf humanen Epithelien appliziert werden kann.

[0009] Was erforderlich ist, ist die Verwendung sicherer und wirksamer Mikrobizide gegen STDs, deren mikrobizide Aktivität sich auch auf nicht umhüllte Viren, und insbesondere auf Papillomaviren, erstreckt.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0010] Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung pharmazeutischer Zusammensetzungen, Produkte und Verfahren zur Verhütung der Schwangerschaft und zur Verhinderung der Übertragung von STDs, einschließlich der Verwendung sicherer und wirksamer vaginaler Zusammensetzungen zur Kontrolle und Vorbeugung von STDs. Die gemäß der Erfindung verwendeten mikrobiziden Zusammensetzungen beinhalten ein Alkylsulfat, wie etwa SDS, Lithiumdodecylsulfat, Laurinsäuren oder Salze hiervon, als Wirkstoff, der zur Inaktivierung von Spermien und einem breiten Spektrum pathogener Mikroben, einschließlich HPVs und anderer nicht umhüllter Viren befähigt ist.

[0011] Zusätzlich stellt die vorliegende Erfindung Produkte und Verfahren zur Inaktivierung infektiöser Agenzien wie etwa freiem HIV und zellassoziertem HIV, sowie ebenso von nicht umhüllten Viren, wie etwa HPVs, humanen Papoviren, humanem Picornavirus (Hepatitis A-Virus) und humanem Parvovirus, B-19, in biologischen Flüssigkeiten, beinhaltend z.B. humane und tierische Muttermilch, Serum und Plasma, bereit. Diese Produkte und Verfahren werden bereitgestellt, indem SDS oder ein SDS-Derivat an einer Oberfläche oder Gelmatrix gebunden wird, wo es in Kontakt mit der zu behandelnden Flüssigkeit steht, oder durch schnelle Tensidentfernung des SDS oder SDS-Derivats aus der Flüssigkeit nach der Behandlung mit dem Tensid. Bei einer besonders bevorzugten Ausführungsform befindet sich die Oberfläche, an die das Tensid gebunden ist, in einer Flasche zur Säuglingsernährung.

[0012] Die vorliegende Erfindung stellt auch die Verwendung von Desinfektionsmittelzusammensetzungen zur Zerstörung pathogener Mikroben an medizinischen Instrumenten, Duschkabinen, Badezimmerinventar, Übungsgerätschaften und anderen unbelebten Oberflächen bereit, ebenso wie die Verwendung spermizider Barrieren, die mit einer Alkylsulfatverbindung für kombinierte spermizide und mikrobizide Effekte beschichtet oder imprägniert sind.

[0013] Es ist interessant und überraschend festzustellen, dass es, obwohl SDS seit mehreren Jahren als von begrenzter Wirksamkeit gegen umhüllte Viren bekannt ist, und obwohl es als Tensid für Seifen, Kosmetika und verschiedene andere topische Applikationen, wie etwa für Shampoos und Zahnpasten verwendet wird, keine Berichte über seine Verwendung, oder die Verwendung anderer topischer, antimikrobieller Mittel zur Kontrolle von PVs gegeben hat. Falls tatsächlich eine derartige Anwendung erfolgt sein sollte, so war diese unbeabsichtigt und erfolgte unbewusst; es handelte sich um einen nicht erkannten Zufall. Keine der beschriebenen Studien oder Anwendungen von SDS wurde mit der Zielsetzung durchgeführt, Infektionen mit Papillomaviren zu kontrollieren. Ihr Zweck war lediglich der eines Tensids/Detergens, oder bestenfalls der eines Unterstüters der antimikrobiellen Wirkung von Glutraldehyd. Es gibt tatsächlich keine bekannte zuvor erfolgte Verwendung von SDS für die topische Applikation, für die angenommen werden kann, dass sie eine gleichbleibende viruzide Aktivität erzielt hat, wie hier im folgenden beschrieben wird.

KURZE BESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

[0014] Fig. 1 zeigt die Wirkungen der SDS-Inaktivierung bei dem Baumwollschwanzkaninchen-Papillomavi-

rus (cottontail rabbit papillomavirus, CRPV). [Fig. 1a](#) zeigt das durchschnittliche geometrische Mittel des Durchmessers (GMD) von sechs Läsionen, die mit normalem (o) und mit SDS-behandeltem (•) CRPV angeimpft wurden. [Fig. 1b](#) zeigt das Anwachsen einzelner Läsionen.

[0015] [Fig. 2](#) zeigt die Wirkungen der SDS- und N-9-Behandlung bei CRPV. [Fig. 2a](#) zeigt das GMD von zehn Animpfungsstellen, die SDS-behandeltes Virus (•) erhielten, im Vergleich zu 10 Stellen, die normales Virus (o) erhielten. [Fig. 2b](#) zeigt das vergleichende Wachstum von Papillomen an 10 Stellen, die normales CRPV (o) erhielten im Vergleich mit 10 Stellen, die mit N-9 behandeltes CRPV (•) erhielten.

[0016] Die [Fig. 3a](#) bis [Fig. 3g](#) zeigen die Gesamtsymptome pro Gruppe bei sechs Mäusegruppen an den Tagen 3-12 für (A) Schwellung, (B) vaginales Exsudat, (C) Rötung, (D) Tod, (E) Beinlähmung, (F) perianaler Haarverlust, und (G) jedwedem Symptom bei einem in vivo-Experiment über die Toxizität von SDS und den Schutz vor vaginaler Infektion mit HSV-2.

[0017] In [Fig. 4\(a\)](#) ist ein Säuglingsflaschen-Saugstück mit einer Filtervorrichtung gemäß der Erfindung dargestellt. Die [Fig. 4\(b\)](#) und (c) zeigen Säuglingsflaschen gemäß anderer Ausführungsformen, bei denen das Alkylsulfat-Mikrobizid der Erfindung an das Innere der Plastikflasche bzw. an einen Nährbeutel in der Flasche gebunden ist.

[0018] [Fig. 5](#) zeigt die Inaktivierung von Lymphozyten ([Fig. 5\(a\)](#))-, Makrophagen ([Fig. 5\(b\)](#))-, sowie doppel-tropischen ([Fig. 5\(c\)](#)) Stämmen von HIV-1 in Gegenwart von N-9, C31G und SDS.

[0019] [Fig. 6](#) zeigt die Verminderung der zellassozierten Infektivität ([Fig. 6\(a\)](#)) und Lebensfähigkeit ([Fig. 6\(b\)](#)) von HIV-1 in infizierten SupT1-Zellen mittels N-9, C31G und SDS.

DETAILLIERTE BESCHREIBUNG DER BEVORZUGTEN AUSFÜHRUNGSFORMEN

[0020] Wir haben gefunden, dass SDS und verwandte anionische Tenside eine starke spermizide und viruzide Aktivität besitzen, einschließlich einer viruziden Aktivität gegen nicht umhüllte Viren, einschließlich Papillomaviren, ebenso wie gegen HSV-2 und HIV-1. Wie hier verwendet, bezeichnet „SDS oder verwandtes anionisches Tensid“ Natriumdodecylsulfat und andere Mitglieder der viruziden Alkylsulfatgruppe, einschließlich, jedoch nicht beschränkt auf, Lithiumdodecylsulfat, Laurinsäure und Salze oder andere Derivate hiervon.

[0021] In den von den Erfindern durchgeführten Versuchen inaktivierten sehr niedrige Konzentrationen des Detergens/Tensids SDS HSV-2 und HIV-1 vollständig, ebenso wie drei getrennte Papillomavirus-Typen nach kurzer Exposition gegenüber SDS bei physiologischen Temperaturen. In allen Fällen lagen SDS-Konzentrationen von 0,1% gut über denjenigen Konzentrationen, die eine vollständige Inaktivierung des Virus zeigten. Verwandte anionische Tenside und Derivate zeigten ebenfalls signifikante viruzide Aktivität.

[0022] Wie hier verwendet, bedeutet "viruzid" befähigt zur Inaktivierung oder Zerstörung eines Virus. Ein empfindliches Virus ist jedwedem Virus, das durch SDS oder verwandte anionische Tenside inaktiviert oder zerstört wird. Die empfindlichen Viren lassen sich in Tests wie den unten beschriebenen problemlos identifizieren, wobei die Menge oder Konzentration an SDS oder verwandten anionischen Tensiden als viruzid angesehen wird, wenn der Virustiter um wenigstens 99,9% (3 log-Einheiten) reduziert wird.

[0023] Die Erfindung kann sowohl in vitro als auch in vivo ausgeführt werden. In vitro bedeutet in oder an nicht belebten Dingen, insbesondere an Objekten mit harten oder weichen Oberflächen, die dort befindlich sind oder verwendet werden, wo eine Verhinderung von Virusübertragung gewünscht ist. Harte Oberflächen beinhalten diejenigen von Babyflaschen, medizinischen Instrumenten, Beuteln, Kathetern, Röhren/Schläuchen und anderen innewohnenden medizinischen Gerätschaften. Derartige Oberflächen beinhalten auch das Innere von Gebäuden, Mobiliar, Badezimmereinrichtungen, die Ausstattung von Turnhallen und für Außengehege, z.B. zur Unterbringung von Vieh. Weiche Oberflächen beinhalten solche aus Papier oder Stoff, z.B. vorab befeuchtete Polster oder Gewebe, trockene Gesichtstücher, Krankenhausbekleidung und Bettwäsche. In vivo bedeutet in oder an einer lebenden Person, Pflanze oder einem Tier, insbesondere an Säugerhaut und Schleimhäuten, einschließlich intravaginaler, oraler oder rektaler Schleimhäute.

[0024] SDS oder ein verwandtes anionisches Tensid kann alleine oder in Form einer Zusammensetzung, enthaltend oder im wesentlichen bestehend aus einer viruzid wirksamen Konzentration an SDS oder einem verwandten anionischen Tensid und einem annehmbaren pharmazeutischen Träger, verwendet werden. Ein viruzider Effekt kann unabhängig davon erreicht werden, ob die Zusammensetzung in Kontakt mit dem Virus ge-

bracht wird oder umgekehrt, wann immer der Kontakt mit einem bekannten oder potentiellen Aufenthaltsort des Virus erfolgt. Viruzid wirksame Konzentrationen von SDS oder einem verwandten anionischen Tensid liegen allgemein im Bereich von 0,05 bis 5 Gewichts-%, obwohl in Abhängigkeit von den spezifischen Umständen eine größere oder kleinere Konzentration verwendet werden kann.

[0025] Die gemäß der Erfindung verwendeten Zusammensetzungen beinhalten topische viruzide Anwendungen sowohl für in vitro- als auch für in vivo-Zwecke, insbesondere für die intravaginale Verwendung. Für diese Zwecke kann das SDS oder ein verwandtes anionisches Tensid in jedem geeigneten Vehikel formuliert werden, vorausgesetzt, dass das Tensid und das Vehikel kompatibel sind, d.h., dass die mikrobizide Aktivität des Tensids nicht durch das Vehikel vermindert wird. Entsprechend können die Zusammensetzungen in Form von Cremes, Schäumen, Lotionen, Salben, Lösungen oder Sprays vorliegen. Der Träger oder das Vehikel-Verdünnungsmittel können wässrig oder nicht-wässrig, z.B. alkoholisch oder ölig, sein, oder ein Gemisch hiervon darstellen, und sie können zusätzlich weitere Tenside, Weichmacher, Gleitmittel, Stabilisatoren, Farbstoffe, Parfums, antimikrobielle Agenzien entweder als Wirkstoffe oder als Konservierungsstoffe, sowie Säuren oder Basen zur Einstellung des pH, enthalten. Der bevorzugte pH ist etwa 4 bis 5. Es werden konventionelle Verfahren bei der Herstellung der Zusammensetzungen verwendet.

[0026] Das bevorzugt gemäß der vorliegenden Erfindung verwendete mikrobizide und spermizide Mittel ist SDS. Vorzugsweise liegt der annehmbare pharmazeutische Träger oder das annehmbare pharmazeutische Vehikel für die topisch applizierten Zusammensetzungen in Form von Flüssigkeit, Gel oder Schaum vor, die das Tensid enthalten. Das Tensid kann eingebaut werden in: (a) Salben und Gele, (b) Einsatz/Einschub-Elemente (Zäpfchen, Schwämme und dergleichen), (c) Schäume, und (d) Duschmittel.

[0027] Die topische Zusammensetzung kann prophylaktisch oder therapeutisch an den Häuten oder Schleimhäuten des Menschen oder anderer tierischer Organismen appliziert werden, um die Vorbeugung und Behandlung verschiedener medizinischer Zustände, die von Bakterien, umhüllten Viren und nicht umhüllten Viren verursacht werden, zu erlauben. Diese Zustände beinhalten z.B. von Herpesvirus verursachte Läsionen, aphthöse Geschwüre, Akne, Haut- und Fußsohlen-Warzen, Papillome des Atmungssystems, Herpangina, herpetische Speiseröhrenentzündung, Molluscum contagiosum, behaarte Leukoplakie, sowie orale oder genitale Candida-Infektionen.

[0028] Die topische Zusammensetzung wird bevorzugt in die Vagina einer Frau, etwa zum Zeitpunkt, und bevorzugt vor dem Geschlechtsverkehr, eingeführt, kann jedoch auch bei anderen Schleimhäuten appliziert werden. Die Zusammensetzungen können für die Behandlung und den Schutz bei sexuell übertragbare Krankheiten verwendet werden. Die Art der Verabreichung wird vorzugsweise derart gestaltet sein, dass ein direkter Kontakt der Tensidzusammensetzungen der Erfindung mit den sexuell übertragbaren Mikroben erreicht wird.

[0029] Für topische Applikationen kann der pharmazeutisch geeignete Träger zusätzlich organische Lösungsmittel, Emulgatoren, Gelbildner, Feuchtigkeitsspender, Stabilisatoren, weitere Tenside, Benetzungsmittel, Konservierungsstoffe, Mittel zur retardierten Wirkstofffreisetzung, sowie geringe Mengen an Feuchthaltemitteln, Komplexbildnern, Farbstoffen, Duftstoffen, und weitere, üblicherweise in pharmazeutischen Zusammensetzungen für die topische Applikation verwendete Bestandteile umfassen.

[0030] Feste Darreichungsformen für die topische Applikation beinhalten Zäpfchen, Puder und Granulate. Bei festen Darreichungsformen können die Zusammensetzungen mit wenigstens einem inerten Verdünnungsmittel, wie etwa Sucrose, Laktose oder Stärke gemischt werden, wobei sie zusätzlich Gleitmittel, Puffersubstanzen und andere Komponenten enthalten können, die Fachleuten wohlbekannt sind.

[0031] Die gemäß der Erfindung verwendeten Zusammensetzungen können auch zum Imprägnieren bzw. Tränken absorbierender Trägermaterialien, wie etwa Schwämmen, verwendet werden, oder als Beschichtung auf die Oberfläche fester Trägermaterialien, wie etwa bei Kondomen, Diaphragmas oder medizinischen Handschuhen, aufgebracht werden, um die Zusammensetzungen an das vaginale oder ein anderes potentiell infizierbares Epithel abzugeben, bevorzugt vor oder während des Geschlechtsverkehrs. Andere Produkte und Abgabesysteme dieses Typs werden Fachleuten leicht erkennbar sein. Unter den nun bevorzugten Produkten sind Kondome, die durch Aufsprühen von SDS auf die Oberflächen der Kondome beschichtet werden können, oder durch Imprägnieren des Kondoms mit SDS bei der Herstellung durch in der Technik bekannte Verfahren beschichtet werden können. Bevorzugte Beschichtungszusammensetzungen beinhalten Silikon, das Gleitfähigkeit vermittelt und das Tensid in einer zeitverzögerten Weise freisetzt. Bioadhäsive Polymere können ebenfalls verwendet werden, um die Aspekte der zeitverzögerten Freisetzung bei den insbesondere topischen oder anderen verwendeten Medikamenten zeitlich zu verlängern.

[0032] Die gemäß der Erfindung verwendeten Zusammensetzungen können ein breites Spektrum von Infektionen durch pathogene Mikroben verhindern und behandeln. Wie hier verwendet, sollen die „pathogenen Mikroben“ pathogene Bakterien, Pilze, Viren, Hefe, Chlamydia oder Protozoen beinhalten, die sich normalerweise nicht in dem Wirt befinden oder die dazu befähigt sind, eine Erkrankung des Wirts hervorzurufen, und die durch SDS oder verwandte anionische Tenside, wie hier im Detail beschrieben, abgetötet werden können.

[0033] Unter den bevorzugten pathogenen Mikroben als Ziele der Zusammensetzungen und Verfahren der Erfindung sind Papillomaviren (PVs), die eine Gruppe nicht umhüllter, ikosaedrischer DNA-Viren darstellen. Die PVs induzieren gutartige Neoplasien, die sich zu Krebs weiterentwickeln können. Tierische Papillomaviren kommen bei einer großen Anzahl von Spezies vor; bestimmte Viren, wie etwa die Rinder-Papillomaviren (BPVs) und das Cottontail-Rabbit-Papillomavirus (CRPV), stellen gut untersuchte Modellsysteme dar. HPVs verursachen Warzen in epithelialen Zielgeweben: Verrucae vulgaris, Fußsohlenwarzen und genitale Condylomata stellen sämtlich gewöhnliche klinische Infektionen beim Menschen dar. Die Zusammensetzungen und Verfahren der Erfindung sind nutzbringend bei der Vorbeugung und Kontrolle dieser humanen Infektionen, und ebenso zur Vorbeugung und Kontrolle genitaler Läsionen, die HPV enthalten, und die sich, wenn sie unbehandelt bleiben, bis zur Bösartigkeit entwickeln können.

