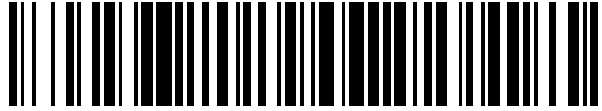


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 550 815**

51 Int. Cl.:

A61K 31/715 (2006.01)
A61K 31/731 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)
A61K 9/08 (2006.01)
A61K 47/36 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.10.2010 E 10762850 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.07.2015 EP 2485710**

54 Título: **Composiciones antimicrobianas acuosas que contienen carragenanos**

30 Prioridad:

06.10.2009 US 587405

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

12.11.2015

73 Titular/es:

**THE POPULATION COUNCIL, INC. (100.0%)
One Dag Hammarskjold Plaza
New York, NY 10017, US**

72 Inventor/es:

**MAGUIRE, ROBIN A.;
THORN, MITCHELL;
PHILLIPS, DAVID M. y
RUTENBERG, NAOMI**

74 Agente/Representante:

MIR PLAJA, Mireia

ES 2 550 815 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composiciones antimicrobianas acuosas que contienen carragenanos

5 **[0001]** Los carragenanos son polisacáridos obtenidos a partir de las algas rojas, comúnmente conocidas como algas marinas. Son un componente estructural de las algas marinas y se extraen en forma de tres tipos principales, concretamente iota, kappa y lambda, aunque también hay otros tipos, entre los que se incluyen los carragenanos kappa-II, mu y nu. Los carragenanos se han usado extensamente en las industrias alimenticia, farmacéutica y cosmética como espesantes, agentes gelificantes, y agentes estabilizantes y dispersantes. Se han llevado a cabo estudios farmacológicos y toxicológicos exhaustivos. Se ha observado que el carragenano es atóxico por las vías de administración oral, dérmica y por inhalación incluso con dosis extremadamente altas. Por ello, los carragenanos se clasificaron como "generalmente reconocidos como seguros" (GRAS) por parte de la FDA en 1972². Además estudios farmacocinéticos orales exhaustivos llevados a cabo sobre cerdos, ratas, ratones, jerbos, cobayas, hurones, hámsteres, perros y monos³⁻¹¹ revelaron que la descomposición de los carragenanos en el tracto gastrointestinal resultaba, en el mejor de los casos, mínima y que la absorción era virtualmente inexistente.

10 **[0002]** La Publicación de Patente Internacional WO 94/15624 da a conocer el uso de polisacáridos sulfatados, tales como el carragenano iota, el sulfato de dextrano, el carragenano kappa, el carragenano lambda, miméticos de heparina, el sulfato de heparina, el polisulfato de pentosano, el sulfato de condroitina, el sulfato de lentinano, el sulfato de curdlano, la heparina des-N-sulfatada y el fucoicidano, para inhibir la transmisión célula-a-célula del VIH y por tanto la transmisión sexual del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), así como del organismo *Chlamydia*. Esta publicación revela que el carragenano iota es el más eficaz de los carragenanos sulfatados comercialmente disponibles en la prevención de la infección por VIH y en el bloqueo de la infección por *Chlamydia in vitro e in vivo*.

25 **[0001]** Los documentos US2005261240, US2005171053 y CA2384474 dan a conocer composiciones que comprenden carragenano y agentes antimicrobianos.

Resumen de la invención

30 **[0004]** Los solicitantes han descubierto que un determinado carragenano o mezclas o combinaciones de varios carragenanos poseen propiedades físicas y químicas específicas y que cuando se formulan para administración vaginal, proporcionan un efecto antimicrobiano prolongado e inhiben o reducen la posibilidad de transmisión de una infección de transmisión sexual (STI).

35 **[0005]** Por consiguiente, un primer aspecto de la presente invención se refiere a una composición antimicrobiana acuosa, que comprende una cantidad eficaz de un agente antimicrobiano que comprende carragenanos (a los que se hace referencia en la presente como "los carragenanos" o una "mezcla de carragenanos") los cuales son carragenano lambda en una cantidad de por lo menos aproximadamente el 50% en peso seco de dichos carragenanos, siendo el resto de dichos carragenanos por lo menos un carragenano no lambda, y un agente fisiológicamente aceptable controlador del pH. A efectos de la presente invención, el término "antimicrobiano" está destinado a abarcar actividad anti-bacteriana y/o antivírica.

40 **[0006]** Un aspecto relacionado de la presente invención se refiere a una composición inhibidora de infecciones de transmisión sexual (STI), que comprende una cantidad eficaz de un agente antimicrobiano que comprende carragenanos los cuales son carragenano lambda en una cantidad de por lo menos aproximadamente el 50% en peso seco de dichos carragenanos, siendo el resto de dichos carragenanos por lo menos un carragenano no lambda, y un agente fisiológicamente aceptable controlador del pH según la reivindicación 1.

45 **[0007]** Un aspecto de la presente invención se refiere a una composición antimicrobiana acuosa que comprende una cantidad eficaz de un agente antimicrobiano que comprende un microbicida polianiónico, tal como carragenanos los cuales son carragenanos lambda en una cantidad de por lo menos aproximadamente el 50% en peso seco de los carragenanos, siendo el resto de los carragenanos por lo menos un carragenano no lambda, una sal metálica catiónica hidrosoluble fisiológicamente aceptable, y un inhibidor de la transcriptasa inversa no nucleósido o un inhibidor de la transcriptasa inversa nucleósido.

50 **[0008]** Otro aspecto de la presente invención se refiere a un método de procesado, refinamiento o estabilización de los carragenanos de la presente invención. El método conlleva mezclar un carragenano lambda o los carragenanos en forma anhidra o en polvo con la forma seca del agente controlador del pH, sucediéndose una hidratación de los carragenanos, por ejemplo mediante la adición de agua u otra solución acuosa. El método supera varias desventajas asociadas a técnicas actuales para procesar concentraciones elevadas de carragenanos en soluciones acuosas homogéneas y facilita su posterior procesado en formulaciones farmacéuticas tales como las composiciones y complejos antes mencionados.

Descripción de los dibujos

[0009]

- 5 La fig. 1 es una gráfica que muestra la actividad a largo plazo de una composición que contiene los carragenanos de la presente invención. Se expusieron ratones a una dosis infectiva 95-100% de HSV-2 a varios intervalos de tiempo después de la aplicación de la composición. La composición mantiene cierto nivel de actividad contra el HSV-2 incluso después de 24 horas. Esto sugiere que una mujer podría quedar protegida incluso si transcurriera un tiempo considerable entre el uso de la composición y el coito.
- 10 La fig. 2 es una gráfica de la hibridación Southern Blot de productos de RT PCR a partir de ARN extraído de los bazos. Las calles 2 y 3 son controles positivos. Las calles 4 a 8 son de ratones que se trataron previamente con una composición que contenía los carragenanos de la presente invención, 5 minutos antes de la exposición vírica. Las calles 9 a 14 son de ratones inoculados por vía vaginal con VIH.
- 15 La fig. 3 es una gráfica de barras que muestra la concentración de p24 (VIH) con respecto a la concentración de una composición que contiene los carragenanos de la presente invención, otra composición de la presente invención que contiene un complejo de los carragenanos y una sal de cinc hidrosoluble ("cinc-carragenano"), y ácido lignosulfónico (LSA).
- 20 La fig. 4 es una gráfica que muestra una comparación entre una composición de la presente invención que contiene los carragenanos y LSA, y una composición de la presente invención que contiene los carragenanos, en el sistema de Ratones/HSV-2. Los resultados muestran que la composición que contiene LSA y los carragenanos es más eficaz que una composición que contiene solamente los carragenanos.
- 25 La fig. 5 es una representación del porcentaje de inhibición, por LSA, de replicación vírica según se mide por ELISA p24.
- 30 La fig. 6 es una gráfica de la eficacia de una composición que contiene los carragenanos de la presente invención, y otra composición de la presente invención que contiene cinc-carragenano, en la prevención de la formación de placas de HSV-2 en células Vero en función de la dosis.
- 35 La fig. 7 es una gráfica que muestra la eficacia de una composición que contiene los carragenanos de la presente invención, y otra composición de la presente invención que contiene cinc-carragenano, en la protección de ratones contra infección por HSV-2, tras exposición vaginal.
- 40 La fig. 8 es una gráfica que muestra la comparación de la actividad de largo plazo de una composición de la presente invención que contiene cinc-carragenano en comparación con dos productos conocidos, Conceptrol y Advantage S, con una dosis de exposición vírica de 10^4 ó una dosis de infección 100% de HSV-2.
- 45 La fig. 9 es una gráfica que muestra la protección contra exposición vírica por medio de una composición que contiene los carragenanos de la presente invención, y otra composición de la presente invención que contiene cinc-carragenano.
- 50 La fig. 10 es una gráfica de la cantidad de Nestorona liberada de una composición que contiene los carragenanos de la presente invención.
- La fig. 11 es una gráfica de barras que compara la eficacia de varias diluciones de composiciones de carragenanos de la presente invención en la protección de ratones contra infección por HSV-2. Los resultados muestran que incluso cuando los carragenanos se diluyen a 1:200, seguían teniendo la capacidad de proporcionar un 40% de protección contra la infección.