[0034] Da Gebärmutterhalskrebs an Position eins der mit Krebs in Beziehung stehenden Todesfälle bei Frauen in den Entwicklungsländern steht, sollte eine wirksame Vorbeugung der Übertragung von HPV eine signifikante Auswirkung auf die Weltgesundheit haben. Dementsprechend umfasst ein bevorzugtes Verfahren der Erfindung das Kontaktieren der viruziden Zusammensetzungen der Erfindung mit HPVs, die während sexueller Aktivität auf die Vagina oder andere Schleimhäute übertragen werden. Die bevorzugte Weise des Kontakts erfolgt durch die Verwendung einer topischen pharmazeutischen Zusammensetzung, die SDS in einer hinreichenden Menge enthält, um die Übertragung von, bzw. die Infektion mit HPV zu kontrollieren oder zu verhindern, oder durch die Verwendung eines entsprechend beschichteten oder imprägnierten Kondoms. Die spermizide Aktivität der Wirkstoffe des Kondoms und anderer Produkte und Zusammensetzungen der Erfindung bieten einen weiteren Vorteil, wenn die Verhütung von Schwangerschaft gewünscht ist.

[0035] Zusätzlich können das SDS und verwandte anionische Tensidzusammensetzungen und Verfahren der Erfindung in breitem Umfang als Desinfektionsmittel für die wirksame Inaktivierung nicht umhüllter und umhüllter, tierischer und humaner Viren an Oberflächen, wie etwa Böden, medizinischen Instrumenten, Badezimmeroberflächen und der Ausstattung im Turn- und Fitnessbereich, verwendet werden. Die Desinfektionsmittelzusammensetzung, die SDS oder verwandte anionische Tenside enthält, wird bevorzugt in einen Zerstäuber des Spray-Typs eingebracht, wodurch sie direkt auf die zu behandelnde Oberfläche aufgesprüht werden kann. Für den Benutzer wäre ein Beispiel für eine solche Anwendung, die Zusammensetzung auf Oberflächen in öffentlichen Warteräumen oder von Turn/Fitness-Ausstattungen aufzusprühen, um sämtliche pathogenen Mikroben abzutöten, die von anderen Personen stammen, die diese Einrichtungen benutzt haben. Die Desinfektionsmittelzusammensetzung enthält bevorzugt SDS in Lösung oder Suspension mit einem Verdünnungsmittel wie etwa Phosphat-gepufferter Saline bei 0,05 bis 1,0 Gewichts-% an SDS.

[0036] Ein weiterer Aspekt der Erfindung stellt eine Nährflasche gemäß Anspruch 9 bereit.

[0037] Eine besonders bevorzugte Ausführungsform der Erfindung betrifft die Einbeziehung von SDS oder verwandten anionischen Tensiden in Anbindung an eine feste Oberfläche (entweder eine Oberfläche aus Kunststoff oder einem ähnlichen Material, oder die Oberfläche von Beads, die z.B. in Form der Matrix eines Gels oder einer Filtrationsvorrichtung vorliegen können). Diese Ausführungsform beinhaltet z.B. Behälter oder Röhrchen für biologische Flüssigkeiten, die Oberfläche von Säuglingsflaschen, Kunststoff-Manschetten für Säuglingsflaschen, oder Filter, die in den Aufbau des Saugerelements von Säuglingsflaschen oder in andere Behälter oder Röhrchen für biologische Flüssigkeiten eingebaut werden können. Das Tensid wird vorzugsweise kovalent angebonden, sodass es nicht ausgewaschen werden kann. Diese Ausführungsform kann verwendet werden, um HIV und HIV enthaltende Zellen in Muttermilch von HIV-positiven, stillenden Müttern zu inaktivieren.

[0038] Fig. 4(a) zeigt die Saugvorrichtung **10** einer Nährflasche, beinhaltend ein flexibles Saugerelement **11**, typischerweise bestehend aus Silicon oder Latex, und eine Verschlusskappe **12** mit einer zentralen Öffnung **13**, aus der ein verlängerter Teil des Saugerelements **11** herausragt. Das Saugerelement **11** beinhaltet einen Flansch **15**, der sich von dem flexiblen Saugerelement radial nach außen erstreckt. Die Filtereinheit **16** innerhalb der Kappe **12** beinhaltet ein Gehäuse **17**, das ein darin befindliches Matrixmaterial **18** enthält. Die Filtereinheit **16** beinhaltet auch eine Abdichtung **9** mit einer Schulter **19**, die sich über eine kurze Strecke innerhalb des Hohlraums des flexiblen Saugerelements **11** erstreckt. Die Abdichtung **9** bildet einen ringförmigen Flansch

20, der sich radial zwischen dem Saugerelement-Flansch **15** und den Wänden **8** der Nährflasche erstreckt, wenn sich die Kappe **12** in Position befindet. Die Kappe **12** kann an den Flaschenwänden **8** mittels Schraubengewinden oder dergleichen befestigt werden.

[0039] Das Matrixmaterial **18** kann SDS oder ein verwandtes anionisches Tensid enthalten, das an das Matrixmaterial gebunden ist, wobei das Matrixmaterial z.B. ein Gel, Beads oder ein anderes Filtermaterial sein kann, durch welches die Muttermilch auf ihrem Weg aus dem Inneren der Nährflasche in den Mund des Säuglings hindurch fließen kann. Entsprechend wird jedwedes zellfreie HIV-Virus oder zellassozierte HIV-Virus aus der Muttermilch durch das Tensid inaktiviert, bevor es von dem Säugling aufgenommen wird. Die Milch einer Frau, die HIV oder eine andere Infektion hat, wird somit aus der Brust der Frau abgepumpt und in die Flasche gefüllt. Das Saugerelement und die zugehörige Filtereinheit für die HIV- oder zellassozierte HIV-Inaktivierung der Muttermilch gemäß der vorliegenden Erfindung wird dann auf der Flasche angebracht, wobei die Flaschenkappe **12**, der Flansch **15** und die Abdichtung **9** die Filtereinheit **16** in Position halten, so dass das Baby dann mit der behandelten Milch gefüttert werden kann, während die Milch noch warm ist.

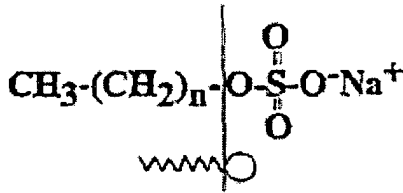
[0040] Alternativ kann das Matrixmaterial **18** ein Material beinhalten, das SDS oder verwandte anionische Tenside chemisch entfernen kann. Gemäß dieser Ausführungsform kann das Tensid mit der warmen Muttermilch gemischt werden, und die Milch dem Baby dann über die Saugereinheit der Erfindung zugeführt werden. In dieser Weise wird das HIV durch Mischen mit dem Tensid inaktiviert. Das Tensid wird dann während des Fütterungsvorgangs durch die Matrix entfernt.

[0041] Wie in den **Fig. 4(b)** und **(c)** dargestellt, kann das Tensid auch an der Innenoberfläche **21** einer Kunststoff-Säuglingsflasche **22** oder an der Innenseite eines Kunststoff-Nährbeutels **23** gebunden sein. Die Milch kann aus der Brust der Mutter abgepumpt werden und dann in die Flasche oder den Beutel gefüllt werden, der das Tensid enthält. Die Flasche und die Milch werden bevorzugt für etwa 10 Minuten geschüttelt und können inkubiert werden, um die Milch dann dem Säugling zuzuführen.

[0042] Vorzugsweise ist das Tensid kovalent gebunden, sodass es einem Auswaschen in die Milch widersteht. Jedwedes Tensid, das die Milch verunreinigen könnte, kann durch die Filtereinheit **16**, die ein Matrixmaterial für schnelle Tensidentfernung enthält, entfernt werden, sodass das Baby keiner durch Aufnahme von Tensid verursachten Diarrhö ausgesetzt ist.

[0043] In entsprechender Weise ist die vorliegende Erfindung auf die Inaktivierung von Viren und anderen Mikroben in einem breiten Spektrum biologischer Flüssigkeiten neben Muttermilch anwendbar. Beispielsweise können verschiedene Katheter, Rohre/Schläuche und andere innewohnende Gerätschaften mit einer Filtereinheit kombiniert werden, die daran gebundenes SDS oder ein verwandtes anionisches Tensid oder ein Material zur Tensidentfernung aufweist, oder das Tensid kann an die Innenoberflächen einer solchen Vorrichtung gebunden sein. Dementsprechend kann die Anbindung von SDS oder einem verwandten anionischen Tensid an eine feste Oberfläche für die mikrobizide Dekontaminierung biologischer Flüssigkeiten in Behältern, Kathetern, medizinischem und pharmazeutischem Röhrenwerk und ebenso in innewohnenden Vorrichtungen in Patienten verwendet werden. Die Anbindung von SDS oder verwandten anionischen Tensiden an feste Oberflächen, wie hier dargestellt, bezieht auch die Oberflächen von Gegenständen ein, die bei der Nahrungsmittelherstellung verwendet werden, wie etwa von Schneidetischen, sowie von Wasser- und Lebensmittelbehältern.

[0044] Natriumdodecylsulfat, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_2\text{OSO}_3\text{Na}$, und Laurinsäure, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{COOH}$, ebenso wie die damit verwandten anionischen Tenside, besitzen sämtlich mikrobizide Aktivität. Die Struktur von SDS ist im folgenden beispielhaft dargestellt.



unpolar

polar

(hydrophob)

(hydrophil)

Molekülstruktur von Natriumdodecylsulfat (SDS)

[0045] Die Tensidmoleküle können durch jedes geeignete Verfahren, das die biologische Aktivität des Tensids nicht beeinträchtigt, kovalent an eine Filtereinheit oder an ein anderes Substrat gebunden werden. Bei einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird das Tensidmolekül über eine Sauerstoffbindung zwischen SiO_2 und dem Säureende des Tensids über das Hydroxyl oder Hydroxyl-Äquivalent des Tensids (z.B. das Natriumsulfat-Ende von SDS) an Siliciumdioxid (lange Ketten von SiO_2) gebunden. Beispielsweise werden das OH an Laurinsäure und der Sauerstoff an SiO_2 abgespalten. Eine Sauerstoffbindung verbindet dann das Silikat mit dem CO-Ende der Laurinsäure. Dieses Verfahren wird in der chemischen Industrie verwendet, um Kohlenstoffketten verschiedener Längen an einer Siliciumdioxid-Matrix zu binden, wobei die resultierenden Substanzen als Säulenmaterialien für die Hochdruck-Flüssigchromatographie verwendet werden. Glas besteht ebenfalls aus geschmolzenen Silicaten, und freie Siliciumdioxid-Gruppen sind an der Oberfläche verfügbar. Dieser Ansatz kann auch dazu verwendet werden, um Alkylketten-Tenside an die Oberfläche von Glas-Säuglingsflaschen zu binden. Diese Ausführungsform stellt ein Verfahren zur Anbindung bzw. Befestigung an jedwede geeignete Oberfläche bereit, beispielsweise beinhaltend die Anbindung an eine Matrix aus Kügelchen.

[0046] Bei einer zweiten bevorzugten Ausführungsform wird SDS oder ein verwandtes Alkylsulfat-Detergens in die oder an der Oberfläche eines Kunststoffmaterials eingebaut. Geeignete Kunststoffe beinhalten z.B. Polyvinylchlorid, Polyethylen, Polyurethan oder Silikon und andere gebräuchliche Substanzen für medizinisches Röhrenwerk, Behälter, Katheter, etc. Diese gleichen Substanzen können auch dafür verwendet werden, um Säuglingsflaschen oder Nährbeutel, sowie Beutel für Serum und Plasma, herzustellen. Die Bindung des Tensids an den Kunststoff kann auch über das Hydroxyl oder eine dem Hydroxyl äquivalente Position des Tensidmoleküls erfolgen (wobei die Fettsäurekette intakt gelassen wird). Die Art der Sauerstoffbindung kann vom Durchschnittsfachmann auf diesem Gebiet unter Beachtung der hier gegebenen Lehre an verschiedene Kunststoffsubstanzen und andere Substanzen angepasst werden.

[0047] SDS oder ein verwandtes anionisches Tensid können auch bei der Polymerisation des Kunststoffpolymers eingebaut werden und dann über einen beträchtlichen Zeitraum kontinuierlich aus der Oberfläche ausgewaschen werden. In Abhängigkeit von der Verwendung für den Kunststoff, z.B. für Säuglingsflaschen, kann es wünschenswert sein, das Tensid zu entfernen, nachdem sein Austritt in die Lösung (Muttermilch) ermöglicht wurde. Dieser Ansatz würde bevorzugt den imprägnierten Kunststoff in Kombination mit einer Matrix zur Tensidentfernung verwenden.

[0048] Somit stellt die vorliegende Erfindung, zusätzlich zu der kovalenten Bindung von SDS und den entsprechenden Derivaten an feste Oberflächen, auch Vorrichtungen und Verfahren bereit, die eine schnelle Entfernung von SDS und seinen Derivaten umfassen. Dies beinhaltet die Durchleitung der mit Tensid behandelten biologischen Flüssigkeiten durch eine geeignete chemische Matrix, um das Tensid zu entfernen. Verschiedene kommerziell erhältliche Matrices, die für die Entfernung solcher Detergentien verfügbar sind, beinhalten z.B. „Extracti-Gel R D Detergent Removal Gel“ und „SDS-OUT SDS Precipitation Reagent“, beide erhältlich bei der Pierce Chemical Company, 3747 N. Meridian Road, P.O. Box 117, Rockford, Illinois 61105 und „Detergent Adsorber Gel polymer beads“, erhältlich bei Roche Molecular Biochemicals, 9115 Hague Road, P.O. Box 50414, Indianapolis, Indiana 46250-0414.

[0049] Im Hinblick auf die Vorrichtungen und Verfahren der vorliegenden Erfindung für die Inaktivierung infektiöser Agenzien, einschließlich nicht umhüllter Viren in Serum und Plasma, beinhalten konventionelle Verfahren zum Erreichen dieser Zielsetzung Triton X-100, wobei hier jedoch erkennbar ist, dass nicht umhüllte Viren

nicht inaktiviert werden. Bei den Bemühungen, Gerinnungsfaktoren, Antikörperpräparationen, usw. herzustellen, werden sehr große Chargen an Serum und Plasma produziert. Nach der Oberflächenbehandlung wird das Triton mittels Filtration über Säulen, die das Detergens entfernen, abgetrennt. Es gibt zunehmende Anhaltspunkte, dass eine Zahl nicht umhüllter Viren in dem Serum vorhanden ist. Diese können humane Papovaviren, humanes Picornavirus und humanes Parvovirus beinhalten. Humane Papovaviren, wie etwa das JC-Virus, sind in der menschlichen Bevölkerung im Umlauf, sind latent in den meisten Personen vorhanden, können jedoch eine einheitlich tödliche Erkrankung des Zentralnervensystems, bezeichnet als fortschreitende multifokale Leukoencephalopathie, bei 5-8% der AIDS-Patienten verursachen. Dieses Virus befindet sich in derselben Familie wie die HPVs und wird ebenfalls durch SDS und die Derivate inaktiviert. Das humane Picornavirus, Hepatitis A-Virus, dringt über den oralen Weg in den Körper ein, repliziert sich im Darm und verbreitet sich über das Blut in die Leber. Dieses Virus kann eine akute Hepatitis mit einer Sterblichkeit von 1% verursachen. Das humane Parovirus, B-19, verursacht fünf Erkrankungen, kann jedoch bei einer kleinen Anzahl prädisponierter Individuen tödlich sein. Dieses Virus gelangt über den Weg der Atmung in den Körper, repliziert sich im Mundrachenraum, und findet sich dann in großen Mengen im Blut. Die Entfernung dieser infektiösen Agenzien aus dem Blutpool ist eine Aufgabe der öffentlichen Gesundheit von höchster Wichtigkeit.

[0050] Die Dosierungsmengen und Konzentrationen des Tensids in den erfindungsgemäß verwendeten Zusammensetzungen können variiert werden, um so Mengen in Kontakt mit den sexuell übertragbaren oder andersartigen biologischen Flüssigkeiten zu erhalten, um den gewünschten therapeutischen oder prophylaktischen Effekt bei einem bestimmten Tensid und einem bestimmten Applikationsverfahren zu erzielen. Entsprechend wird der gewählte Dosierungsbereich oder die Konzentration von der Natur und Stelle der Infektion, der gewünschten therapeutischen Reaktion, der Route der Verabreichung bzw. des Kontakts, der gewünschten Dauer der Behandlung oder des Kontakts und anderen Faktoren abhängen. Im allgemeinen wird die bevorzugte Konzentration und Dosierung für SDS im Bereich von 0,05 bis 2,0 Gewichts-% liegen. Eine bevorzugte topische, vaginale Dosierungsform ist eine Creme oder ein Zäpfchen, wie oben beschrieben, enthaltend 0,05 bis 2,0 Gewichts-% der Zusammensetzung gemäß der Erfindung. Bei jeder Behandlung, typischerweise 2mal täglich, werden 1 bis 5 ml einer solchen Darreichungsform intravaginal appliziert, bevorzugt hoch in der Vaginalöffnung. Größere Mengen werden im allgemeinen vermieden, um das Austreten zu minimieren.

[0051] SDS ist von geringer intrinsischer Toxizität, sowohl gegenüber Haut als auch gegenüber Schleimhäuten. Zubereitungen, wie etwa Shampoos und Detergentien, die sowohl mit der Haut als auch mit den Schleimhäuten in Kontakt kommen, enthalten Dodecylsulfat-Derivate (Natrium- oder Ammonium-Dodecylsulfat) in Konzentrationen, die 10% überschreiten. Weiterhin weisen Produkte, die regelmäßig in der Mundhöhle verwendet werden, wie etwa Zahnpaste, hohe Konzentrationen (5-8%) dieser Verbindungen auf und sich nicht akut toxisch gegenüber der Mundschleimhaut. Bei den unten dargestellten Beispielen waren viruzid wirksame Konzentrationen von SDS nicht toxisch bei Kaninchenhaut und der humanen Vorhaut von Neugeborenen.

[0052] Di hier beschriebenen und diskutierten Beispiele sind zur Veranschaulichung der vorliegenden Erfindung gedacht, jedoch nicht als einschränkend zu verstehen. Zahlreiche Variationen und Modifikationen können realisiert werden, ohne von dem Schutzbereich der neuartigen Konzepte der vorliegenden Erfindung abzuweichen.

BEISPIEL 1

ANTIVIRALE AKTIVITÄT VON SDS

MATERIALIEN UND METHODEN

Chemikalien

[0053] SDS wurde von Bio-Rad (Richmond, CA) bezogen und sterilfiltrierte Lösungen wurden in Phosphat-gepufferter Saline (PBS) hergestellt. N-9 wurde von Rhone-Poulenc Rorer Pharmaceuticals Inc. (Collegeville, PA) bezogen. Alle übrigen Reagenzien wurden bei Boehringer Mannheim (Indianapolis, IN) erworben. Das folgende Reagenz wurde über das AIDS Research and Reference Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH erhalten: HeLa-CD4-LTR- β -Gal von Dr. Michael Emerman.

[0054] HSV-2 Inaktivierungs-Test. HSV-2 (Stamm 333) Virusstammansätze wurden durch eine gering multiplicative Infektion von Nierenzellen der afrikanischen Grünen Meerkatze (CV-1-Zellen) und durch die nachfolgende Präparation zellfreier Überstände aus gefrorenen und aufgetauten Präparationen lytisch infizierter Kulturen vermehrt. Die Virustiter wurden durch Test in CV-1-Zell-Monolagern bestimmt. Die Virusstammansätze

wurden in CV-1-Zellkulturmedium gehalten, bei dem es sich um Dulbecco's Medium handelte, das mit Antibiotika und 10% fetalem Kälberserum supplementiert war. Die Proteinkonzentration der Virusstamm-Ansätze wurde außerdem durch Serumproteine und durch zelluläre Proteine erhöht, die durch das Gefrieren und Auftauen der infizierten Zellen freigesetzt wurden.

[0055] Zur Inaktivierung von HSV-2 wurden 39 µl an Virus mit 1 µl an 40fach konzentrierter Detergenslösung gemischt und dann für 10 min bei 37°C inkubiert. Nach der Inaktivierung wurden die 40 µl der Virusprobe unter Verwendung von Zellkulturmedium auf 4 ml verdünnt (1:100), und 1 ml des verdünnten Virus wurde für 1 h bei 37°C auf CV-1-Monolayern adsorbiert. Nach der Adsorption wurden die Monolayer erneut gefüttert und bei 37°C, 5% CO₂, inkubiert. Zwischen 20 und 24 h nach der Infektion wurden die Monolayer fixiert, mit Kristallviolett angefärbt und die Plaques unter Verwendung eines Dissektionsmikroskops gezählt. Die Zahlen in Tabelle 1 stellen jeweils den Durchschnitt von 2 Platten dar.

[0056] Test auf HIV-1 Inaktivierung. Einen Tag vor dem Test wurden HeLa-CD4-LTR-β-Gal-Zellen bei einer Konzentration von 8×10^4 Zellen pro Well in 12-Well-Kulturschalen angesetzt. Ein hoher Titer ($10^{7,17}$ TCID₅₀/ml) Virusstamm-Ansatz von HIV-1 (Stamm IIIB; Advanced Biotechnologies, Inc., Columbia, MD) wurde 1:10 mit RPMI 1640 verdünnt, das mit 10% FBS supplementiert war. Um die virale Inaktivierung durch SDS zu bestimmen, wurden 78 µl des verdünnten Virus mit 2 µl an Detergenslösung gemischt und für 10 min bei 37°C inkubiert. Nach der Zeitspanne der Inaktivierung wurden Virus und Detergens mit 720 µl R10 (1:10), supplementiert mit DEAE-Dextran (20 µg/ml Endkonzentration), verdünnt. Aliquots des behandelten Virus (300 µl) wurden dann zu doppelten Wells mit HeLa-Zellen hinzu gegeben und für 2 h bei 37°C inkubiert. Nach der viralen Adsorption wurden 2 ml frisches Medium (DMEM, supplementiert mit 10% FBS, 0,1 mg/ml G418 und 0,05 mg/ml Hygromycin B) zu jedem Well hinzu gegeben. Nach einer Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ für 48 h nach der Infektion wurden die Zellen fixiert und im Bezug auf β-Galactosidase-Expression angefärbt.

[0057] BPV-1 Fokus-Test. Zellfreie Stammansätze von BPV-1 wurden durch Extraktion (10% w/v) epidermaler Rinderwarzen in Phosphat-gepufferter Saline (PBS) hergestellt. Um das transformierende Potential von BPV-1 zu detektieren, wurden C127-Mauszellen in T-25²-Kolben angesetzt (3×10^5 Zellen pro Kolben). Nach 24 h Wachstum wurden die Zellen, die sich im Zustand der Subkonfluenz befanden, mit BPV-1 infiziert. Als Positivkontrolle wurde der virale Stammansatz (20 µl) mit PBS verdünnt (1:1), bei 37°C für 10 min inkubiert, 1:10.000 verdünnt und dann (mit 100 µl) in die 5 ml des Zellkulturmediums gegeben, das sich auf den Zellen befand. Die Zellen wurden nach 24 h erneut gefüttert, und nachfolgend 2mal pro Woche. Das Vorliegen morphologisch transformierter Foci wurde nach 2 Wochen und dann wieder nach 3 Wochen gezählt.

[0058] Die Inaktivierungen des Virus wurden in vitro durch Zugabe von konzentrierten SDS-Lösungen zu den Virusstammansätzen (20 µl an Virus plus 20 µl an Detergens) und nachfolgende Inkubation bei 37°C für 10 oder 30 min, wie angezeigt, durchgeführt. Nach der Inaktivierung wurde das Virus 1000fach verdünnt, um die Detergenskonzentration zu verringern, und die Präparationen wurden unverzüglich, wie oben angegeben, für die Infektion verwendet.

[0059] Shope-Papilloma-Induktion. Stammansätze von Shope-CRPV wurden aus Papillomaviren hergestellt, die in einer wildlebenden Form des Baumwollschwanzkaninchens erzeugt worden waren. Die Virusstammansätze waren zellfreie Extrakte (10% w/v) von Papillomaviren in PBS. Die rasierte Rückenhaul wurde mit einer Rasierklinge leicht verletzt. Die Virusstämme wurden verwendet, um die domestizierte Form des Baumwollschwanzkaninchens (Hazelton Research Products, Denver, PA) zu inokulieren; ein 40 µl-Aliquot des Virus wurde auf die Oberfläche von vier Positionen der Rückenhaul getropft. Die 2 linken Stellen bei jedem Kaninchen erhielten unbehandeltes Virus, und die 2 rechten Stellen erhielten behandeltes Virus. Die Inaktivierung einer entweder 10⁻¹- oder 10⁻²-Lösung des Virusstammansatzes erfolgte durch die Zugabe von konzentrierten SDS-Lösungen, die das 40fache der angegebenen Endkonzentrationen enthielten. Die Inkubation von SDS und Virus erfolgte bei 37°C für 10 min, und das Virus wurde unverzüglich verwendet, um Kaninchen zu inokulieren. Das Virus wurde nach der Inaktivierung nicht verdünnt und die bei der Inaktivierung und Inokulation vorliegende Konzentration an SDS betrug 0,05%. Eine Entwicklung von Papillomen wurde zum ersten Mal etwa 2 Wochen nach der Inokulierung an den Kontroll-Stellen beobachtet. Es wurde das geometrische Mittel des Durchmessers (GMD) für alle sichtbaren Läsionen gemessen; dieses entspricht der Kubikwurzel von Länge × Breite × Höhe der Läsionen, gemessen in Millimetern mittels Greifzirkeln.

[0060] Induktion von humanem Papillomavirus. Es wurden Stammansätze von experimentell erzeugtem, infektiösem HPV11 hergestellt, die 10%ige (w/v) zellfreie Extrakte des Virus in PBS darstellten. Unverdünnte Aliquots der Virusstammansätze (39 µl) wurden mit 1 µl einer 40fach konzentrierten Lösung von SDS gemischt, für 10 min bei 37°C inkubiert und sofort dazu verwendet, um zerteilte Lagen von Transplantationsmaterial aus

dem Vorhautepithel menschlicher Neugeborener zu infizieren. Das Virus wurde nachfolgend nicht verdünnt. Die Kontroll-Transplantate wurden mit unbehandeltem Virusstammansatz infiziert. Die Virusadsorption erfolgte für 1 h bei 37°C. Die Konzentration von SDS, die während der Phase der Inaktivierung und während der Virus-Adsorption vorhanden war, betrug 0,05%. Die Transplantate wurden dann unter die Nieren-Bindegewebskapsel thymusloser Mäuse transplantiert. Die Tiere wurden in der Tierkolonie des Hershey Medical Center in Isolatorglocken mit Antibiotika-supplementiertem Trinkwasser gehalten. Drei Monate nach der Infektion wurden die Tiere getötet, ihre Nieren entnommen und die Fremdtransplantate gründlich untersucht. Die restlichen Organe wurden auf jedwede ersichtliche Normabweichungen hin untersucht, wobei nichts festgestellt wurde. Teile jedes Transplantats wurden sofort in 10-fachem, neutralgepuffertem Formalin fixiert und durch histologische Standardtechniken zur Anfärbung mit Hämatoxylin und Eosin weiterverarbeitet.

[0061] Ein zweites Set von Kontrolltransplantaten wurde lediglich identischen Konzentrationen an SDS, jedoch keinem Virus ausgesetzt. Diese Transplantate wurden an den Tagen 1, 5, 11 und 20 nach der Transplantation geerntet, um die Lebensfähigkeit und das Wachstum der Transplantate nach der SDS-Exposition zu verfolgen.

ERGEBNISSE

Inaktivierung der Infektivität von HSV-2 durch SDS.

[0062] In fünf getrennten Versuchen waren die Behandlungskonzentrationen von SDS bei nur 0,0125% bis 0,025% wirksam bei der Eliminierung der viralen Fähigkeit, Plaques in einem Monolayer von Affennierenzellen zu induzieren (Tabelle 1). Eine völlige Inaktivierung von HSV-2 wurde mit SDS-Konzentrationen zwischen 0,0025% und 0,0125% erreicht. Diese wirksamen Konzentrationen sind ähnlich den Konzentrationen von N-9, die für die Zerstörung der Infektivität von HSV benötigt werden (Daten nicht gezeigt).

Tabelle 1

*% SDS bei der Behandlung	** % SDS Konzentration am Ende	Plaques/Platte (5 Versuche)
0	0	57/73/343/145/145
1×10^{-1}	1×10^{-3}	0/0/0/0/0
5×10^{-2}	5×10^{-4}	0/0/0/0/0
$2,5 \times 10^{-2}$	$2,5 \times 10^{-4}$	0/0/0/0/0
$1,25 \times 10^{-2}$	$1,25 \times 10^{-4}$	0/0/0/0/0
$2,5 \times 10^{-3}$	$2,5 \times 10^{-5}$	28/54/322/145/104

* Es wurden sterile SDS-Stammlösungen mit dem 40fachen der Behandlungskonzentration zu den Virusali-quots hinzu gegeben, um die Behandlungskonzentration zu erreichen. Nach dem Mischen wurden die Proben für 10 Minuten bei 37°C inkubiert.

** Nach der SDS-Behandlung wurden die Virusstammansätze 100fach verdünnt und 1ml-Aliquots wurden unverzüglich auf CV-1-Zellen adsorbiert. Die Plaques wurden 20-24 Stunden nach der Infektion gezählt. Jede Zahl stellt den Mittelwert von 2 Platten dar.

[0063] Inaktivierung der Infektivität von HIV-1 durch SDS und das nicht-ionische Detergens C31G. Es ist etabliertes Wissen, dass N-9 HIV-1 inaktivieren kann. Wir haben die Inaktivierung von HIV-1 durch ein zweites, nicht-ionisches Detergens, C31G, und durch SDS miteinander verglichen. HIV-1-Virusstammansätze mit hohem Titer wurden entweder mit C31G oder SDS inkubiert und das Virus dann auf Indikatorzellen getestet, die β -Gal unter der Kontrolle des HIV-1 LTR exprimieren. Nach 48 Stunden wurden die Zellen angefärbt und die Anzahl der Zellen gezählt, die vermehrt β -Gal exprimieren. Beide dieser Detergentien waren hochwirksam bei der Inaktivierung von HIV-1 (Tabelle 2). Eine völlige Inaktivierung von HIV-1 wurde mit C31G-Konzentrationen von nur 0,0125% und mit SDS-Konzentrationen von nur 0,025% erreicht.

Tabelle 2

% C31G bei der Behandlung	*% der Zellen, die das LTR-β- Gal—Gen exprimieren (doppelte Wells)	gezählte Zellen
5×10^{-2} (toxisch)	0; 0	$> 10^6$
$2,5 \times 10^{-2}$	0; 0	$> 10^6$
$1,25 \times 10^{-2}$	0; 0	$> 10^6$
$6,25 \times 10^{-3}$	19 +/- 6,1; 19 +/- 6,4	1080; 805
$2,5 \times 10^{-3}$	22 +/- 7,4; 29 +/- 8,1	1620; 1820
% SDS bei der Behandlung		
5×10^{-2}	0; 0	$> 10^6$
$2,5 \times 10^{-2}$	0; 0	$> 10^6$
$1,25 \times 10^{-2}$	24 +/- 3,3; 24 +/- 10	2810; 2190
$6,25 \times 10^{-3}$	10 +/- 1,7; 15 +/- 2,1	2390; 2290
$2,5 \times 10^{-3}$	9 +/- 5,5; 11 +/- 3,5	1940; 1910
scheininfizierte Zellen	0; 0	$> 10^6$
HIV-1-infizierte Zellen	17 +/- 4,8; 24 +/- 5,4	2680; 1480

* Es wurden fünf zufällige Felder von Zellen auf jeder Platte, die blaue Zellen zeigte, ausgezählt.

* Für jede Probe wurden doppelte Platten getestet; die einzelnen Zahlen entsprechen der Standardabweichung in 5 Feldern einer Platte.

[0064] Zerstörung der Fähigkeit von BPV-1 zur Induzierung morphologisch transformierter Foci in Monolayern von C127-Mauszellen. Obwohl SDS die Infektivität von HSV-2 wirksam reduzieren konnte, war es möglich, dass diese Zerstörung auf der Entfernung der Hülle basierte. Da Papillomaviren nicht umhüllte Viren sind, blieb die Möglichkeit, dass SDS nicht dazu in der Lage sein würde, diese Viren zu inaktivieren. Wir haben BPV-1 als prototypisches PV verwendet, da es die Fähigkeit besitzt, schnell (innerhalb von 2 Wochen) mehrschichtige, transformierte Foci in Mäusefibroblasten bei einem in vitro-Test auszubilden. Tabelle 3 beschreibt die Ergebnisse zweier getrennter Versuche, bei denen Stammsätze von BPV-1 bei 37°C mit verschiedenen Konzentrationen an SDS (5% bis 5×10^{-4} %) für entweder 10 oder 30 Minuten inkubiert wurden, dann zur Verringerung der SDS-Konzentration verdünnt wurden (um Zell-Toxizität zu vermeiden) und schließlich verwendet wurden, um C127-Zellen zu infizieren. Nach der Inkubation der Kontrolle bzw. der infizierten Kulturen wurden die Foci 14 und 17 Tage nach der Infektion gezählt. Die Ergebnisse zeigen, dass SDS in Konzentrationen von nur 0,05% oder 0,005% die Fähigkeit von BPV-1 zur Transformation nach der Behandlung des Virus bei 37°C für 10 bzw. 30 Minuten vollständig inaktivieren kann. Die Inaktivierung von BPV-1 durch die niedrigere Konzent-

ration von 0,005% nach 30 Minuten zeigte ferner, dass die Inaktivierung sowohl zur Zeit als auch zur Detergentskonzentration proportional ist. Tabelle 4 listet verschiedene andere kommerziell erhältliche Detergentien auf, die hinsichtlich einer möglichen Inaktivierung von BPV-1 getestet wurden. Keines dieser Detergentien inaktivierte die morphologisch transformierenden Eigenschaften von BPV-1.