Descripción detallada de la invención

- 55 **[0010]** Los microbicidas polianiónicos utilizados en las composiciones de la presente invención son microbicidas que interfieren con la unión vírica para reducir la transmisión del VIH a través de superficies mucosas. Estos microbicidas polianiónicos incluyen compuestos tales como PRO 2000, Buffergel, sulfato de dextrina, sulfato de celulosa, y de la forma más preferente los carragenanos.
- 60 **[0011]** Los carragenanos presentes en composiciones de la presente invención incluyen un carragenano lambda. En la medida en la que haya presentes carragenanos no lambda (en cuyo caso se puede hacer referencia al componente de carragenano de las composiciones como "los carragenanos" o la "mezcla de carragenanos"), la mezcla de carragenanos contiene por lo menos aproximadamente un 50% (y preferentemente por lo menos un 50%) de carragenano lambda, basándose en el peso seco total de los carragenanos de la composición. En realizaciones más

preferidas, la cantidad de carragenano lambda es por lo menos aproximadamente el 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99% del peso seco total de los carragenanos (es decir, carragenanos lambda y no lambda). Otras cantidades preferidas son por lo menos el 75%, por lo menos aproximadamente el 85%, por lo menos aproximadamente el 95%, entre aproximadamente el 85 y aproximadamente el 99%, y entre aproximadamente el 94 y aproximadamente el 97% de carragenano lambda.

[0012] El carragenano lambda está disponible comercialmente (FMC Corp., Filadelfia). Alternativamente, el carragenano lambda se puede producir a partir de plantas de algas marinas diploide (esporófito) por ejemplo, *Gigartina raduda*, *Gigartina skottsbergii*, *Gigartina chamissoi*, *Gigartina stellata*, *Iridaea cordata*, *Chondrus crispus* y *Sarcothalia crispata*. El aislamiento del carragenano con respecto a las algas se lleva a cabo de acuerdo con técnicas normalizadas. Por ejemplo, las algas se separan, se limpian y a continuación se secan. El carragenano lambda se extrae en hidróxido de sodio diluido caliente, generando una pasta que contiene una concentración de carragenano lambda de hasta el 4%. La pasta resultante se clarifica por centrifugación y filtración para obtener una solución clara de carragenano lambda. El agua se elimina por cualquier combinación de evaporación, precipitación con alcohol o lavado, y secado.

[0013] El resto de los carragenanos de composiciones de la presente invención puede incluir por lo menos un carragenano no lambda. Con "carragenano no lambda" se pretende significar cualquier carragenano que no sea carragenano lambda, tal como carragenano kappa, carragenano iota, carragenano kappa-II (que contiene carragenanos kappa y iota), carragenano mu, y carragenano nu. Los carragenanos no lambda también están disponibles comercialmente (por ejemplo, FMC Corp.) o se pueden extraer de algas marinas de acuerdo con técnicas normalizadas. Por ejemplo, el carragenano kappa-II también está presente de forma natural en las especies de algas descritas anteriormente. En realizaciones preferidas, los carragenanos no lambda incluyen carragenano kappa, carragenano iota, y carragenanos kappa-II, y mezclas de dos o más cualesquiera de los mismos. En realizaciones más preferidas, el carragenano no lambda incluye carragenano kappa-II. En realizaciones preferidas, el componente no lambda de los carragenanos constituye menos de aproximadamente el 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 ó aproximadamente el 25% del peso seco total de los carragenanos. En realizaciones más preferidas, el componente no lambda es aproximadamente menos de aproximadamente el 25%, menos de aproximadamente el 15%, menos de aproximadamente el 5%, entre aproximadamente el 1% y aproximadamente el 15%, o entre aproximadamente el 3 y aproximadamente el 6% del peso seco total de los carragenanos. En otras realizaciones preferidas, la mezcla de carragenanos está sustancial o totalmente exenta de dextrosa, un ingrediente que se encuentra comúnmente en los carragenanos utilizados en la industria alimentaria.

[0014] Con el fin de proporcionar un efecto antimicrobiano, el carragenano lambda o los carragenanos están presentes generalmente en cantidades de aproximadamente 1 a aproximadamente 5%, basándose en el peso total de la composición. En realizaciones preferidas, los carragenanos están presentes en una cantidad de aproximadamente el 3% en peso total de la composición. Con "antimicrobiano" o "efecto antimicrobiano", se pretende significar que la composición inhibe o reduce la probabilidad de transmisión de una infección de transmisión sexual provocada por una bacteria, otro microbio o un virus. Las composiciones de la presente invención resultan útiles en la protección contra infecciones de transmisión sexual, por ejemplo, inhibiendo la infección por VIH, HPV, HSV-2 y *Neisseria gonorrhoeae*. Por otro lado, las expresiones "antimicrobiano" y "efecto antimicrobiano" no están destinadas a conllevar, implicar o limitarse a ningún medio particular por el cual se logre la inhibición de la transmisión de la infección. Sin pretender ceñirse a ninguna teoría particular de acción, se cree que los carragenanos se unen de manera no específica a virus, bacterias y otros microbios que son agentes etiológicos de STIs, bloqueando así sitios receptores. Se pueden usar composiciones que contienen el carragenano lambda o los carragenanos en cantidades menores del 1% o superiores al 5%, siempre que proporcionen un efecto antimicrobiano y mantengan la aceptabilidad vaginal. Con "aceptabilidad vaginal", se pretende significar que las propiedades reológicas, tales como la viscosidad de la composición, permiten usarla para su finalidad deseada (por ejemplo, la composición mantiene una viscosidad de manera que puede ser aplicada por el usuario y queda retenida en la cúpula vaginal, al mismo tiempo que proporcionando propiedades estéticas tales como ser sustancialmente inodora, suavidad, claridad, ser incolora e insípidez). La viscosidad se selecciona con el fin de permitir que la composición recubra uniformemente el revestimiento epitelial de la cúpula vaginal. En general, la viscosidad de las composiciones es de aproximadamente 10.000 a aproximadamente 50.000 cP, preferentemente de aproximadamente 20.000 a aproximadamente 50.000 cP, y más preferentemente de aproximadamente 30.000 a aproximadamente 50.000 cP. El carragenano presenta un continuo de pesos moleculares. En general, las mezclas de carragenanos de la presente invención pueden tener un peso molecular de hasta aproximadamente 2×10^6 daltons, presentando menos de aproximadamente el 1% de moléculas de carragenano un peso molecular medio de 1×10^5 daltons (según se determina por cromatografía de permeación de gas y dispersión de luz). Más particularmente, un carragenano lambda de la invención tiene un peso molecular medio en peso de aproximadamente 600.000 a aproximadamente 1.200.000 daltons. Esta propiedad física comunica ausencia de absorbabilidad a la formulación final que, a su vez, proporciona actividad anti-microbiana prolongada.

[0015] Entre los otros microbicidas polianiónicos, diferentes de los carragenanos, que también se pueden usar en las composiciones de la presente invención, se encuentra el PRO 2000. Este microbicida es un microbicida vaginal para la prevención del VIH. Adicionalmente, otros de estos microbicidas polianiónicos incluyen Buffergel, un espermicida microbicida que proporciona actividad de barrera para mantener la acidez suave protectora de la vagina en presencia de

semen. Además, para ello también se pueden utilizar el sulfato de dextrina, un polianión que bloquea la entrada del VIH en la superficie de la célula, y sulfato de celulosa.

5 **[0016]** La composición contiene además un agente controlador de pH fisiológicamente aceptable tal como tampón fosfato salino (PBS). Además de estabilizar el pH de la composición (por ejemplo, en un nivel de aproximadamente 3,5 a aproximadamente 8,5, y preferentemente de aproximadamente 5,8 a aproximadamente 7,2, tal como desde aproximadamente 6,8 a 7,2), el agente controlador de pH evita o reduce cualquier variación del cambio de la composición una vez que se introduce en el cuerpo donde el pH puede variar significativamente. El pH vaginal puede variar de 3,5 a 5,5. Así, la presencia del agente controlador de pH extiende el efecto antimicrobiano de los carragenanos. Las composiciones incluyen de aproximadamente el 0,001% a aproximadamente el 1,0% de los agentes controladores de pH. La formulación de las composiciones puede contener además otros agentes activos y/o ingredientes inertes, en función del uso deseado (según se describe posteriormente).

15 **[0017]** Los carragenanos de la presente invención proporcionan otras diversas ventajas. Permanecen estables si se exponen a temperaturas de congelación, ambiental, o de ebullición. La mezcla es compatible con el entorno vaginal humano. Sin pretender ceñirse a ninguna teoría particular de acción, se cree que los carragenanos son compatibles con el entorno vaginal humano y no actúan como sustrato o provocan o estimulan de otra manera el crecimiento de flora vaginal natural, ni son tóxicos de manera que alteren el equilibrio de la flora natural de la vagina. Además de las propiedades atribuibles a los carragenanos de la presente invención, su actividad antimicrobiana se prolonga durante un periodo de tiempo ya que no son absorbidos sistémicamente ni se degradan en ningún subproducto absorbible perjudicial para los humanos.

25 **[0018]** Otro aspecto de la presente invención se refiere a un complejo entre una sal de metal hidrosoluble y los carragenanos. En realizaciones preferidas, la sal metálica es una sal de cinc (y a la composición antimicrobiana se le hace referencia como "carragenato de cinc"). El cinc es un inhibidor de patógenos de transmisión sexual tales como el VIH y el HSV-2. Se ha demostrado que el acetato de cinc y el sulfato de cinc inhiben la infección por VIH en cultivo celular, y el HSV-2 tanto en cultivo celular como en animales de laboratorio. Las sales de cinc han demostrado ser eficaces en el bloqueo de la infección por VIH *in vitro*³⁹, el virus de la fiebre aftosa, rinovirus humano, influenza A y B, virus del bosque semliki y virus sindbis⁴⁰. Haraguchi, et al³⁹, observaron que el cloruro de cinc, el acetato de cadmio y el cloruro de mercurio inhibían la producción de VIH-1 según se sometió a ensayo por ELISA p24 y RT. El cloruro de cinc no presentaba citotoxicidad significativa cuando estaba presente en concentraciones de hasta 550 µg/ml.

35 **[0019]** Las sales de cinc hidrosolubles útiles en la presente invención incluyen tanto sales inorgánicas como sales orgánicas que presentan propiedades antimicrobianas sin provocar irritación inaceptable cuando se usan de acuerdo con la presente invención. Las sales de cinc hidrosolubles preferidas incluyen acetato de cinc, propionato de cinc, butirato de cinc, formiato de cinc, gluconato de cinc, glicerato de cinc, glicolato de cinc, lactato de cinc, sulfato de cinc, cloruro de cinc, y bromuro de cinc. ZnSO₄, ZnCl₂, ZnBr₂, Zn(Ac)₂, etcétera. Las sales homólogas de cobre y plata son también útiles en la presente invención, siempre que sean no irritantes *in vivo* y no provoquen degradación en ningún subproducto absorbible perjudicial para los humanos. Las composiciones de esta invención incluirán por lo tanto entre aproximadamente 0,03% y 1,5% de las sales metálicas hidrosolubles, preferentemente de aproximadamente 0,3% a 40 1,0%. La actividad anti-microbiana de la composición es mayor que una formulación que contiene los carragenanos como único agente antimicrobiano. En realizaciones de la presente invención con sales de cinc específicas, se produce un aumento significativo de la actividad antimicrobiana. Sin pretender ceñirse a ninguna teoría particular de acción, se cree que la actividad anti-microbiana de la formulación mejora debido a que la velocidad a la cual la sal metálica es absorbida por el cuerpo está relativamente controlada y, al mismo tiempo, se reduce la irritación de la sal metálica.

45 **[0020]** Los complejos de la presente invención se pueden preparar por procesos normalizados por los cuales los iones metálicos sustituyen cationes que están presentes de forma natural en el esqueleto estructural del polisacárido. Por ejemplo, el carragenano de cinc (el cual se refiere a un complejo entre cationes de cinc y los carragenanos de la presente invención) es un compuesto sintetizado mediante un procedimiento por el cual cinc (II) se une de forma no covalente a los grupos sulfato de los carragenanos. El carragenano es un polisacárido que está compuesto por unidades repetidas de D-galactosa y D-galactosa 3,6-anhidro dispuestas de una forma lineal. El polímero está altamente sulfatado con 3 grupos SO₃ por cada unidad de disacárido. La unión de cinc a los carragenanos se logra mediante un proceso químico desarrollado para sustituir sodio unido a carragenano nativo con cinc. En este proceso, como fuente de cationes de cinc, se utiliza una solución acuosa de una sal de cinc altamente soluble (tal como acetato de cinc). Los carragenanos se dializan con respecto a una solución concentrada de acetato de cinc permitiendo que iones de cinc cargados positivamente se difundan y complejen con los grupos sulfato negativos de los carragenanos. A continuación el exceso de cinc se elimina por diálisis contra agua.

60 **[0021]** La inclusión de un complejo de cationes metálicos de cinc II con los carragenanos en la presente invención se puede lograr mediante el uso de carragenato de cinc II. El carragenato de cinc se sintetiza mediante sustitución de los cationes de carragenano naturales (sodio, potasio, calcio) por cationes de cinc. El carragenato de cinc se prepara tradicionalmente por diálisis de una solución de carragenano contra una solución concentrada de acetato de cinc II. El exceso de cationes de cinc se elimina a continuación por diálisis contra agua, antes de la concentración, y por ejemplo,

lío-filización. El uso de carragenato de cinc II puede evitar el uso de aniones tales como lactato o acetato en la presente invención.

5 **[0022]** Otro de los procesos conlleva (a) empapar los carragenanos en aproximadamente 2,5% de lactato de cinc (u otra sal de cinc soluble adecuada) en un licor de alcohol:agua 50:50 durante dos horas, (b) su separación, y (c) lavado con alcohol antes de su secado. Puede que sea necesario repetir las etapas (a) a (c) varias veces para lograr el contenido metálico deseado en los carragenanos. Se requieren normalmente dos ciclos para alcanzar más del 50% de carragenano de cinc sobre una base equivalente.

10 **[0023]** Los procedimientos anteriores generan un compuesto, el cual es hidrosoluble y activo contra virus con envoltura como el VIH y el HSV-2. A diferencia de las sales de cinc inorgánicas u orgánicas simples, el carragenano de cinc mantiene las propiedades reológicas preferidas y posee un peso molecular elevado (hasta 2.000.000 Da) haciendo favorable para su formulación en un producto vaginal, el cual es no irritante y no se absorbe. A la composición se le hace referencia como "complejo" debido a la presencia de interacciones moleculares entre el metal y los carragenanos que desfavorecen o desalientan su disociación a cationes metálicos libres. Los presentes complejos de una sal metálica y un complejo de polisacárido sulfatado cargado negativamente son distintos de mezclas de sales metálicas hidrosolubles y carragenanos en términos de sus propiedades físicas, químicas y/o antimicrobianas.

20 **[0024]** En otro aspecto de la presente invención, los solicitantes han descubierto que una combinación del complejo entre una sal metálica insoluble en agua y carragenanos junto con agentes antirretrovirales específicos proporciona ventajas inesperadas y propiedades sinérgicas. Más particularmente, se ha observado que esta combinación particular de ingredientes proporciona resultados inesperados en términos de inhibición de infecciones de transmisión sexual y particularmente en el bloqueo de infecciones vaginales por SHIV-RT (transcriptasa inversa del virus de inmunodeficiencia de los simios/humano). Los agentes antirretrovirales son fármacos utilizados para el tratamiento de la infección por retrovirus, principalmente VIH. Existen varias clases diferentes de fármacos antirretrovirales que actúan en fases diferentes del ciclo vital del VIH, y las mismas incluyen, por ejemplo, inhibidores de la transcriptasa inversa no nucleósidos (NNRTIs), inhibidores de la transcriptasa inversa nucleósidos (NRTIs), inhibidores de la integrasa, inhibidores de la fusión y antagonistas de CCR5.

30 **[0025]** Los NNRTIs son compuestos que se fijan a transcriptasa inversa y evitan que la enzima convierta ARN en ADN de manera que el material genético del VIH no se pueda incorporar en el material genético sano de células y se pueda evitar que las células produzcan virus nuevos. Incluyen fármacos tales como nevirapina, delavirdina, efavirenz, etravirina, MIV-150, MIV-160, MIV-170, dapivirina (TMC-120), y UC-781. Con la mayor preferencia el NNRTI sería MIV-150, y NNRTI desarrollado por Medivir para su uso como agente terapéutico antivírico. El MIV-150 es un inhibidor de la enzima de VIH-RT de unión fuerte que se caracteriza por una formación rápida y una velocidad de disociación lenta que es eficaz en la inactivación de aislados químicos de VIH en concentraciones muy bajas. En una realización preferida de la presente invención, los solicitantes han descubierto por lo tanto que la combinación específica de los carragenanos de esta invención con sales metálicas hidrosolubles, preferentemente tales como cinc, así como los NNRTIs, tales como MIV-150, son eficaces en el bloqueo total de la infección vaginal por SHIV-RT. Además, se ha observado que esta combinación específica es significativamente más eficaz que la combinación individual de los carragenanos con sales metálicas hidrosolubles tales como cinc; o los carragenanos con NNRTIs, o los propios carragenanos. En una realización preferida, la combinación de los carragenanos de la presente invención, las sales metálicas hidrosolubles, y el NNRTI incluyen preferentemente los carragenanos descritos anteriormente, incluyendo carragenano lambda en cantidades de por lo menos aproximadamente 50% en peso seco de los carragenanos, siendo el resto de los carragenanos por lo menos un carragenano no lambda, y con la mayor preferencia una combinación de 95% de carragenano lambda y 5% de carragenano kappa, de manera que la composición global en forma de un gel incluye entre 1% y 5% de carragenano, preferentemente de forma aproximada un 3% de carragenano; las composiciones incluyen las sales metálicas hidrosolubles que comprenden preferentemente sales de cinc, con la mayor preferencia en forma de acetato de cinc o lactato de cinc, incluyendo desde aproximadamente el 0,1% en peso y el 1,5% en peso del metal, tal como el cinc, en la composición global, con la mayor preferencia aproximadamente 0,3% en peso del mismo; e incluyen los NNRTIs, con la mayor preferencia MIV-150, en cantidades de entre 5 µM a 5.000 µM (ó del 0,000185% al 0,185%), y preferentemente desde entre 10 µM y 250 µM (o del 0,00074% al 0,00925%) del NNRTI, tal como MIV-150, con la mayor preferencia aproximadamente 50 µM (o el 0,00185%) del MIV-150.