Tabelle 3

* % SDS bei der Behandlung	** % SDS Konzentration am Ende	Foci/Platte Versuch 1 Tag 12	Foci/Platte Versuch 2 Tag 14	Tag 17
0	0	266	255	153
5	5×10^{-3}	0	N.D.	N.D.
5×10^{-1}	5×10^{-4}	0	N.D.	N.D.
5×10^{-2}	5×10^{-5}	0	0	0
5×10^{-3}	5×10^{-6}	0	271	150
$2,5 \times 10^{-3}$	$2,5 \times 10^{-6}$	N.D.	273	162
5×10^{-4}	5×10^{-7}	N.D.	229	151

* Es wurden sterile SDS-Stammlösungen mit dem 40fachen der Behandlungskonzentrationen zu den Virusali-quots hinzu gegeben, um die Behandlungskonzentration zu erreichen.

** Nach der Virusbehandlung wurden behandelte Virusstammansätze 1:1000 weiter verdünnt, um das Detergens zu verdünnen.

In Versuch 1 wurden Virus und SDS gemischt und bei 37°C für 30 Minuten inkubiert.

In Versuch 2 wurden Virus und SDS gemischt und bei 37°C für 10 Minuten inkubiert.

N.D. = nicht durchgeführt

In den Kontrollplatten ohne BPV-1 erschienen keine Foci.

Tabelle 4. Detergentien, die die von BPV-1 verursachte morphologische Transformation von C127-Zellen nicht verhindern konnten.

Nonoxynol-9

C31G

3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-2-hydroxy-1-propansulfonat (CHAPSO)

N-dodecyl-N,N-dimethyl-3-ammonio-1-propansulfonat-3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat (CHAPS)

Isotridecylpoly(ethylen-glykolether)_n

Octanoyl-N-methyl-glucamid (MEGA-8)

Triton X-100

Thesit

[0065] Alle Detergentien außer C31G und N-9 wurden bei Boehringer Mannheim bezogen, N-9 wurde bei Rhone-Poulenc Rorer Pharmaceuticals, C31G bei Biosyn, Inc., erworben. Keines der obigen Detergentien verminderte die Foci.

[0066] Die Positivkontrolle (SDS, 1%) beseitigte die Virus-Foci vollständig.

[0067] Alle Detergentien wurden bei einer Endkonzentration von 1% für 10 Minuten bei 37°C mit dem Virus inkubiert.

[0068] Auswirkung der SDS-Inaktivierung auf CRPV im Bezug auf die Bildung von Shope-Papillomen in Kaninchen. Um die Untersuchung der PV-Inaktivierung durch SDS auf ein in vivo-Tiermodellsystem auszudehnen, haben wir das gut etablierte CRPV-Modellsystem verwendet. Es wurde ein Standard-Stammansatz von

CRPV verwendet, von dem bekannt war, dass er mit 100%iger Wirksamkeit Papillome bildet. Die infektiöse Dosis 50 (ID_{50}) für den Virusstammansatz entsprach 50 μ l einer 10^{-3} Verdünnung des Stammvirus. Bei unseren Versuchen haben wir 40 μ l einer 10^{-1} Verdünnung und nachfolgend 40 μ l einer 10^{-2} Verdünnung der Virusstammlösung verwendet. Beide dieser Konzentrationen übertrafen die ID_{50} bei weitem. SDS wurde mit dem Virus bis auf eine Endkonzentration von 0,05% gemischt und anschließend bei 37°C für 10 min inkubiert. Unmittelbar nach der Inkubation wurde das Virus inokuliert, indem die Haut am Rücken der Kaninchen verletzt wurde. Die inokulierten Stellen enthielten zwei unbehandelte (links; L) und zwei behandelte (rechts; R) Virusproben an demselben Kaninchen. [Fig. 1a](#) zeigt den durchschnittlichen GMD von sechs Läsionen, die mit normalem CRPV (10^{-1} Verdünnung) inokuliert wurden, und von sechs Läsionen, die mit SDS-behandeltem CRPV inokuliert wurden. Die GMDs wurden gemessen und an den der Inokulation folgenden Tagen 18, 21, 25, 32, 42 und 50 miteinander verglichen. Die Ergebnisse zeigen, dass eine 10^{-1} Verdünnung des Virusstammansatzes durch eine 10-minütige Behandlung mit 0,05% SDS bei 37°C weitestgehend inaktiviert wird. [Fig. 1b](#) zeigt die Wachstumskurven über 50 Tage nach der Inokulation für jede einzelne Läsion. Es ist anzumerken, dass jede der sechs Stellen, die SDS-behandelte Präparationen (*) erhielten, hinsichtlich der Entwicklung von Papillomen verzögert war, was eine erhebliche Inaktivierung des Virus anzeigt. Wenn sich Papillome entwickelten, schien die Wachstumsgeschwindigkeit der Läsionen jedoch ähnlich derjenigen zu sein, die bei den Papillomen aus den unbehandelten Impfansätzen zu finden war.

[0069] Bei einem nachfolgenden Versuch ([Fig. 2a](#) und [Fig. 2b](#)) wurde eine 10^{-2} -Verdünnung des CRPV-Virusstammansatzes ebenfalls bei 37°C für 10 min entweder mit 0,05% SDS oder mit 0,05% N-9 inkubiert. Diese Verdünnung des Stammvirus enthielt nicht nur weniger Virus, sondern auch eine geringere Konzentration an Gesamtprotein. Nach der Inkubation wurden die Detergens-behandelten und die Kontroll-Virusproben bei fünf Kaninchen für die N-9-Proben und bei fünf Kaninchen für die SDS-behandelten Proben inokuliert. Ebenso wurden bei denselben Kaninchen an anderen Stellen unbehandelte Virusproben inokuliert. Dieser Versuch wurde mit zwei Zielsetzungen durchgeführt: die Inaktivierung einer geringeren Menge an CRPV durch SDS zu beobachten, und die Inaktivierung durch SDS direkt mit derjenigen zu vergleichen, die durch die N-9-Behandlung erzielt wird. Wie bei dem vorherigen Versuch erhielten die linken Inokulationsstellen (zwei pro Tier) unbehandeltes Virus, und die rechten Inokulationsstellen (zwei pro Tier) erhielten behandeltes Virus. [Fig. 2a](#) zeigt den GMD von zehn Inokulationsstellen, die SDS-behandeltes Virus erhielten, im Vergleich zu zehn Inokulationsstellen, die normales Virus erhielten. Die GMDs wurden 3, 4, 5 und 6 Wochen nach der Inokulation mit dem Virus gemessen. Bei Inokulation mit dem SDS-behandelten Virus bildeten sich an 8 von 10 Stellen keine Papillome; die 2 verbleibenden Stellen entwickelten sehr kleine Papillome, die 4 Wochen nach der Inokulation begannen, sichtbar zu werden. Obwohl keine quantitativen Messungen durchgeführt wurden, zeigten die mit SDS geimpften Stellen keinerlei Irritation während des Versuchs. An den 10 mit normalen CRPV inokulierten Stellen entwickelten sich innerhalb von 2 Wochen nach der Inokulation an 10 von 10 Stellen Papillome, die progressives Wachstum zeigten.

[0070] [Fig. 2b](#) zeigt das vergleichende Wachstum von Papillomen an 10 Stellen, die normales CRPV erhielten, im Vergleich zu 10 Stellen, die CRPV erhielten, das mit N-9 behandelt worden war. Der GMD jedes Papilloms wurde 3, 4, 5 und 6 Wochen nach der Virus-Inokulation gemessen. Es gab keinen Unterschied beim Wachstum der Läsionen, die nach der Inokulation mit diesen beiden Viruspopulationen entstanden. Darüber hinaus gab es keinen Unterschied zwischen den Wachstumsgeschwindigkeiten der Kontroll-Papillome und der experimentellen Papillome bei den N-9-Tieren und den Wachstumsgeschwindigkeiten der Kontroll-Läsionen bei den SDS-behandelten Tieren (Daten nicht gezeigt).

[0071] Auswirkung der SDS-Inaktivierung auf die Fähigkeit von HPV 11, experimentelle Condylomata in Fremdtransplantaten aus humanem Vorhautepithel zu induzieren. Standard-Stammansätze von HPV 11 wurden als unverdünntes Virus verwendet. Diese Virusstammansätze induzieren normalerweise Condylomata bei 90-100% der infizierten Fremdtransplantate, wenn sie 1000-fach verdünnt werden. Bei diesem Versuch wurden 39 μ l an unverdünntem HPV 11 Stammansatz mit 1 μ l SDS auf eine Endkonzentration von 0,05% SDS gemischt und dann für 10 min bei 37°C inkubiert. Die Infektion wurde dann für 1 h durchgeführt und die Transplantate nachfolgend in vivo transplantiert. Acht Tiere (16 Nieren) erhielten Transplantate, die mit SDS-behandeltem Virus infiziert waren, und 9 Tiere (17 Nieren) erhielten das normale Virus. Tabelle 5 zeigt die Ergebnisse für die geernteten Transplantate. Bei den normalen Infektionen überlebten 17 von 17 Transplantaten, und von diesen waren 14 bei histologischer Prüfung morphologisch transformiert und besaßen eine typische, papillomatöse Erscheinung. Bei den Tieren, die SDS-behandeltes Virus erhalten hatten, zeigten 13 von 16 Fremdtransplantaten zum Zeitpunkt der Ernte lebensfähiges Gewebe, wobei die histologische Überprüfung der Transplantate normales, lebensfähiges, sich differenzierendes humanes Epithel zeigte. Die letzteren Ergebnisse stehen insofern in Übereinstimmung mit unseren vorherigen Beobachtungen bei der Verwendung nicht infizierter Transplantate, als normale Transplantate gelegentlich in den Mäusen resorbiert werden und daher

keine 3 Monate überleben. Wir schlussfolgerten daraus, dass das SDS durch die Inaktivierung des Virus die Virusinfektion wirksam verhindert hatte.

Tabelle 5

* % SDS bei der Behandlung	% SDS, Endkonzent- ration	gesamte Papillome	überlebende Transplantate/ transplantierte Transplantate
0	0	14	17/17
0,025	0,025	0	13/16

* Es wurden sterile SDS-Stammlösungen mit dem 40fachen der Behandlungskonzentration zu den Virusaliquots hinzu gegeben, um die Behandlungskonzentration zu erreichen.

[0072] Auswirkung der SDS-Exposition auf die Lebensfähigkeit von humanen Vorhaut-Fremdtransplantaten. Wegen der Sorge hinsichtlich des Potentials von SDS, humanes Epithel abzutöten, wurden Kontrollversuche durchgeführt, bei denen zerteilte Lagen von Transplantationsmaterial aus der Vorhaut von Neugeborenen 0,05% SDS alleine ausgesetzt und anschließend transplantiert wurden. Alle Bedingungen in diesem Versuch waren identisch zu denjenigen, die bei den HPV 11-Infektionen mit behandeltem Virus verwendet worden waren, mit der Ausnahme, dass hier kein Virus verwendet wurde. Die dem SDS ausgesetzten Transplantate (2 Tiere bei jedem Mal) wurden geerntet, fixiert und Schnitte hiervon hergestellt, und zwar unmittelbar nach der Exposition, sowie an den Tagen 1, 5, 11 und 20 nach der Behandlung. Die Überprüfung der Gewebe zeigte vollständig lebensfähiges Epithel bei allen Tagen und keine erkennbare, mit der Detergens-Exposition in Beziehung stehende Nekrose. Die ursprünglichen, zerteilten Lagen der Transplantate besaßen eine Größe von etwa 1 mm × 1 mm × 1 mm; zusätzlich wurden sie mehrfach mit der Spitze einer Nadel punktiert, um den Eintritt von HPV 11 und/oder des SDS in die epithelialen Schichten zu erlauben. Obwohl es möglich ist, dass einige epitheliale Zellen bei der SDS-Exposition geschädigt oder abgetötet wurden, war die Schädigung minimal und das epitheliale Wachstum in den Transplantaten normal.

BEISPIEL 2

INAKTIVIERUNG VON ZELLFREIEM UND ZELASSOZIIERTEM HIV-1

[0073] Wie in **Fig. 5** gezeigt, werden Lymphozyten-, Makrophagen-, sowie dual-tropische Stämme von HIV-1 in Gegenwart von N-9, C31G oder SDS inaktiviert. Der zellfreie HIV-1-Stamm IIIB (A) wurde mit N-9, C31G oder SDS behandelt und dann verwendet, um HCLB-Zellen zu infizieren. Die zellfreien HIV-1-Stämme BaL (M-tropisch) (B) und 89.6 (dual-tropisch) (C) wurden mit N-9, C31G oder SDS behandelt und dazu verwendet, P4-R5-Zellen zu infizieren. Es wurden Tests durchgeführt. Die Infektivität nach der Exposition wird ausgedrückt als Prozentanteil im Verhältnis zu der Anzahl β -Gal-positiver Zellen in doppelten Wells, die mit Virus infiziert wurden, das in Abwesenheit einer mikrobiziden Verbindung inkubiert worden war. Die in **Fig. 5** dargestellten Ergebnisse sind die durchschnittlichen Zellzahlen für eine Gesamtheit von vier Wells pro Konzentration in zwei unabhängigen Versuchen.

[0074] Wie in **Fig. 6** dargestellt, können N-9, C31G und SDS die zellassozierte Infektivität von HIV1-infizierten SupT1-Zellen reduzieren. (A) SupT1-T-Lymphozyten (8×10^4), 5 Tage zuvor mit dem HIV-1-Stamm IIIB infiziert, wurden abzentrifugiert und in frischem Medium resuspendiert, um zellfreies Virus zu entfernen. Nach der Exposition gegenüber ausgewählten Konzentrationen jedes Mikrobizids für 10 min bei 37°C wurden die Zellen 1:10 verdünnt und für 2 h gemeinsam mit HCLB-Zellen kultiviert. Nach einem Waschschrift mit PBS zur Entfernung der infizierten Lymphozyten wurden die Indikatorzellen kultiviert und getestet. Die Infektivität nach der Exposition wird ausgedrückt als Prozentanteil im Verhältnis zur Anzahl der β -Gal-positiven Zellen in doppelten Wells, die durch HIV-1-infizierte SupT1-Zellen infiziert wurden, die in Abwesenheit einer mikrobiziden Verbindung inkubiert worden waren. Die in **Fig. 6(a)** gezeigten Ergebnisse sind die durchschnittlichen Zellzah-

len für eine Gesamtheit von vier Wells pro Konzentration in zwei unabhängigen Versuchen. (B) SupT1-T-Lymphozyten (8×10^4) wurden mit ausgewählten Konzentrationen jedes Mikrobizids für 10 min bei 37°C inkubiert und dann mit frischem Medium 1:10 verdünnt. Nach einer Inkubationsphase von 2 h wurden die Zellen auf Lebensfähigkeit getestet. Das Zellüberleben nach der Behandlung wird ausgedrückt als Fraktion lebensfähiger Zellen im Verhältnis zur Anzahl der einer Schein-Exposition unterzogenen Zellen. Die in **Fig. 6(b)** gezeigten Ergebnisse sind der Durchschnitt zweier Versuche, bei denen für jede Konzentration dreifache Wells getestet wurden.

BEISPIEL 3

MIKROBIZIDE AKTIVITÄT VON ALKYL-SULFATDERIVATEN

[0075] Die folgenden Daten zeigen, dass andere Mitglieder der Alkylsulfatgruppe, nämlich Lithiumdodecylsulfat, Laurinsäure und das Natriumsalz der Laurinsäure in dem C127-Focustest unter Verwendung von Rinder-Papillomavirus Wirksamkeit gegen Papillomaviren besitzen. Bei den Dosis-Wirkungs-Kurven bleibt SDS aber am stärksten wirksam.

Tabelle 6

VERGLEICH VON NATRIUM-DODECYLSULFAT UND LITHIUMDODECYLSULFAT IN DEM BPV-1-FOKUSTEST

Behandlung	Anzahl der Foci
Negativkontrolle	0, 0, 0, 0
Positivkontrolle	30, 29, 32, 26
0,1% SDS alleine	0, 0, 0, 0
0,1% LDS alleine	0, 0, 0, 0
0,1% SDS + Virus	0, 0, 0, 0
0,1% LDS + Virus	7, 11, 9, 10

[0076] In allen Fällen erfolgte die Behandlung für 10 min bei 37°C, gefolgt von einer 1:1000-Verdünnung der Viruspräparation.