55 **[0026]** Los NRTIs son compuestos que se incorporan en el ADN del virus para detener el proceso de construcción. Así, dan como resultado ADN incompleto que no puede crear un virus nuevo. Incluyen fármacos tales como abacavir, tenofovir y zidovudina.

60 **[0027]** Los solicitantes han observado que los NNRTIs y los NRTIs presentan propiedades inesperadas específicas cuando se usan en las composiciones de la presente invención.

[0028] En otro aspecto de la presente invención, ácido lignosulfónico ("LSA") se combina con un carragenano lambda o los carragenanos (a lo cual se hace referencia en la presente como LSA-carragenano), para lograr una potenciación del efecto antimicrobiano. El LSA se utiliza comercialmente como estabilizador industrial, agente dispersante, y fortalecedor.

Se usa también como fuente de fibra a granel en pienso para ganado, y como agente emulsionante y dispersante en el procesamiento de ciertos alimentos para consumo humano. Existe en las paredes celulares de plantas superiores. Las fibras de las paredes celulares están constituidas generalmente por el polisacárido celulosa, que es el polisacárido más abundante en la tierra. Además de celulosa, la pared celular secundaria contiene otro material muy abundante denominado lignina la cual es el polisacárido que hace que las plantas sean más rígidas. Cociendo virutas de madera en una solución de bisulfato de calcio bajo calor y presión, la lignina se convierte en una solución de ácido lignosulfónico (LSA) hidrosoluble conocida como licor gastado del proceso al sulfito^{31,32}. Es un compuesto de baja masa molar con un peso molecular medio de aproximadamente 5.000 Daltons. Debido a que las ligninas son polímeros naturales muy complejos con muchos acoplamientos aleatorios, la estructura química exacta no se conoce, aunque se considera que es la correspondiente de un polímero sulfonado en el que la unidad básica es una estructura de propilbenceno similar a la del alcohol coniferílico³¹. La utilidad de lignosulfonato comercial proviene de sus propiedades de dispersión, de unión, de complejación y de emulsificación. La estructura de anillo aromático del ácido lignosulfónico confiere a las plantas la capacidad de resistir ataques de microbios. Se ha demostrado que el LSA tiene actividad anti-VIH *in vitro*.

[0029] Las formulaciones que comprenden los carragenanos y LSA se pueden preparar mediante la adición de LSA a los carragenanos, generalmente en una relación en peso de LSA-carragenanos totales de aproximadamente 20:1 a aproximadamente 1:20. Como en el caso de composiciones que contienen una sal metálica, una sal tampón sólida se puede mezclar con los carragenanos, habitualmente en una relación en peso de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 10:1. La mezcla resultante se solubiliza entonces en una solución acuosa. El pH de la formulación de carragenano-LSA se puede ajustar a continuación para situarse entre aproximadamente 6,0 y aproximadamente 8,0 mediante la adición de un ácido tal como HCl, o una base tal como NaOH. El LSA en soluciones acuosas produce una coloración de bronceada a marrón. La intensidad de la misma aumenta proporcionalmente con la concentración utilizada. Así, un agente blanqueador, tal como dióxido de titanio se puede incluir en la composición. En general, el agente blanqueador se encuentra presente en una cantidad de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 3,0% basándose en el peso total de la composición. El agente blanqueador puede también contribuir al efecto antimicrobiano.

[0030] Sin pretender ceñirse a ninguna teoría particular de acción, se cree que además de cualquier actividad anti-virica que ejerza el LSA de por sí, el LSA también funciona como agente dispersante para los carragenanos, y los desenreda y alarga, creando así una mayor densidad de este material y un mayor poder anti-microbiano. Por otro lado, los carragenanos proporcionan las propiedades reológicas preferidas necesarias para una administración vaginal (e incluso rectal) y eficaz, que no se pueden lograr por medio del LSA en sí mismo debido a que este es de carácter bastante acuoso. En algunas realizaciones, la combinación de los carragenanos y LSA actúa sinérgicamente en la prevención o inhibición de infecciones de transmisión sexual.

[0031] Las composiciones de la presente invención también pueden contener un fármaco administrable por vía vaginal en la formulación acuosa junto con el agente controlador de pH y el carragenano lambda o los carragenanos. Los fármacos preferidos son agentes anticonceptivos, tales como hormonas esteroideas, que se dan a conocer en, Saleh, *et al.*, Patente U.S. 5.972.372 ("Saleh"), cuya descripción se incorpora a la presente a título de referencia. Ejemplos de agentes anticonceptivos útiles en la presente invención incluyen progestinas, ACTH, andrógenos, estrógenos, gonadotropina, la hormona del crecimiento humano, menotropinas, progesterona, progestinas (por ejemplo, levonorgestrel, noretindrona, 3-ceto-desogestrel y gestodeno), progestágeno, urofolitropina, vasopresina y combinaciones de los mismos. Los agentes preferidos incluyen compuestos progestacionales (por ejemplo, acetato de noretindrona y NESTORONE™ ("NES"). (Es decir, 16-metilen-17.alfa.-acetoxi-19-norpregnen-3,20-diona)), y progestinas (por ejemplo, levonorgestrel (LNG)).

[0032] Un agente anticonceptivo preferido es la Nestorona 16-metilen-17 α -acetoxi-19-norpregn-4-en-3,20-diona (en lo sucesivo en la presente "NES"), que ha sido identificada en la bibliografía como "ST-1435". En estudios comparativos que usan el bioensayo clásico de medición de la potencia progestacional, se observó que la NES tiene una actividad progestacional 100 veces mayor que la de la progesterona y 10 veces mayor que la del levonorgestrel⁵³. Por lo tanto, se requieren cantidades más pequeñas de NES para lograr la inhibición de la ovulación. Esta potencia combinada con una carencia de actividad androgénica, estrogénica y de tipo glucocorticoide (deposición de glucógeno hepático) y la carencia de efectos sobre parámetros de la química de lípidos o clínica, confieren ventajas especiales para el uso de NES en anticonceptivos⁵³⁻⁵⁵. Sin embargo, se ha demostrado que la NES experimenta un rápido metabolismo e inactivación tras administración oral lo cual la hace adecuada para su uso en mujeres lactantes cuando se aplica a través de implantes o anillos vaginales^{56,57}. Una dosis preferida de administración de NES cuando se combina con la mezcla de carragenanos K/ λ en forma de gel está entre aproximadamente 75 y aproximadamente 100 μ g por día, la cual alcanzará niveles plasmáticos de NES en torno a 200 pmol/l y obtendrá buenos patrones de sangrado durante las menstruaciones. Otros fármacos preferidos administrables por vía vaginal incluyen agentes para terapia hormonal sustitutiva, tales como sustancias estrogénicas (por ejemplo, etinilestradiol) y otros compuestos esteroideos.

[0033] Sin pretender ceñirse a ninguna teoría particular de acción, se cree que los carragenanos poseen una función dual de comunicar propiedades microbicidas al mismo tiempo que proporcionando un sistema de entrega de liberación prolongada para un agente anticonceptivo o agente para terapia hormonal sustitutiva, mejorando así la actividad del agente.

5 **[0034]** Cualquiera de las composiciones descritas en este documento puede contener además por lo menos un ingrediente fisiológicamente inerte, tal como un conservante fisiológicamente aceptable. Los conservantes incluyen ésteres alquílicos de ácido para-hidroxibenzoico, tales como metil paraoxibenzoato, propil paraoxibenzoato, derivados de hidantoína, parabenos, tales como metil parabeno, sales propionato, triclosán tricarbnilida, aceite del árbol del té, alcoholes, farnesol, acetato de farnesol, hexaclorofeno y sales de amonio cuaternario, tales como *benzolconjure*, sales de aluminio y cinc, benzoato de sodio, alcohol bencílico, cloruro de benzalconio y clorobutanol. En general, el conservante está presente en una cantidad de hasta aproximadamente 0,3% basándose en el peso total de la composición. Además de inhibir el crecimiento de microorganismos que pueden ser introducidos de manera involuntaria durante la fabricación, el conservante evita cualquier efecto perjudicial que pudiera producirse en los agentes activos de la composición debido a la presencia de la flora normal del cuerpo una vez que la composición se introduce en el mismo. Esto prolongará el espacio de tiempo que permanecen activos los agentes activos de la composición.

15 **[0035]** En realizaciones preferidas, las composiciones de la presente invención, por ejemplo, que contienen los carragenanos como único agente antimicrobiano, con o sin un fármaco administrable por vía vaginal, y las composiciones que contienen un agente antimicrobiano adicional tal como la sal de metal catiónico o LSA, se administran por vía vaginal. La presente invención también incluye la administración rectal. Las composiciones se pueden formular adecuadamente por ejemplo, en geles, cremas, espumas, películas y supositorios, de acuerdo con técnicas convencionales de la industria farmacéutica. Se prefieren los geles. Las formulaciones se administran preferentemente antes de la actividad sexual, tal como una relación genital, por lo general aproximadamente dentro de la hora anterior a ese momento. La aplicación en humanos de la formulación basada en carragenanos evita o inhibe la transmisión de una infección de transmisión sexual (STI), tal como la *Neisseria gonorrhoeae*, virus del papiloma humano, HSV-2 y VIH.

25 **[0036]** Todavía otro aspecto de la presente invención se refiere a un método para refinar un carragenano no absorbible. La formulación se prepara típicamente mediante el mezclado de una sal tampón sólida y carragenano lambda, o la mezcla de carragenanos, en una relación en peso de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 10:1. La mezcla de la sal tampón sólida y carragenano se solubiliza a continuación en agua o en una solución acuosa, para preparar la formulación. El pH de la formulación se ajusta entonces de manera que se sitúe entre aproximadamente 6,0 y aproximadamente 8,0. Esto se consigue típicamente mediante la adición de un ácido, tal como HCl o una base, tal como NaOH. En general, la viscosidad de la formulación es de aproximadamente 20.000 a aproximadamente 100.000 CPS, preferentemente de aproximadamente 30.000 a aproximadamente 35.000 CPS. Se puede adicionar por lo menos un conservante fisiológicamente aceptable a la formulación. Ejemplos de dichos conservantes se dan a conocer en la presente. El conservante puede estar presente en las proporciones indicadas en farmacopeas diversas, y en particular en una relación en peso con respecto a los carragenanos de aproximadamente 80:1 a aproximadamente 10:1, preferentemente de 40:1 a aproximadamente 15:1.

40 **[0037]** Las sales tampón sólidas incluyen sales sólidas de metales alcalinos de ácido acético, ácido cítrico, ácido fosfórico, y ácido láctico. En el caso del ácido fosfórico, el tampón fosfato sólido de metal alcalino incluye una mezcla sólida de sales alcalinas de fosfato tri-básicas y di-básicas, preferentemente en forma anhidra, en el que el metal alcalino incluye, aunque sin carácter limitativo, potasio y sodio. Se puede usar cualquier tampón fisiológicamente aceptable. Sin embargo, en el caso en el que se usen sales de cinc hidrosolubles, los fosfatos son menos preferidos, y en estas formulaciones, se prefieren más los acetatos, citratos y lactatos. En realizaciones preferidas, estas soluciones tampón comprenden mezclas de ácido acético y acetato de sodio; ácido cítrico y citrato de sodio; y ácido láctico y lactato de sodio.

50 **[0038]** Sin pretender ceñirse a ninguna teoría particular de acción, se cree que los carragenanos son polvos secos que son extremadamente hidrocópicos cuando se exponen a la atmósfera. La absorción de humedad atmosférica en el ingrediente seco provoca aglutinación del material. El problema se agrava cuando el material se introduce a continuación en la solución de base acuosa, de tal manera que no se puede obtener una incorporación completa de los carragenanos en una solución acuosa homogénea. También se cree que mezclando entre sí los carragenanos y por lo menos una sal tampón sólida, la sal tampón sólida absorbe la humedad atmosférica que los carragenanos habrían absorbido cuando se exponen a la atmósfera, lo cual impide o reduce sustancialmente la aglutinación de los carragenanos. Se cree además que el proceso sirve para aumentar la solubilidad de los carragenanos en agua, y se consigue una estabilización del pH.

Ejemplo 1. Producción de 500 litros de los carragenanos

60 **[0039]** En la preparación del carragenano lambda o la mezcla de carragenanos, (1) los ingredientes de la formulación se deberían pesar individualmente en un recipiente de pesaje seco, limpio; (2) el peso "real", no peso de protocolo, del ingrediente se debería anotar en el registro de producción de fabricación con independencia de que solo hubiera una pequeña variación entre los dos; (3) no debería utilizarse ningún contenedor con ingredientes a granel que contenga un artefacto(s) o que se contamine, y el contenedor debería cerrarse, sellarse, etiquetarse con "CONTAMINADO" y retirarse del área de producción; (4) en el proceso no debería transferirse ningún lote de producción desde un recipiente

a otro antes de que la fabricación se haya completado y la formulación haya superado las pruebas de control de calidad; y (5) el recipiente de producción debería permanecer cerrado durante la fabricación para evitar la pérdida de agua debido a la evaporación, especialmente durante cualquier etapa que requiera calentamiento.

5 **[0040]** Adicionalmente el carragenano ha demostrado ser estable en el estado sólido y el estado de producción bajo una variedad de condiciones adversas, incluyendo la congelación o autoclavado, durante 24 meses.

10 **[0041]** Lo siguiente se refiere a un procedimiento correspondiente a lo usado para preparar una formulación que contiene una mezcla de carragenanos con carragenanos lambda (λ) y kappa-II (K-II) (la mezcla de carragenanos K-II/ λ). En el transcurso de la preparación de la mezcla de carragenanos K-II/ λ a partir de lotes de tamaño de laboratorio de 100 ml hasta una escala aumentada de lotes de laboratorio de 15 y 30 litros para finalizar el procedimiento de fabricación de lotes de 500 litros, resultó difícil obtener una uniformidad entre lotes de la formulación deseada. El presente método superó sorprendentemente estas dificultades y produjo formulaciones de las mezclas de carragenanos K-II/ λ que presentaban una calidad uniforme entre lotes.

15 **Equipo:**

[0042] Recipiente de producción - IKA, EMA 9/500AIUTL, es un recipiente de producción con camisa de agua que permite un calentamiento y enfriamiento rápidos de la solución durante la producción.

20 **Ingredientes:**

[0043]

25 la mezcla de carragenanos K-II/ λ ;
 Tampón fosfato salino (PBS) [que contiene: NaCl - 120 mmol/l, KCl – 2,7 mmol/l, Tampón fosfato (fosfato potásico monobásico y fosfato sódico dibásico) - 10 mmol/l - (Sigma Aldrich, Saint Louis MO);
 Éster metílico p-hidroxibenzoico (Metil parabeno) - (Nipa Laboratories, Pontypridd, Reino Unido);
 30 Ácido Clorhídrico (HCl) - Merck, Darmstadt, Alemania;
 Agua purificada - Clean Chemical Sweden AB, Borlange, Suecia.

Procedimiento

35 **[0044]**

(1). Se pesaron los ingredientes en las siguientes cantidades:

INGREDIENTE	CANTIDAD
Agua Purificada (3 Partes)	484,0 kg
la mezcla de carragenanos K-II/ λ	15,0 kg
Tampón fosfato salino (PBS)	4,8 kg
Metil parabeno	0,5 kg
Ácido Clorhídrico I (10%)	0,5 kg

40 (2). Se mezclaron entre sí de manera cuidadosa y minuciosa los ingredientes secos, la mezcla de carragenanos K/ λ y el tampón fosfato salino (PBS);

(3). Se inspeccionó el recipiente de producción para garantizar que la cámara de mezclado está limpia, seca y exenta de artefactos, y que la válvula inferior está cerrada.

45 (4). Se llenó el recipiente de producción con 100,0 l (Parte I) de agua purificada y se dio inicio a la agitación: turbina 500 rpm y ancla 20 rpm. Se adiciona agua en 3 partes. La primera parte fue suficiente para disolver el metil parabeno. La segunda parte ayudó a reducir la temperatura, diluyó suficientemente el HCl de manera que no se produjo una hidrólisis ácida del carragenano al mismo tiempo que se mantuvo un nivel de solución suficientemente bajo de modo que cuando se adicionó la mezcla de carragenanos/PBS, el tamiz de entrega se pudo hacer descender al recipiente de mezclado de tal manera que no entró en contacto con la solución de base y quedó más bajo que la compuerta de acceso del recipiente de forma que no se perdió el exceso de “espolvoreo” de la mezcla. La tercera parte completó la concentración final.

50 (5). Se continuó agitando y se adicionaron 0,5 kg de metil parabeno y 0,5 kg de HCl. Se cerró la compuerta de acceso del recipiente y se calentó el agua de 75° a 85°C. Una vez que se alcanzó esta temperatura, continuamos agitando durante un mínimo de 10 minutos para disolver el metil parabeno.