Tabelle 7

VERGLEICH VON NATRIUM-DODECYLSULFAT MIT LAURINSÄURE BZW. DEM NATRIUM-SALZ DER LAURINSÄURE IN DEM BPV-1-FOKUSTEST

Behandlung	Anzahl der Foci
Negativkontrolle	0, 0, 0
Positivkontrolle	50+, 50+, 36
0,1% SDS + Virus	0, 0, 0
0,1% Laurinsäure + Virus	9, 28
0,1% NA+ Laurinsäure + Virus	0, 0, 0

In allen Fällen erfolgte die Behandlung für 10 min bei 37°C, gefolgt von einer 1:1000-Verdünnung der Viruspräparation.

BEISPIEL 4

SDS-TOXIZITÄT UND ANTI-HSV-2-AKTIVITÄT

[0077] Die folgenden Daten repräsentieren ein in vivo-Experiment, um sowohl die Toxizität von SDS als auch dessen Wirksamkeit bei dem Schutz von Mäusen vor vaginaler Infektion mit lebensfähigem Herpes simplex Virus (HSV-2) zu testen.

GRUPPE 1	Normale Kontrolle
GRUPPE 2	Lebensfähiges HSV-2 (ca. 5×10^6 infektiöse Einheiten)
GRUPPE 3	Lebensfähiges HSV-2 + 4% SDS
GRUPPE 4	Lebensfähiges HSV-2 + 2% SDS
GRUPPE 5	Lebensfähiges HSV-2 + 1% SDS
GRUPPE 6	Lebensfähiges HSV-2 + 0,5% SDS

[0078] Der Versuch verwendete fremdgezüchtete, weibliche Swiss-Webster Mäuse. Die Mäuse wurden betäubt, und dann wurden SDS- oder Kontrolllösungen (25 µl) unter Verwendung einer gelben Pipettenspitze in die Vagina eingeführt. Das SDS wurde nicht in eine Vaginalcreme- oder eine Schaum-Formulierung eingebracht, sondern lediglich in Phosphat-gepufferter Saline gelöst. Diese Lösungen besitzen eine niedrige Viskosität. Die Flüssigkeiten wurden gleichzeitig bei Gruppen von zehn Mäusen eingebracht. Nach der Verabreichung von SDS oder der Kontrolllösungen bei der 10er-Gruppe wurden zusätzliche 25 µl an Virus- oder an Kontroll-Flüssigkeit eingebracht. Man ließ die Mäuse aus der Narkose erwachen und prüfte sie dann täglich auf Symptome, beginnend an Tag 3 und bis Tag 12 nach der Inokulation. Ebenfalls wurden täglich, beginnend an Tag drei, vaginale Abstriche an den Mäusen durchgeführt, um die Ausbreitung des Virus zu bestimmen. Die [Fig. 3a-Fig. 3g](#) zeigen die gesamten Symptome pro Gruppe an den Tagen 3 bis 12 für jedes der folgenden Symptome: Schwellung, vaginales Exsudat, Rötung, Tod, Beinlähmung, perianaler Haarverlust und jedwedes Symptom.

[0079] Die Ergebnisse zeigen klar, dass alle Konzentrationen von SDS einen signifikanten Schutz vor einer HSV-2-Infektion der Vagina bieten. Zusätzlich war eine Dosis-Wirkungs-Abhängigkeit für jedes getestete Symptom erkennbar, wobei 4%iges SDS den größten Schutz verlieh. Die Ergebnisse der Bestimmung der Virusausbreitung sind nicht dargestellt, bestätigen und untermauern jedoch diese Daten.

BEISPIEL 5

SPERMIZIDE AKTIVITÄT

[0080] Die folgenden Daten repräsentieren ein in vitro-Experiment, um die Wirksamkeit von SDS und anderen Detergentien als spermizide Mittel zu testen. Es wurden gefrorene Proben von Bullensperma bezogen, aufgetaut und in ein Teströhrchen eingebracht. Es wurden Aliquots abgenommen und in ein separates Teströhrchen gebracht, wo sie mit Detergens (SDS, C31G, N-9 oder einem Gemisch von SDS und N-9) auf eine prozentuale Endkonzentration gemäß der Auflistung in den Tabellen 8 und 9 unten gemischt wurden. Nach dem Mischen wurden die Proben unverzüglich auf einen mikroskopischen Objektträger aufgetragen und visuell auf Spermienbewegung hin überprüft. Der Versuch wurde mit einer Probe pro Zeiteinheit durchgeführt, sodass die visuelle Überprüfung unmittelbar nach der Zugabe des Detergens zu der Probe erfolgte. Dementsprechend zeigen die Tabellenangaben vollständiger Inaktivierung eine praktisch unmittelbare Inaktivierung der Spermien an. Die „verzögerte Inaktivierung“ bezeichnet eine Verzögerung von etwa 10 Minuten für diejenigen Spermien, die nicht sofort mit dem Schwimmen aufhörten. „Gelegentliche Schwimmer“ bezeichnen sehr wenige Spermien im Größenbereich von etwa 1% der in der Probe vorliegenden Spermienpopulation, was anzeigt, dass etwa 99% der Spermien durch das Detergens inaktiviert wurden.

Tabelle 8

Motilität von Rinderspermien nach Detergenzugabe

	N-9*	C31G**	SDS***	N-9/SDS
2%	-	-	-	
1%	-	-	-	
0,5%	-	-	-	
0,025%	-	-	-	
0,0125%	+++	+/-	+/- (verzögert)	+/- (verzögert)

* keine Koagulation

** deutliche Koagulation

*** moderate Koagulation

[0081] Wenn Koagulation auftrat, so nahm deren Ausmaß bei abnehmenden Konzentrationen ab.

Schlüssel:

+++ heftiges Schwimmen
 ++/- viele Schwimmer/einige tot
 +/- gelegentliche Schwimmer/die meisten tot
 - alle tot

Tabelle 9

Motilität von Rinderspermien nach Detergenzugabe

	N-9	C31G	SDS	SDS/ N-9	SDS/ C31G	N-9/ C31G
2%	-	-	+/-	+/-	+/-	+/-
1%	++/-	+/-	++/-	++/-	++/-	++/-
0,5%	+++	+++	++/-	+++	+++	
0,25%	+++	+++	++/-	+++	+++	
0,125%	+++	+++	++/-	+++	+++	

Schlüssel:

- +++ heftiges Schwimmen
- ++/- viele Schwimmer/einige tot
- +/- gelegentliche Schwimmer/die meisten tot
- alle tot

Patentansprüche

1. Verwendung einer Verbindung, die aus der Gruppe, bestehend aus Natriumdodecylsulfat, Lithiumdodecylsulfat, Laurinsäure und Salzen davon, ausgewählt ist, bei der Herstellung eines Medikaments zur Inaktivierung eines nicht umhüllten Virus.
2. Verwendung nach Anspruch 1, wobei das Virus Human-Papillomavirus ist.
3. Verwendung nach Anspruch 1, wobei die Verbindung Natriumdodecylsulfat ist.
4. Verwendung nach Anspruch 1, wobei die Menge im Bereich von 0,05 bis 2,0 Gew.-% der Zusammensetzung liegt.
5. Verwendung einer Zusammensetzung, die eine ausreichende Menge einer Verbindung, die aus der Gruppe, bestehend aus Natriumdodecylsulfat, Lithiumdodecylsulfat, Laurinsäure und Salzen davon, ausgewählt ist, umfasst, bei der Herstellung eines Medikaments zur Erzielung einer spermiziden Wirkung und einer viruziden Wirkung gegen ein nicht umhülltes Virus, wenn das Medikament mit einer vaginalen Epithelstelle in Kontakt kommt.
6. Verwendung nach Anspruch 5, wobei das Medikament den Titer des nicht umhüllten Virus um etwa 99,9% verringert.
7. Verwendung nach Anspruch 5, wobei das nicht umhüllte Virus aus der Gruppe, bestehend aus Human-Immundefizienzviren, Herpes-simplex-Viren und Papillomaviren, ausgewählt ist.
8. Verwendung nach Anspruch 5, wobei die Verbindung in der Zusammensetzung im Bereich von 0,05 bis 2,0 Gew.-% der Zusammensetzung vorliegt.
9. Säuglingsflasche, umfassend einen Behälter, der einen Körperteil zur Aufnahme von Brustmilch und einen Verschluss teil hat; ein Saugerelement, das sich vom Behälter aus erstreckt und zum Einführen in den Mund eines Menschen oder eines anderen Säugers angepasst ist; und eine viruzide Zusammensetzung, die eine Verbindung, welche aus der Gruppe, bestehend aus Natriumdodecylsulfat, Lithiumdodecylsulfat, Laurinsäure und Salzen davon, ausgewählt ist, umfasst, wobei die Zusammensetzung in ausreichender Menge vorliegt, um den Titer von nicht umhüllten Viren im Kontakt mit der Verbindung

um mindestens etwa 99,9% zu reduzieren, wobei die mikrobizide Zusammensetzung so in der Säuglingsflasche angeordnet ist, dass sie mit der Milch in Kontakt kommt.

10. Säuglingsflasche nach Anspruch 9, wobei die Zusammensetzung an der Innenwand der Flasche befestigt ist.

11. Säuglingsflasche nach Anspruch 9, die außerdem einen Filter umfasst und wobei die Zusammensetzung an dem Filter befestigt ist.

12. Säuglingsflasche nach Anspruch 9, die außerdem ein Material umfasst, das fähig ist, die Verbindung aus der Milch zu entfernen.

13. Behälter zum Halten oder Transportieren einer biologischen Flüssigkeit, umfassend eine feste Wand, die eine Innenfläche zum Zurückhalten einer biologischen Flüssigkeit hat, wobei die Innenfläche eine daran gebundene mikrobizide Zusammensetzung aufweist, die mit der biologischen Flüssigkeit in Kontakt kommen soll und die eine Verbindung umfasst, die aus der Gruppe, bestehend aus Natriumdodecylsulfat, Lithiumdodecylsulfat, Laurinsäure und Salzen davon, ausgewählt ist, wobei die Zusammensetzung in einer ausreichenden Menge vorliegt, um den Titer eines nicht umhüllten Virus in der Flüssigkeit um mindestens etwa 99,9% zu reduzieren.

14. Behälter nach Anspruch 13, wobei die mikrobizide Zusammensetzung kovalent an die Innenfläche gebunden ist.

15. Behälter nach Anspruch 13, wobei die Innenfläche mit der mikrobiziden Zusammensetzung imprägniert ist.

16. Behälter nach Anspruch 13, wobei die Innenfläche mit der mikrobiziden Zusammensetzung beschichtet ist.

17. Behälter nach Anspruch 13, wobei die biologische Flüssigkeit ein Material umfasst, das aus der Gruppe, bestehend aus Blut, Milch, Serum und Lymphe, ausgewählt ist.

18. Behälter nach Anspruch 13, wobei der Behälter aus der Gruppe, bestehend aus einer Säuglingsflasche und einer Manschette für eine Babyflasche, ausgewählt ist.

19. Behälter nach Anspruch 13, wobei der Behälter ein Katheterschlauch ist.

20. Filter zur Reduzierung des Titers eines nicht umhüllten Virus in einer biologischen Flüssigkeit, umfassend ein Substrat, das eine mikrobizide Zusammensetzung darauf fixiert aufweist, wobei die Zusammensetzung eine Verbindung umfasst, die aus der Gruppe, bestehend aus Natriumdodecylsulfat, Lithiumdodecylsulfat, Laurinsäure und Salzen davon, ausgewählt ist, wobei die Zusammensetzung in ausreichender Menge vorhanden ist, um den Titer eines nicht umhüllten Virus in der Flüssigkeit um mindestens etwa 99,9% zu reduzieren.

21. Filter nach Anspruch 20, wobei das Substrat ein Matrixmaterial umfasst.

22. Filter nach Anspruch 20, wobei das Matrixmaterial aus der Gruppe, bestehend aus Gelen und Perlen, ausgewählt ist.

23. Filter nach Anspruch 20, wobei das Substrat außerdem ein Material umfasst, das fähig ist, die Verbindung aus der biologischen Flüssigkeit zu entfernen.

24. Filter nach Anspruch 20, wobei die biologische Flüssigkeit ein Material umfasst, das aus der Gruppe, bestehend aus Blut, Milch, Serum und Lymphe, ausgewählt ist.

25. Filter nach Anspruch 20, wobei das nicht umhüllte Virus Human-Immundefizienzvirus ist.

Es folgen 14 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

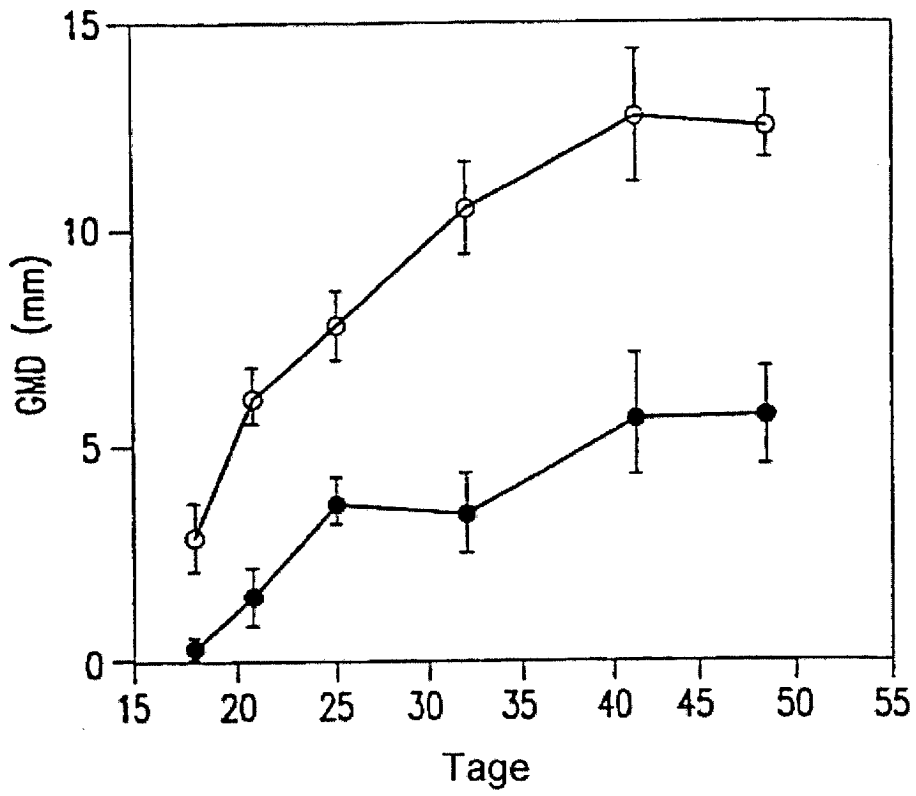


FIG.1a

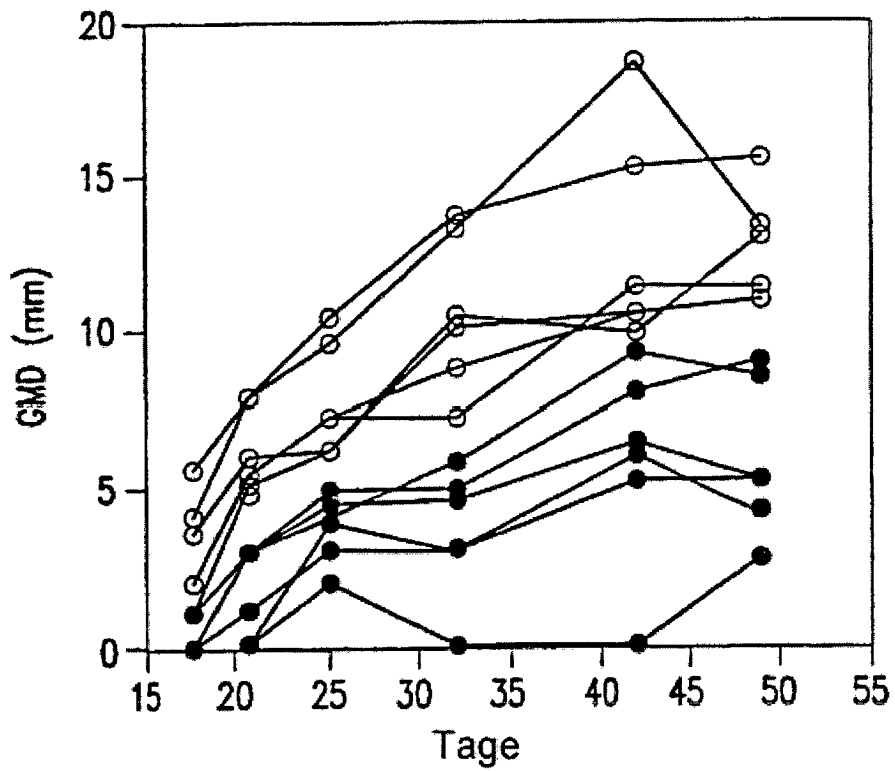


FIG.1b

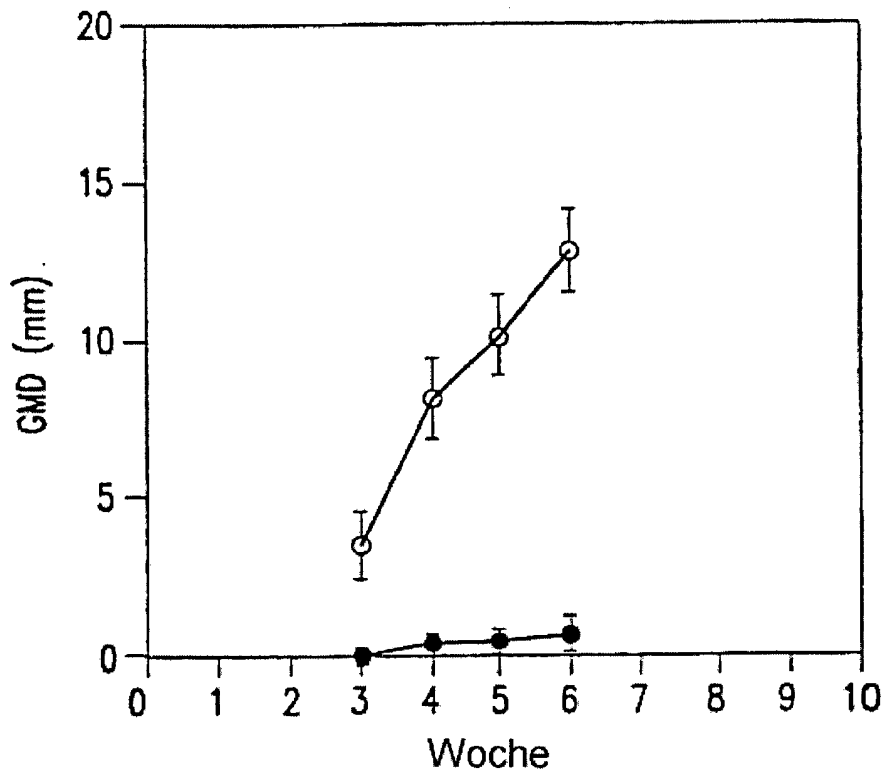


FIG.2a

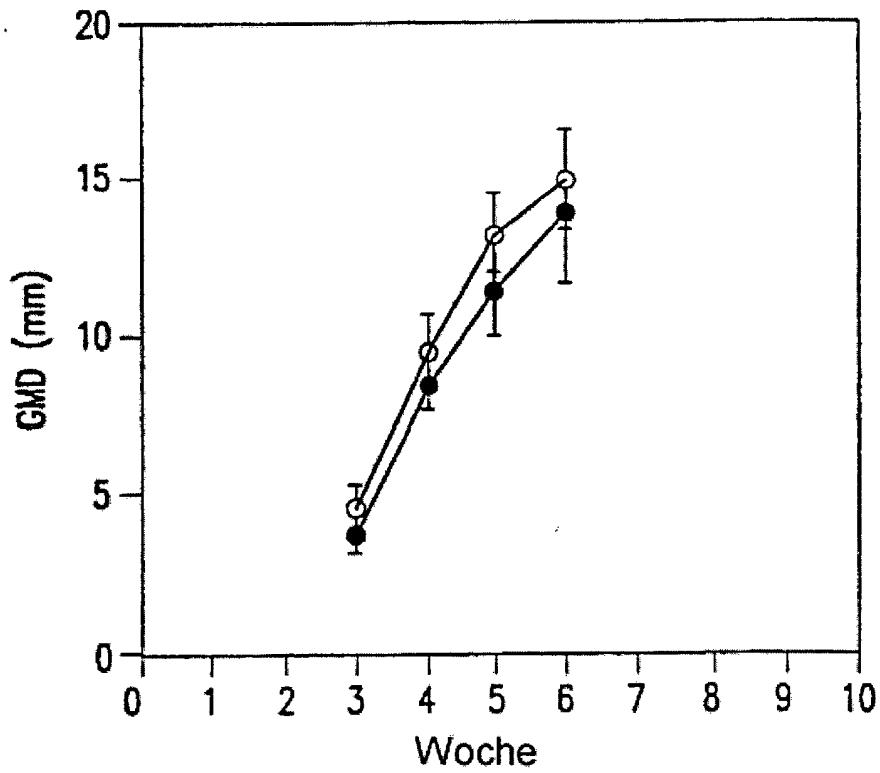


FIG.2b

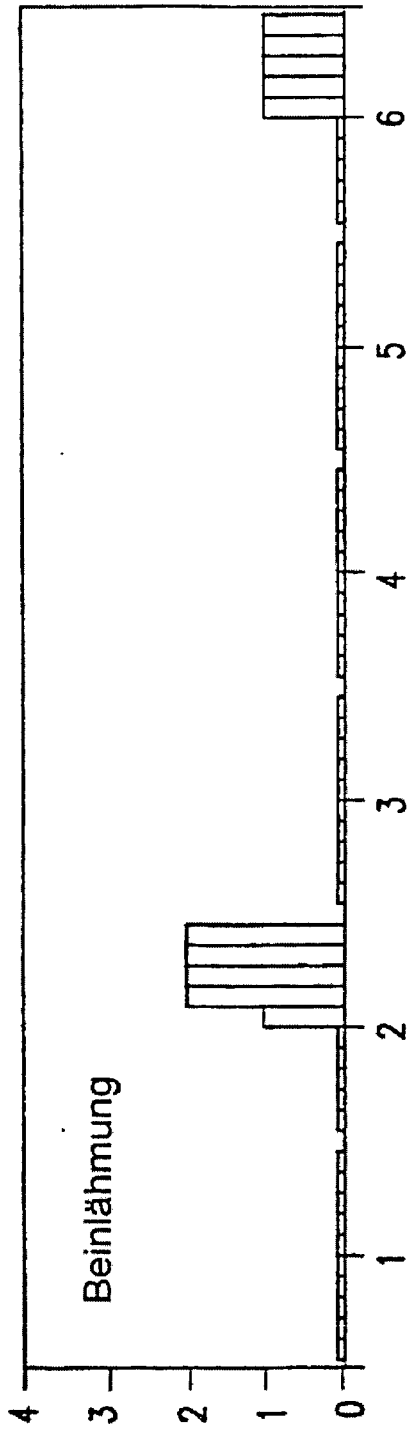


FIG.3a