(6). Se interrumpió el calentamiento y se adicionaron 250,0 kg (Parte II) de agua purificada. Se enfrió la solución de 25°

a 30°C. La adición del agua aceleró el proceso de enfriamiento. La solución requería ser enfriada de manera que no producía vapor cuando se realizó la siguiente adición de ingredientes. Además de evitar la pérdida de agua cuando el recipiente se abriese para la siguiente adición, el vapor provocó que la mezcla de carragenanos/PBS se aglutinase y se pegase al tamiz que se usó en la adición;

5 (7). Se abrió la compuerta de acceso y se dio inicio a la adición de la mezcla de carragenanos / PBS lentamente a través de un tamiz con agitación suave. La adición ocupó aproximadamente 20 minutos. La adición de la mezcla coincidió con el aumento de la velocidad de agitación a una velocidad máxima de turbina de 1.200 rpm y de ancla de 20 rpm. La viscosidad de la solución se incrementó exponencialmente con la adición de los carragenanos. Si la velocidad de agitación no era significativa, el carragenano formaba aglomeraciones "hidro-selladas", que nunca llegaban a disolverse e incorporarse a la solución, haciendo que el lote resultase inaceptable. (Las aglomeraciones "hidro-selladas" son bolsas de carragenano seco, que están rodeadas por un recubrimiento exterior de carragenano semihidratado, las cuales se convierten en impenetrables al agua debido al peso molecular extremadamente grande y la estructura flexible del carragenano);

10 (8). Se cerró la compuerta de acceso y se continuó agitando a máxima velocidad, turbina 1.200 rpm y ancla 20 rpm. Se adicionaron 134,0 kg de agua purificada (Parte III) y se desconectó la línea de agua, y se cerró la válvula. Se calentó la solución de 75° a 80°C mediante la aplicación de un 52% de calor; y

15 (9). Se comprobó que todas las válvulas estaban cerradas y se aplicó el vacío al recipiente a 400 mbar. Se agitó la solución a una velocidad ligeramente reducida, turbina 1.100 rpm y ancla 20 rpm, al vacío durante 1,5 hr de 75° a 80°C. La agitación constante de la solución, que era necesaria para la distribución uniforme y la incorporación completa de ingredientes, provocó excesivo aire atrapado. El vacío extrajo este aire fuera de la solución;

20 (10). El calentamiento, la agitación y el vacío se pusieron en OFF. Se retiró la Muestra de Prueba del recipiente de producción y se sometió a la Prueba de Control n.º1 Incorporación completa y distribución uniforme;

Prueba de Control n.º 1: Incorporación completa y distribución uniforme

25

[0045] Se extrajeron aproximadamente 90 µl de la mezcla en el proceso (se utilizó una punta de pipeta de 200 µl de orificio grande para ayudar a extraer la solución de carragenanos) y los mismos se mezclaron en 10 µl de una TS de azul de metilo al 0,1% (alcohol isopropílico:dH₂O, 1:1) en un tubo Eppendorff de 500 µl. La mezcla en el tubo debería aparecer con un color azul uniforme. Esto indica que la mezcla de carragenanos K-II/λ está uniformemente distribuida dentro de la solución. Se preparó un portaobjetos de microscopio con 10 µl de esta mezcla; se cubrió con un cubreobjetos y se visualizó con un aumento reducido (10X). La mezcla de carragenanos K-II/λ debería aparecer en forma de hebras púrpuras grandes. Esto indica que la mezcla de carragenanos K-II/λ se incorporó por completo y la solución es "SUPERADA". Si las hebras son azules, o son visibles aglomeraciones azules grandes, entonces la mezcla de carragenanos K-II/λ no está totalmente incorporada y la solución es "FALLIDA". Se continuó procesando la solución bajo las condiciones de la etapa n.º 9. Se volvió a comprobar la solución a intervalos de 0,5 horas hasta que la solución fuera "SUPERADA".

(11). Cuando la solución es "SUPERADA" para la Prueba de Control n.º 1, se somete a la Prueba de Control n.º 2, pH;

40

Prueba de control n.º 2: pH

[0046] La muestra de prueba debería enfriarse a 25°C ± 2 (un intervalo de 23°C a 27°C) para la prueba. El pH debería ser de 7,0 ± 0,1 (un intervalo de 6,9 a 7,1). Esto indica que el pH de la solución es uniforme y la solución es "SUPERADA". Si la solución no está dentro del intervalo de pH aceptable (6,9 a 7,1) la solución es "FALLIDA". Si la solución es "FALLIDA", es necesario ajustarla, según se requiera o bien con HCl al 10% (para disminuir el pH) o bien con NaOH 1N (para aumentar el pH) en incrementos de 25 ml hasta que la solución sea "SUPERADA". Con cada adición incremental ya sea de ácido o de base, es necesaria una agitación exhaustiva (etapa n.º 9 de agitación y condición de vacío, sin calor añadido) para garantizar una distribución uniforme en todo el lote antes de volver a someter a prueba el pH. Se vuelve a comprobar la solución después de la agitación/vacío durante 0,5 horas. Se continua de esta manera hasta que la solución sea "SUPERADA".

50

(12). Cuando la solución es "SUPERADA" para la Prueba de Control n.º 2, se comienza a enfriar la mezcla a 25 °C

55 **[0047]** ± 2° (23°C a 27°C). Será necesario aumentar la velocidad de agitación, que debería estar en OFF en este momento, a medida que la solución se espese por el enfriamiento. Al inicio, turbina OFF y ancla a 20 rpm, aumentar turbina a 20 rpm / 15 mm y aumentar el ancla a 10 rpm / 30 mm, terminando con la turbina a 1.000 rpm y el ancla a 40 rpm. Se prefiere no aumentar la agitación demasiado rápidamente; de lo contrario, puede obtenerse como resultado aire atrapado. Si esto sucediera, se aplica el vacío a 400 mbar hasta que la solución quede libre de burbujas de aire;

60

(13). Extraer Muestra de Prueba Final del recipiente de producción y volver a someter a la Prueba de Control n.º 2 pH y a la Prueba de Control n.º 3, viscosidad.

Prueba de Control n.º 3: viscosidad

5 [0048] La muestra de ensayo se debería calentar a 35°C ±2° (un intervalo de 33°C a 37°C). Para optimizar el rendimiento, la viscosidad debería ser de aproximadamente 30.000 a aproximadamente 40.000 cP. Las mediciones de viscosidad indican que la viscosidad de la solución es uniforme con la muestra de referencia de PC y lotes de producción de CCS, y la solución es "SUPERADA". Si la solución es "FALLIDA" se obtienen muestras de prueba de la parte superior e inferior del recipiente de producción y se lleva a cabo la Prueba de Control n.º 2, pH y la Prueba de Control n.º 3, Viscosidad sobre cada muestra. Si la solución sigue siendo "FALLIDA", se repite la etapa n.º 9 y la etapa n.º 12 y se vuelve a someter la solución a la Prueba de Control n.º 3, Viscosidad. Si la solución es "FALLIDA" se llevará a cabo un Estudio Fuera de Especificaciones para determinar la fuente de la producción fuera de especificación.

[0049] Se descubrió que el ajuste de la viscosidad con la adición de agua produce una concentración/porcentaje desconocido para el lote de producción final lo cual hace que el lote de producción resulte inaceptable.

15 (14). Cuando la solución es "SUPERADA" para las Pruebas de Control n.º 1, n.º 2 y n.º 3, se trata de un lote de producción aceptable que puede procesarse para las pruebas de control final. Se conecta el tubo de transferencia que contiene una bolsa filtrante a la válvula inferior del recipiente de producción y se transfiere la formulación a contenedores de almacenamiento. Se conserva una Muestra de Prueba para Pruebas Microbiológicas antes de rellenar los aplicadores.

20 [0050] La formulación final preparada en el proceso descrito anteriormente tiene los siguientes componentes.

Peso/Porcentaje: 500 litros de formulación

Componente	Peso	Porcentaje
Agua purificada	484,0 kg	96,8
Metil parabeno	500 g	0,1
PBS:		
NaCl	120 mmol/l	
KCl	2,7 mmol/l	
Sales de fosfato	10 mmol/l	
HCl 10%	500 g	0,1
la mezcla de carragenanos K-II/λ	15 kg	3,0

25 [0051] La formulación final tiene un pH de aproximadamente 7,0 que se ajustó al adicionar solución de HCl y una relación 1:1 de K₃PO₄ y Na₂HPO₄.

Ejemplo 2. Efecto del carragenano sobre infecciones por VIH *in vitro*

30 [0052] Se ha demostrado que el carragenano bloquea el VIH y otros virus con envoltura por parte de varios laboratorios incluyendo el laboratorio de la PI¹⁵⁻¹⁹. En estos estudios se han usado varios tipos diferentes de células diana y cepas de VIH. En general, se observa un bloqueo del 50% con unos pocos microgramos/ml. Este resultado es similar a otros polisacáridos sulfatados, tales como sulfato de dextrano y heparina.