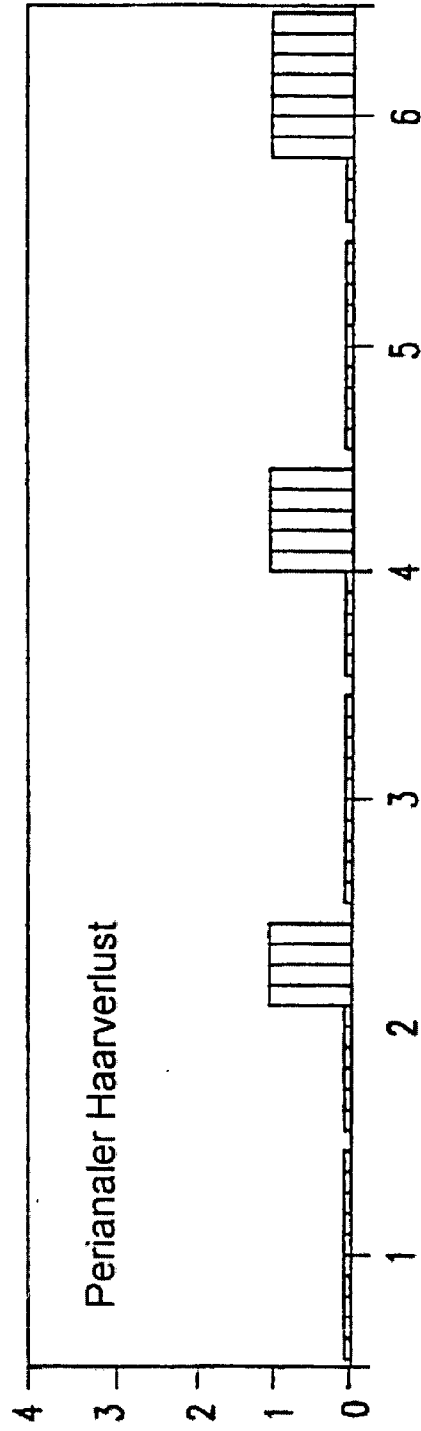


FIG.3b

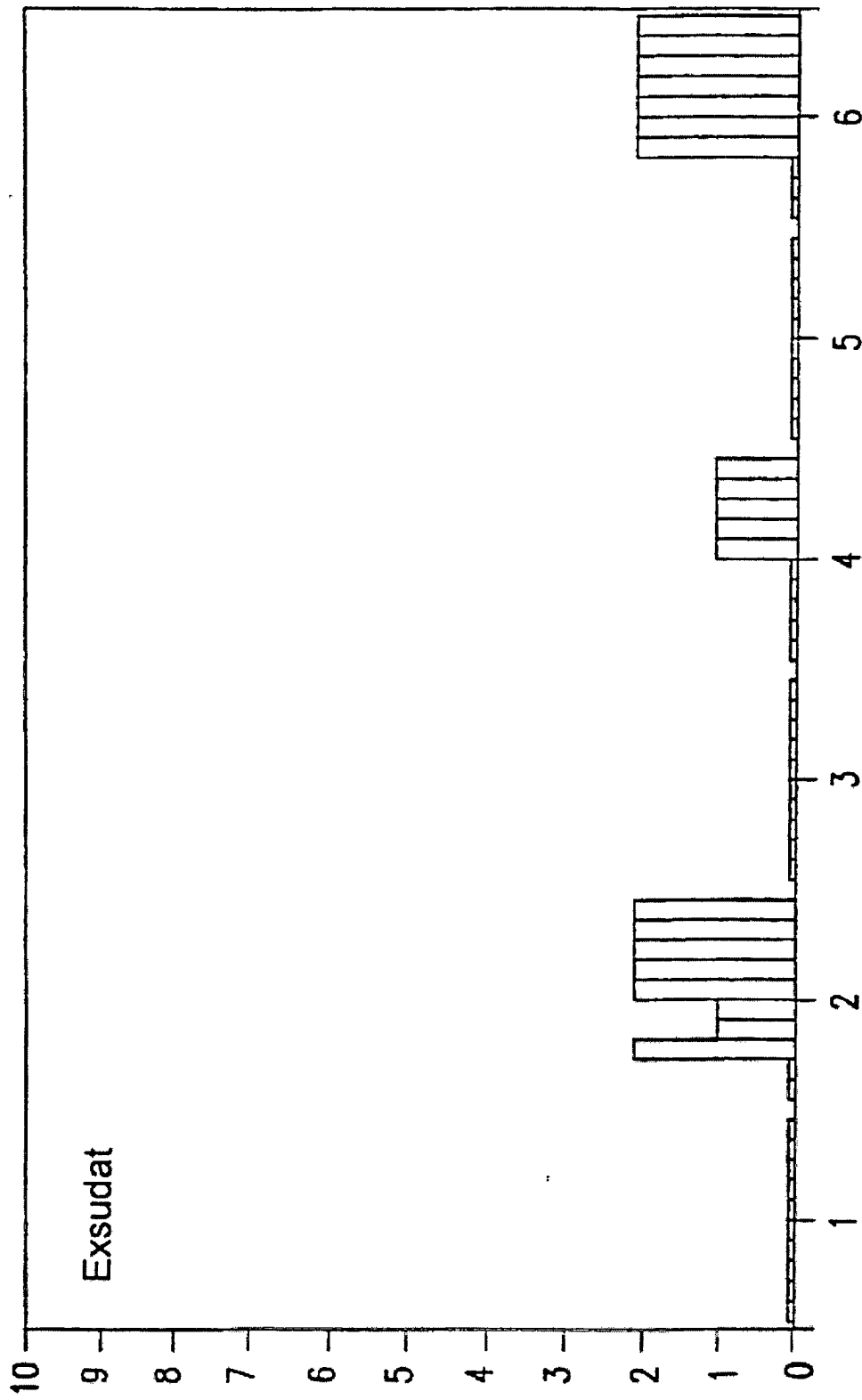


FIG.3C

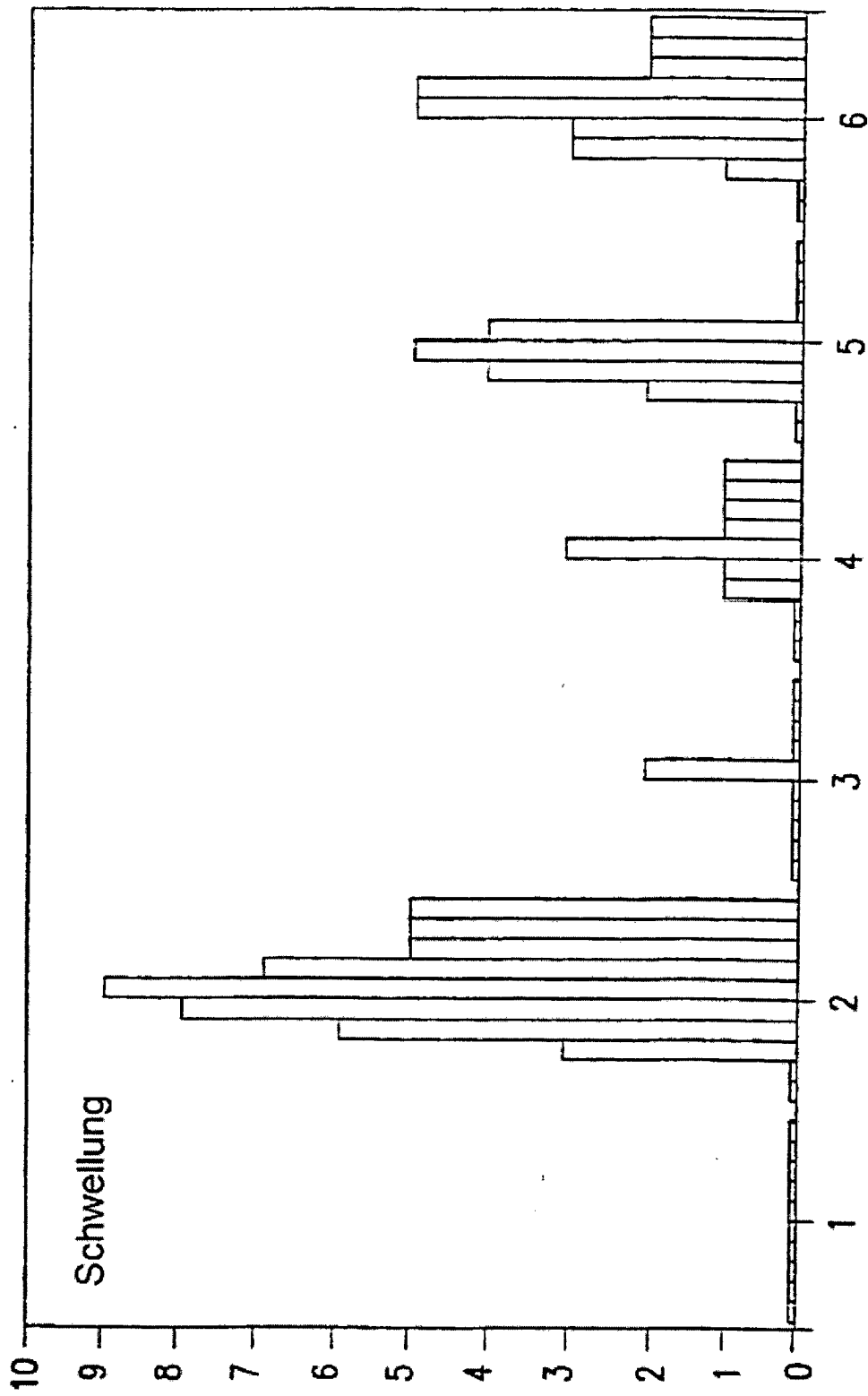


FIG.3d

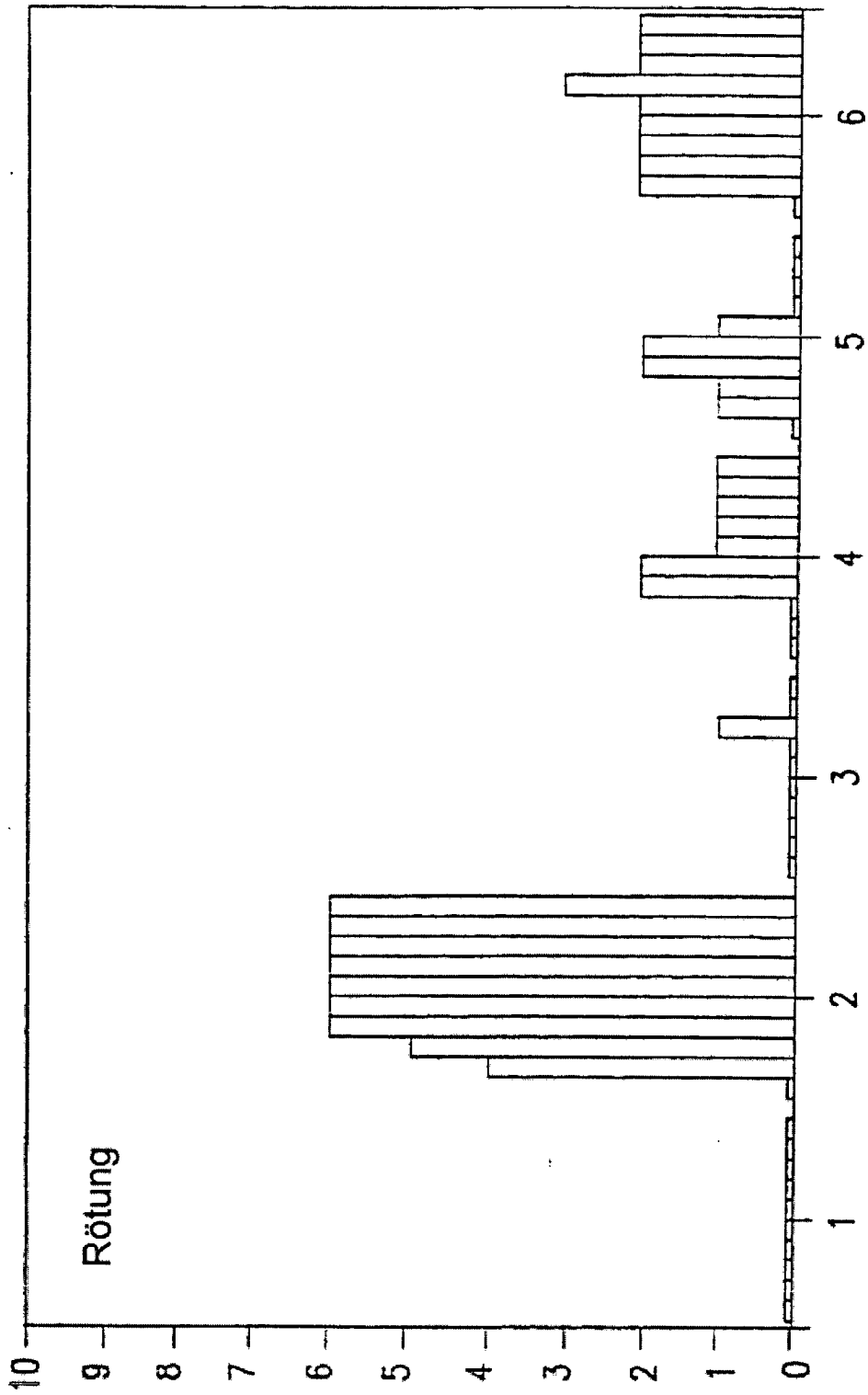


FIG.3e

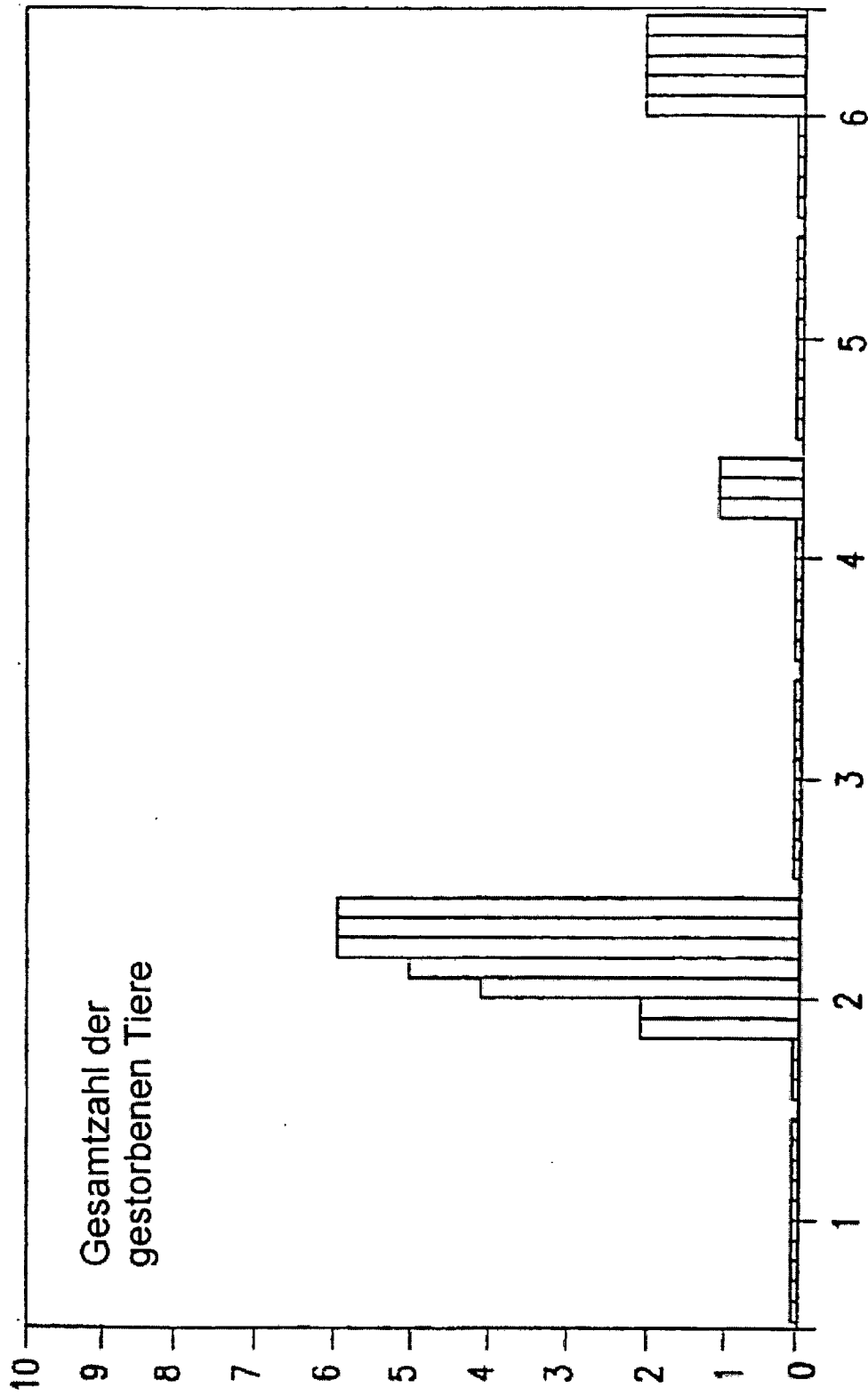


FIG.3f

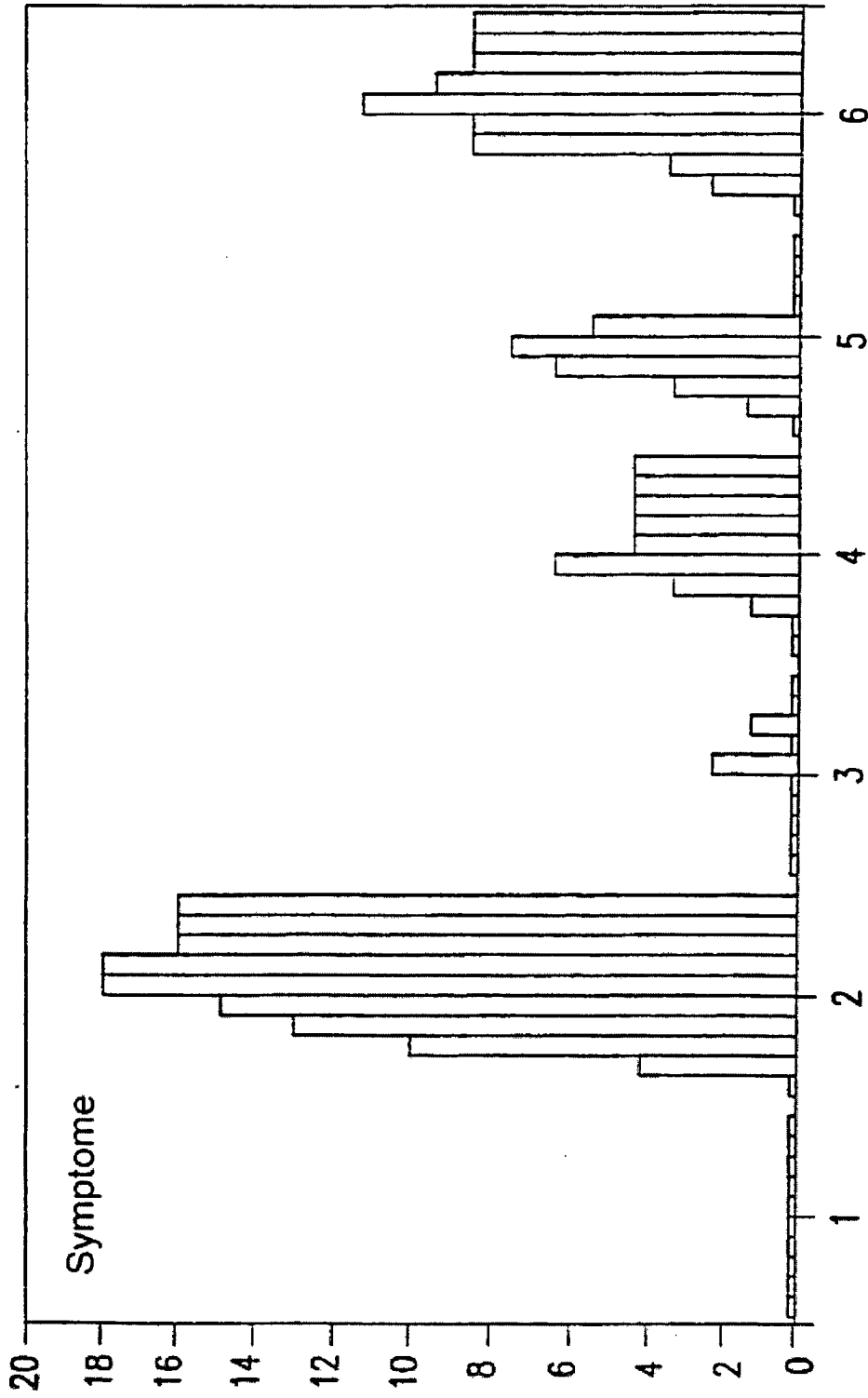
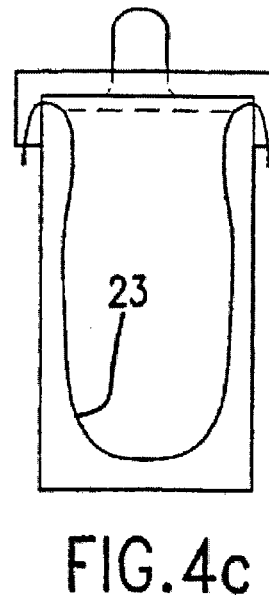
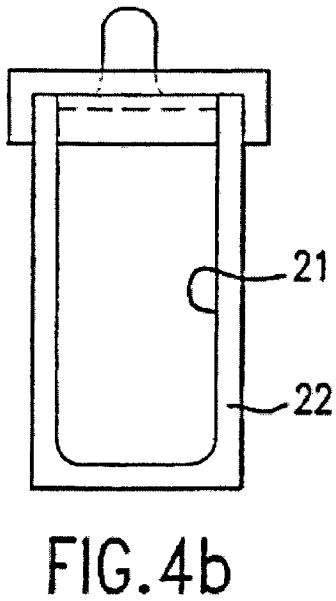
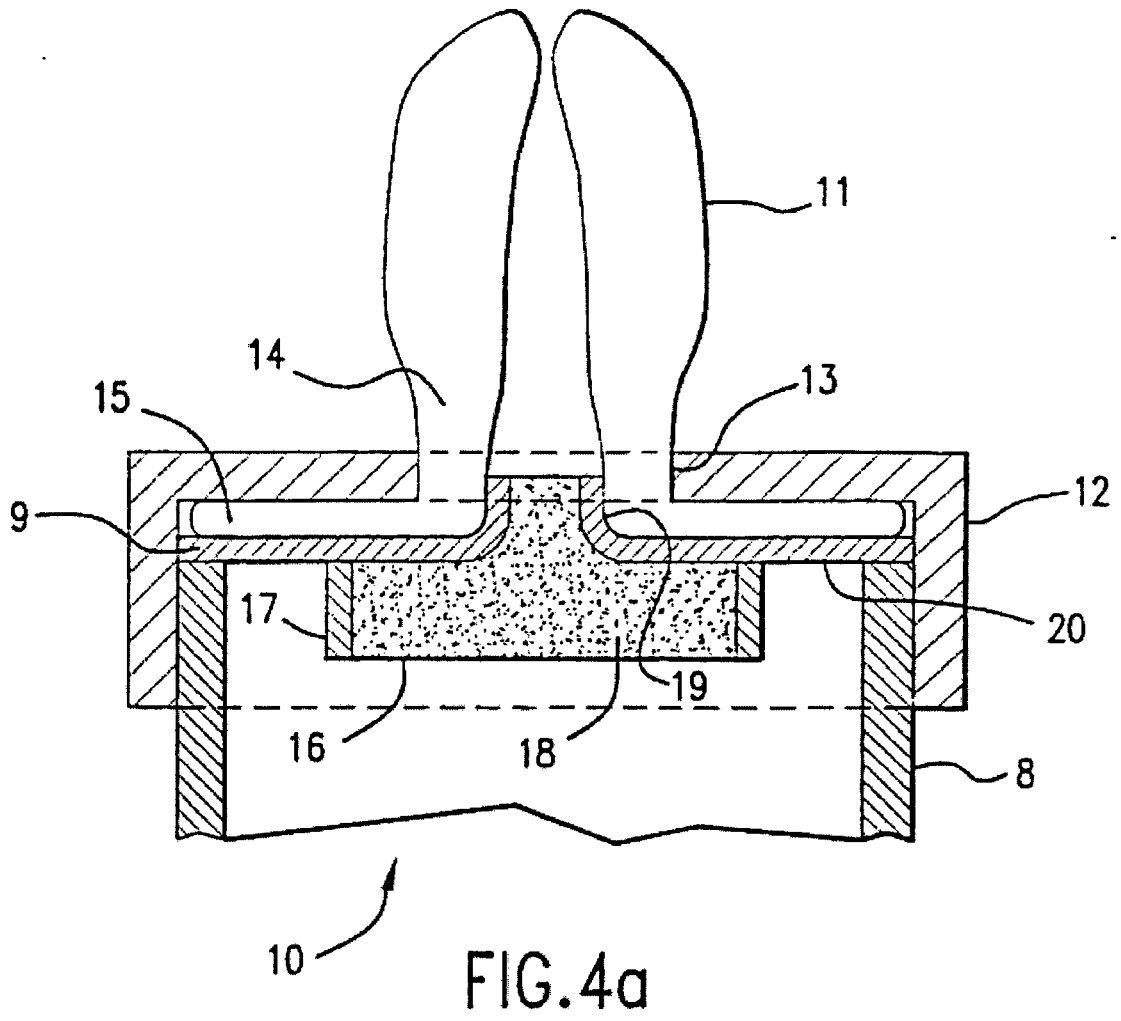