35 **Ejemplo 3. Estudios de infección vírica intra-vaginal - HSV-2/Ratón**

[0053] El sistema de HSV-2/Ratón (Balb/C) es utilizado ampliamente por la mayor parte de grupos de investigación involucrados en el desarrollo de un microbicida. Una diferencia importante entre el sistema establecido por Phillips²⁰⁻²² y otros sistemas es la utilización de la comparación del intervalo de dosis vírica. La dosis normalizada de exposición vírica, dosis de infección 100% ó 10⁴ pfu, usada por otros para la evaluación de un microbicida es limitativa en cuanto a la tasa. La gran mayoría de los microbicidas en desarrollo, así como muchos de los espermicidas OTC presentarán una tasa de protección significativa contra la infección de HSV-2 con estas dosis de exposición vírica. Sin embargo, Phillips ha utilizado un método de concentración del virus que permitirá una evaluación con dosis de exposición vírica de 10⁵, 10⁶ y 1.000 x dosis de infección 100%.

45 [0054] Utilizando este sistema de dosis de exposición vírica, se realizó un estudio de comparación para evaluar las tasas de protección comparativas de una serie de microbicidas bajo desarrollo, espermicidas y lubricantes OTC, y posibles formulaciones a utilizar como placebo en los ensayos clínicos con el fin de evaluar la eficacia de un microbicida. Además de una composición de la presente invención que contiene la mezcla de carragenanos K-II/λ (a la que se hace referencia también como la "composición de carragenanos K/λ"), las formulaciones de la prueba comparativa fueron: microbicidas en desarrollo tales como BufferGelTM y No Fertil, espermicidas OTC: K-Y Plus[®] Gynol II[®], y Advantage STM; lubricantes vaginales OTC: Replens[®] y K-Y Jelly[®]; y posibles formulaciones placebo: 2,5% Carbopol[®] y 2,5% metil celulosa.

5 **[0055]** Las formulaciones de prueba se situaron en tres categorías con respecto a la eficacia en la protección de ratones contra infección vaginal de HSV-2. A la dosis de exposición vírica de 10^4 pfu, con la excepción de K-Y Jelly, Carbopol y metil celulosa, todas las formulaciones proporcionaron un nivel significativo de protección contra la infección por HSV-2. Sin embargo, a la dosis de exposición vírica de 10^5 , con la excepción de la composición de carragenanos K-II/λ, todas las formulaciones solamente proporcionaron un nivel mínimo de protección. La composición de carragenanos K-II/λ fue la única formulación que seguía aportando un nivel de protección contra la infección vírica a la dosis de exposición vírica de 10^6 pfu²⁰. Mediante la evaluación de varias formulaciones en el sistema de comparación de intervalos de dosis vírica los datos resultantes fueron la primera demostración del inesperado alto nivel de protección contra infección vírica que proporciona la composición de K-II/λ.

10 **[0056]** Por lo tanto, puede concluirse que el sistema de SH-2/ratón se puede utilizar como medio por el cual los microbicidas candidatos se pueden evaluar y comparar bajo las mismas condiciones de prueba para identificar potenciales microbicidas eficaces.

15 **Ejemplo 4. Duración de la actividad - HSV-2/ratón**

20 **[0057]** Uno de los criterios establecidos por la UNAIDS (Organización Mundial de la Salud, rama del SIDA) para un microbicida ideal establece que "el mismo debería estar activo tras la inserción y durante un período de tiempo prolongado", ofreciendo a las mujeres una mayor flexibilidad en el uso del producto. Además, el transcurso de tiempo para la infección por VIH libre de células o asociado a células puede no ser inmediato. El sistema de HSV-2/ratón puede emplearse para evaluar el espacio de tiempo que un microbicida mantendría la actividad. Esto se realiza mediante la aplicación intra-vaginal de una formulación de prueba, la espera de un período de tiempo fijado y a continuación la exposición de ratones a una dosis de virus conocida. Las pruebas de "duración de la actividad" se realizaron utilizando Gynol II[®] (un espermicida OTC que contiene un 2% de N-9), BufferGel[®] (un microbicida de bajo pH en desarrollo) y la composición de carragenanos K-II/λ, a los cinco minutos y a 1,5; 3; 6 y 18 horas tras la aplicación de la formulación. Llegado el instante de tiempo de 1½ hora, el Gynol II[®] ya no aportaba ninguna protección contra la infección y el BufferGel[®] había caído de manera que era eficaz solamente al 30%. La eficacia del BufferGel continuó cayendo con el tiempo y ya no ofrecía ninguna protección al llegar las 6 horas. En un marcado contraste, la composición de carragenanos K-II/λ siguió siendo eficaz al 85-100% en la protección contra la infección por HSV-2 hasta las 6 hrs y siguió siendo eficaz al 72% a las 18 hrs. La composición de carragenanos K-II/λ continuó conservando cierto nivel de actividad hasta durante 24 horas. Véase la fig. 1. La duración prolongada de protección contra infección vírica es exclusiva del carragenano, en particular de la composición de carragenanos K-II/λ.

35 **Ejemplo 5. Estudios de infección vírica intra-rectal - HSV-2/ratón**

40 **[0058]** Idealmente, un microbicida que resultó eficaz en la protección contra la infección por H1V podría usarse por vía rectal así como por vía vaginal. Usando una modificación de la exposición vírica intra-rectal del sistema de HSV-2/ratón se exploró una evaluación de la eficacia y la seguridad de un microbicida.

45 **[0059]** El pre-tratamiento del recto con la composición de carragenanos K-II/λ redujo significativamente el número de animales que llegaron a infectarse después de la exposición rectal con HSV-2, en comparación con el pre-tratamiento con PBS o metilcelulosa (un placebo inerte)²³

50 **Ejemplo 6. Efecto de la composición de carragenanos K-II/λ sobre la flora vaginal**

55 **[0060]** Es importante que el uso de un microbicida no perturbe el equilibrio de la flora vaginal natural. Estudios *in vitro* indicaron que el carragenano no mejoró o inhibió la tasa de crecimiento del *Lactobacillus acidophilus*, la bacteria más común presente en la flora vaginal. Un estudio llevado a cabo sobre 35 mujeres que participaban en un ensayo clínico de Fase I en relación con la seguridad vaginal de la composición de carragenanos K-II/λ no mostró ningún cambio significativo en la flora vaginal, según se midió por la presencia o ausencia de vaginosis bacteriana¹³.

60 **Ejemplo 7. Sistema de transporte vírico de VIH/Ratón**

65 **[0061]** Aunque los ratones no se pueden infectar con el VIH, se ha demostrado que cuando el virus activo o inactivado se instila en la vagina de ratones, el virus se puede detectar posteriormente en los ganglios linfáticos mediante el uso de la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR)²⁴. Se han presentado evidencias de que las células dendríticas jugaron un papel importante en la captación del virus y de su subsiguiente transporte a los ganglios linfáticos. Esta conclusión está en concordancia con estudios que implican células dendríticas en la fase inicial de la transmisión sexual del VIH²⁵.

[0062] Los resultados indican que la composición de carragenanos K-II/λ es eficaz para evitar que el VIH alcance los ganglios linfáticos, presumiblemente bloqueando el transporte de VIH desde la vagina por medio de células dendríticas.

5 **[0063]** Se usaron un transporte de VIH que hacía uso de un sistema de ratón y virus inactivados con Aldrithol™-2. Es un método normalizado para la inactivación de VIH que no altera la envoltura vírica. El bazo y los ganglios linfáticos se sometieron a ensayo en relación con la detección del VIH con el fin de establecer el bazo como sitio repositario alternativo para el VIH. El bazo (por contraposición a los ganglios linfáticos) permite obtener cantidades relativamente mayores de ARN para llevar a cabo una RT-PCR en relación con la detección del VIH. Además, la extracción de bazos consume mucho menos tiempo que la retirada de los ganglios linfáticos, reduciéndose así la probabilidad de degradación del ARN.

10 **[0064]** Para determinar la eficacia de la composición de carragenanos K-II/λ en la prevención de que el VIH cruce la barrera cervical/vaginal, los ratones se aleatorizaron en tres grupos: 1) ratones de control PBS no tratados; 2) ratones pre-tratados con metil celulosa (placebo inerte); y 3) ratones pretratados con la composición de carragenanos K-II/λ. Se muestran los resultados en el *Southern Blot* de la Fig. 2 y en la siguiente tabla.

Tratamiento	PT-PCR +/total	Porcentaje positivo (Infectado)
PB5	16/22	72%
Metil celulosa	7/10	70%
Composición de carragenanos K-II/λ	2/22	9%

15 **[0065]** Datos del tratamiento con PBS (control) y metil celulosa y ratones tratados con la composición de carragenanos K-II/λ muestran que la composición de carragenanos K-II/λ redujo significativamente el número de animales positivos (es decir, infectados) y que la metil celulosa no tuvo ningún efecto en comparación con el PBS (control). Los datos también indican que la composición de carragenanos K-II/λ fue eficaz para evitar que el VIH saliese de la cúpula vaginal.