FIG.3g



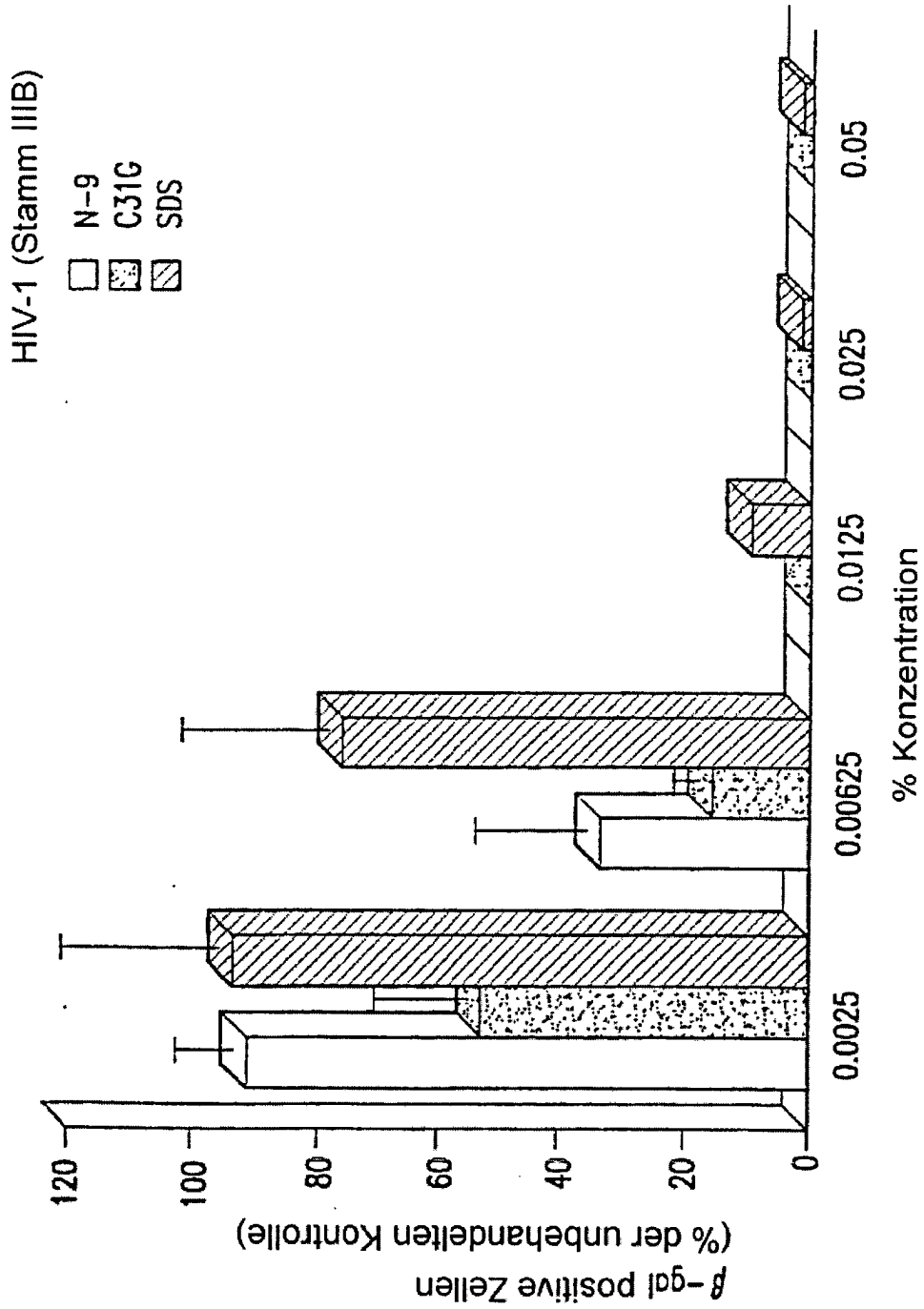


FIG.5a

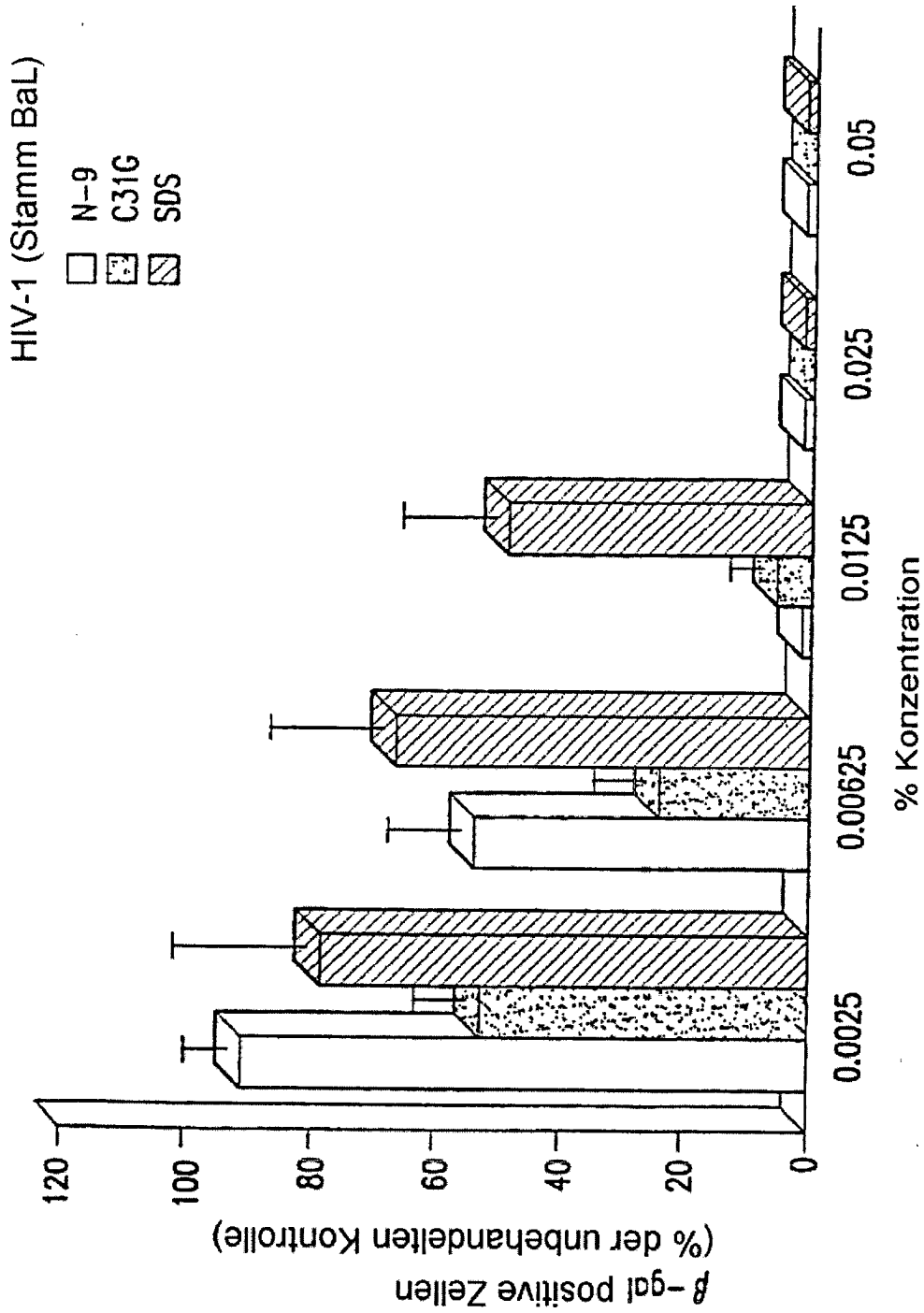


FIG.5b

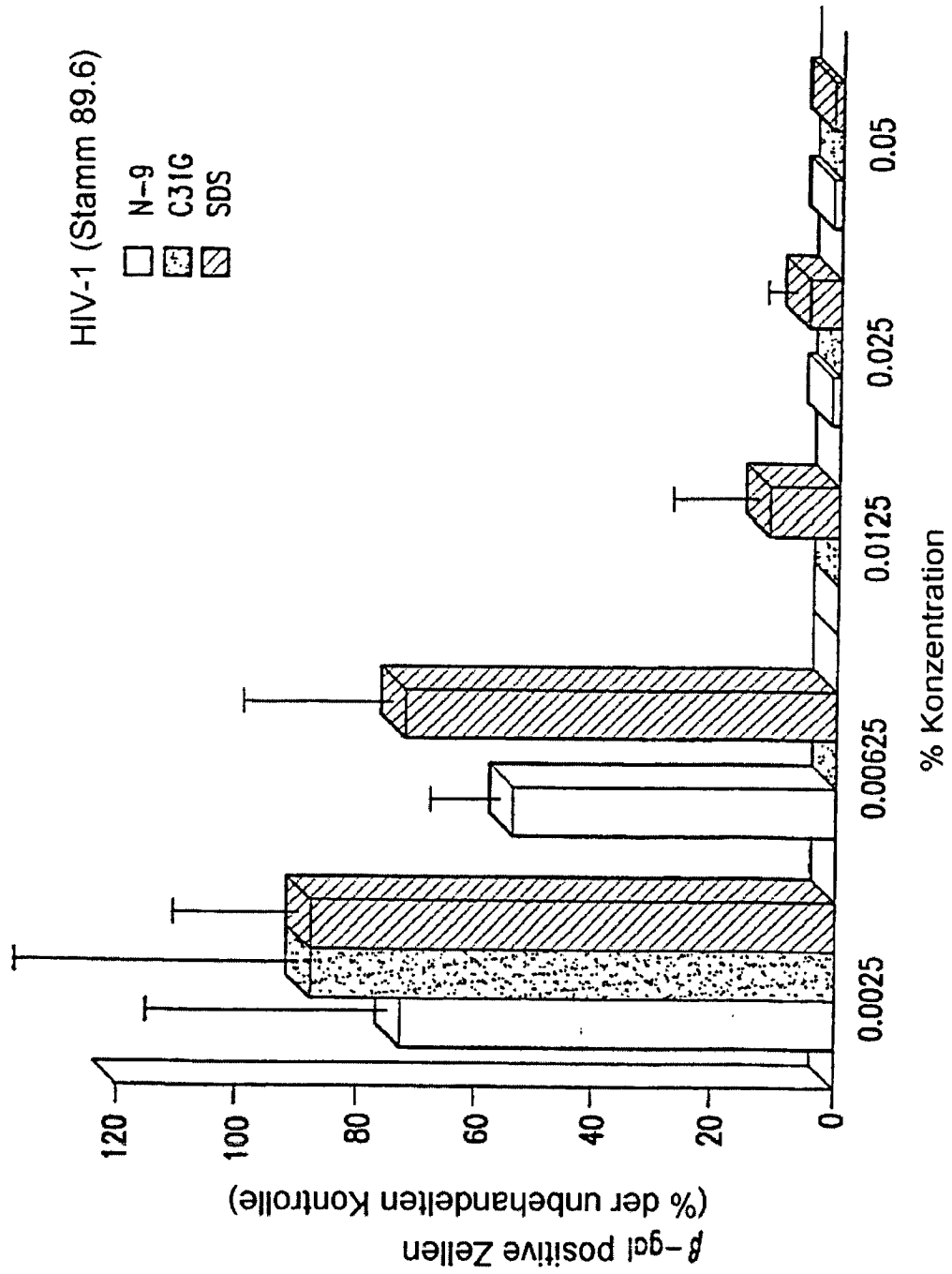


FIG.5c

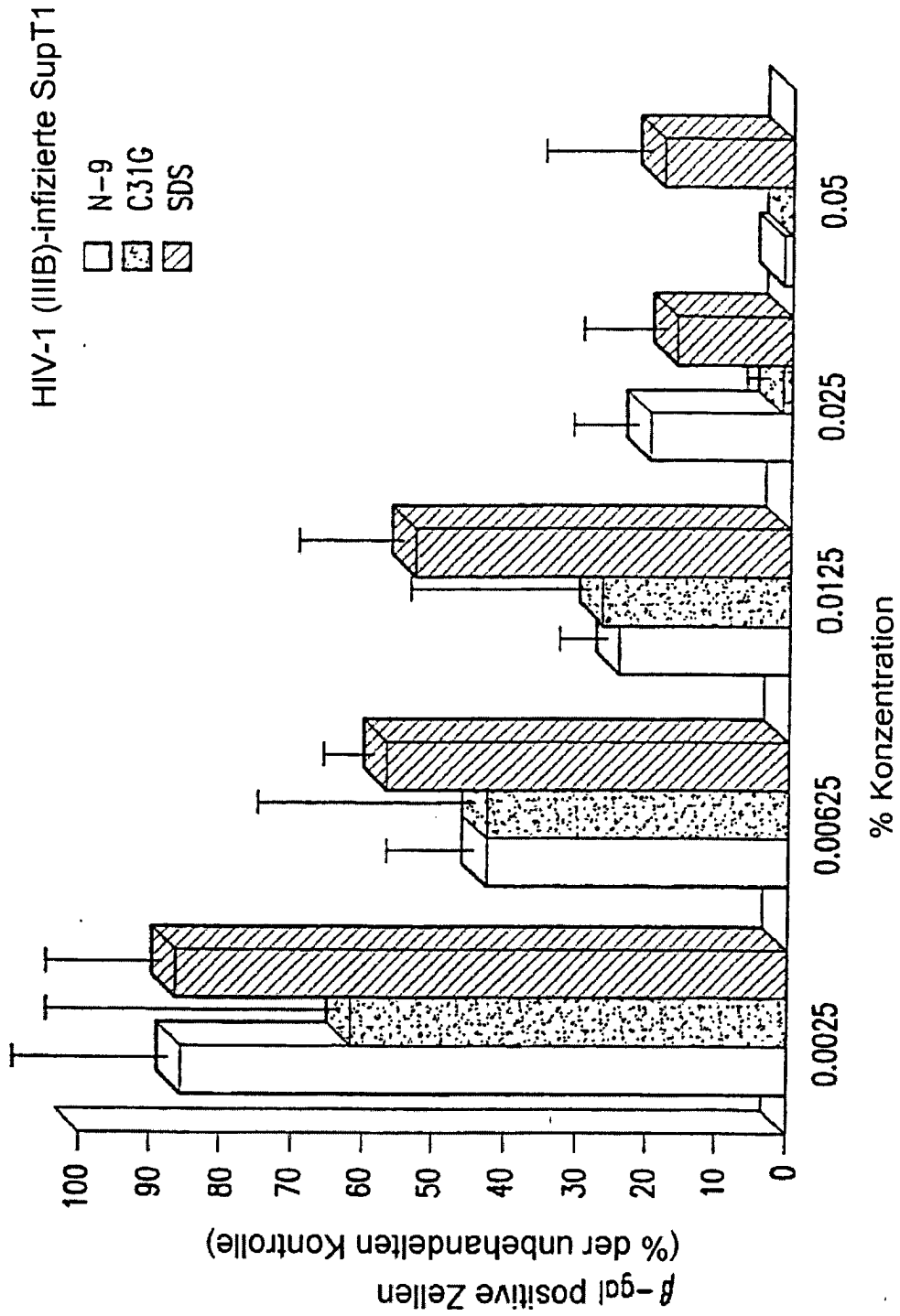


FIG. 6a

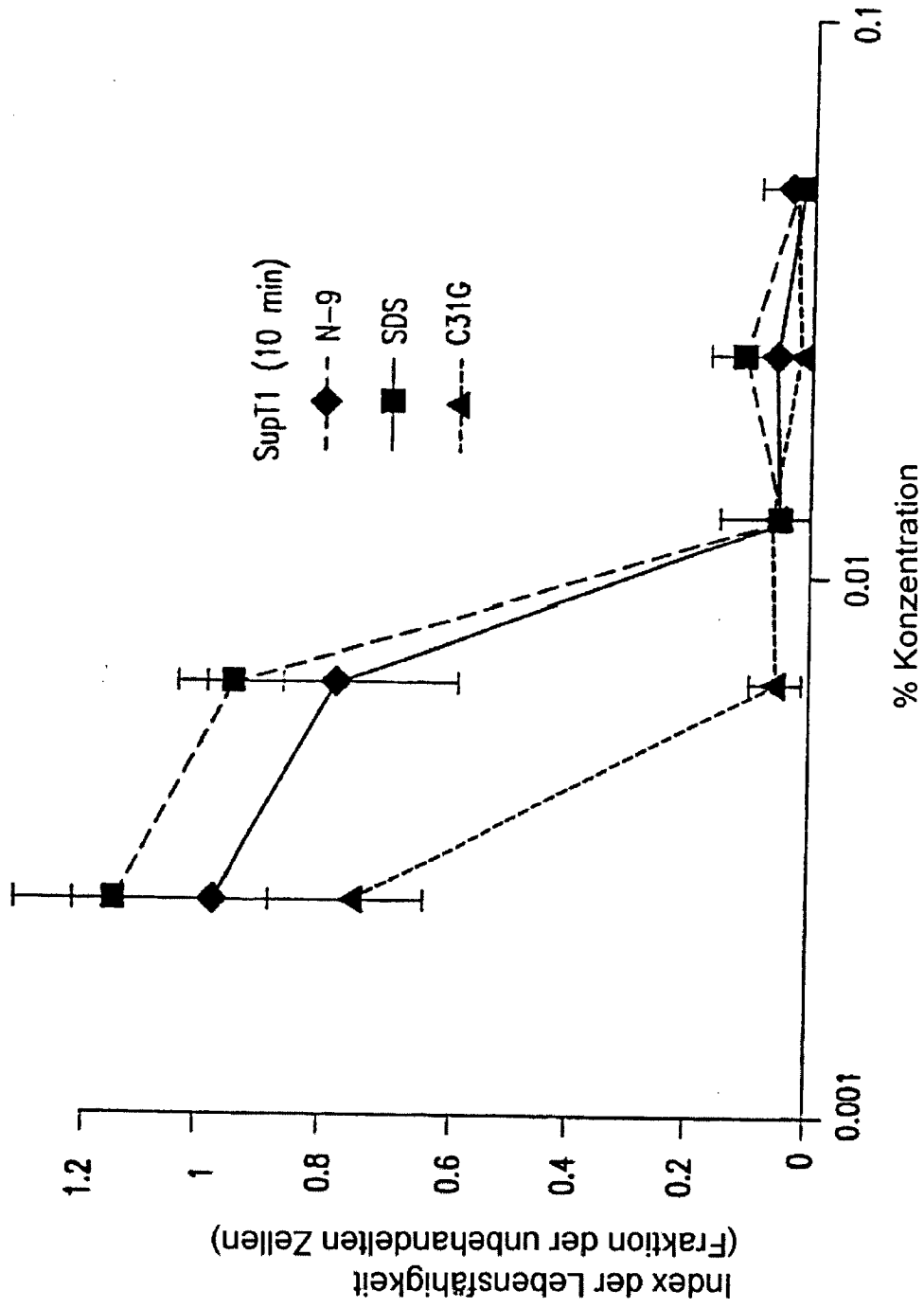


FIG.6b