20 **Ejemplo 8. Sistema de tránsito de células/Ratón**

25 **[0066]** Previamente se ha sugerido que la transmisión sexual del VIH podría ser mediada por linfocitos infectados por VIH o macrófagos en el semen que cruzan el epitelio del tracto genital^{26,27}. Para someter a prueba la hipótesis de que células sanguíneas mononucleares transitan desde la cúpula vaginal a través de epitelios intactos, se colocaron en la vagina de ratones células sanguíneas mononucleares activadas, con doble tinción vital (de ratón). Cuatro horas más tarde, los animales se sacrificaron y se extirparon ganglios linfáticos inguinales e ilíacos y el bazo, y las células se disociaron y se contaron por microscopía de fluorescencia. Se observaron numerosas células doblemente teñidas en los ganglios linfáticos ilíacos e inguinales y en el bazo^{28, XX}. Para evaluar el efecto que pueda tener la composición de carragenanos K-II/λ en el bloqueo de este proceso, los animales se trataron previamente con la formulación de prueba antes de la instilación de células marcadas.

30

Ratón	Inoculación		Ganglios linfáticos inguinales e iliacos	Bazo
1	Macrófagos		36	555
2	Macrófagos		52	366
3	Macrófagos		59	672
4	Macrófagos		87	786
5	Macrófagos		61	357
6	Macrófagos		40	859
7	Macrófagos		54	312
8	Carragenano K-II/λ	+	4	30
9	Macrófagos		4	6
10	Carragenano K-II/λ	+	6	48
11	Macrófagos		3	53
12	Carragenano K-II/λ	+	3	3
13	Macrófagos		14	120
14	Carragenano K-II/λ	+	27	245
15	Macrófagos		38	96
	Carragenano K-II/λ	+		
	Macrófagos			
	Metil celulosa	+		
	Macrófagos			
	Metil celulosa	+		
	Macrófagos			

Ratón	Inoculación	Ganglios linfáticos inguinales e iliacos	Bazo
	Metil celulosa	+	
	Macrófagos		

[0067] Había presencia de células del donante tanto en los ganglios linfáticos ilíacos e inguinales como en el bazo. Cuando los ratones recibieron solamente una inoculación vaginal de macrófagos, los animales receptores presentaron un promedio de 55 células marcadas del donante en los ganglios linfáticos de drenaje y de 558 células en el bazo, respectivamente. En ratones que recibieron una pre-inoculación vaginal de composición de carragenanos K-II/λ (indicada en la tabla anterior como "carragenano K-II/λ") se contabilizó un promedio de solamente 4 células en los ganglios linfáticos de drenaje, y se observó un promedio de solamente 28 en el bazo. La diferencia entre los animales no tratados y los tratados con la composición de carragenanos K-II/λ fue significativa. Cuando los receptores se pre-inocularon con metil celulosa, el promedio del número de células del donante que alcanzó ganglios linfáticos y el bazo fue de 26 en los ganglios linfáticos y 153 en el bazo. La diferencia entre ratones tratados con la composición de carragenanos K-II/λ y ratones tratados con metil celulosa fue significativa, mientras que la diferencia entre ratones no tratados y ratones pre-inoculados con metil celulosa no fue significativa. No se observó ninguna célula fluorescente en los ratones de control en los que se habían inoculado macrófagos teñidos con CMTMR congelados/descongelados.

15 Ejemplo 9. Efecto microbicida sobre el virus del papiloma

[0068] La composición de carragenanos K-II/λ también ha demostrado ser eficaz en el bloqueo de la formación de focos del virus del papiloma bovino (BPV) *in vitro* (datos no mostrados). La composición de carragenanos K-II/λ es eficaz para prevenir que el virus del papiloma humano (HPV) transforme explantes vaginales humanos en un sistema de xenoinjerto. El sistema de xenoinjerto de ratón SKID utiliza explantes de tejido vaginal humano enrollado en tubos cilíndricos que se injertan por vía subcutánea en ratones NOD/SKID (inmunodeficientes)²⁹. Se permite que los injertos sanen durante dos semanas, momento en el cual se abre un extremo del tubo y se instila un compuesto de ensayo seguido por una exposición a HPV. En experimentos que evalúan la composición de carragenanos K-II/λ, se transformaron 14 de 14 explantes de control tratados con solución salina. Por contraposición, se transformó solamente 1 de 17 explantes tratados con la composición de carragenanos K-II/λ (datos no mostrados).

Ejemplo 10. Efectos de la mezcla de carragenanos K/λ en ensayo de dilución

[0069] La mezcla de carragenanos K/λ también es eficaz a diluciones elevadas, tal como se demuestra en el sistema de HSV-2/ratón. Una composición de carragenanos K-II/λ al 3% fue diluida en PBS para preparar diluciones de 1:1, 1:5, 1:25, 1:50, 1:100 y 1:200. Las soluciones diluidas se administraron por vía vaginal a ratones seguidas por 10⁴ (dosis infectiva 100%) del HSV-2. Los resultados de estos experimentos son inesperados. En lugar de observar una disminución dependiente de la dosis en la tasa de protección antivírica la dilución de la composición de carragenanos K-II/λ de 1:50 conservó la mayor parte de la tasa de protección antivírica igual que soluciones menos diluidas. Además, se conservó una actividad significativa incluso con la solución de 1:200. Véase la Fig. 11.

Ejemplo 11. Efectos de las formulaciones basadas en la composición de carragenanos K-II/λ contra el VIH

[0070] Se han identificado compuestos que cuando se han adicionado, o unido, a los carragenanos de la presente invención, aumentan significativamente la eficacia en el bloqueo de la infección por VIH de células PBMC *in vitro*. Estudios sobre la eficacia del Zn-carragenano y el LSA-carragenano en el bloqueo de la infección por VIH de células PBMC han demostrado que las dos formulaciones son más efectivas que una composición que contenga los carragenanos solos con concentraciones menores. Los resultados de las pruebas se muestran en la Fig. 3.

45 Ejemplo 12. Efectos del LSA-carragenano contra el HSV-2

[0071] Resultados indican que el LSA-carragenano es más eficaz para bloquear la infección por VIH que los carragenanos. (Véase Fig. 4). Originalmente el LSA no parecía ser un compuesto candidato ideal de microbicida debido al hecho de su coloración marrón. Sin embargo, se observó que en una concentración del 0,25%, el LSA es altamente efectivo y comunica una coloración despreciable cuando se formula. Con el fin de garantizar que el LSA no comunique decoloración, durante la noche se empapó tejido de algodón blanco en LSA al 3% y a continuación se enjuagó con agua corriente; los resultados no revelaron ningún cambio en el color del tejido. El LSA-carragenano se comparó con carragenano en el sistema de ratón/HSV-2 con el fin de determinar la eficacia en el bloqueo de la infección vírica *in vivo*. Los resultados preliminares mostraron que el LSA-carragenano fue más eficaz que el carragenano para bloquear la infección vírica.

[0072] Además de los resultados presentados anteriormente, se comparó el LSA-carragenano con la composición de carragenanos K-II/λ sola a una dosis de exposición vírica de 10⁶ pfu, en tres experimentos independientes. El LSA-carragenano fue significativamente más eficaz que la composición de carragenanos K-II/λ sola en todos los

experimentos. La adición de otros polímeros sulfatados a la composición de carragenanos K-II/λ no aumentó la eficacia de la formulación. Por ejemplo, la adición de sulfato de dextrano 5% o heparina 5% a la composición de carragenanos K-II/λ no tuvo ningún efecto sobre la eficacia contra la infección por HSV-2 en ratones.

5 **[0073]** Evaluación de las Formulaciones de la composición de carragenanos K-II/λ (a la que se hace referencia en las tres tablas siguientes como "Carragenano") con y sin LSA.

10 **[0074]** Una dosis vírica de 10⁶ pfu de HSV-2 es equivalente a 100 veces la dosis vírica que infectaría a todos los ratones sin protección. Es necesario usar unas dosis de virus tan altas porque el carragenano es extremadamente eficaz en la inhibición de la infección vírica.

15 **[0075]** Cada formulación es sometida a prueba inicialmente en un total de 20 ratones. Compuestos o formulaciones que presentan un efecto de bloqueo se someten a ensayo nuevamente en otros 20 ratones. El número de ratones infectados es un promedio.

FORMULACIÓN	Nº RATONES INFECTADOS	% INFECTADOS
	Nº RATONES TOTAL	
3% Carragenano	14/20	70
1% Carragenano	20/20	100
0,5% Carragenano	20/20	100
3% Carragenano + 3% LSA	4/20	20
3% Carragenano + 1% LSA	2/20	10
3% Carragenano + 0,5% LSA	4/20	20
3% Carragenano + 0,25% LSA	5/20	25
3% Carragenano + 0,1% LSA	7/20	35

[0076] La dosis vírica es 100 veces la tasa de infección del 100% y ningún compuesto, aparte del efecto mínimo del carragenano al 3%, ha tenido ningún efecto con una dosis de virus tan alta.

20 **[0077]** Posteriormente, se sometió a ensayo el LSA sin carragenano para evaluar mejor sus propiedades inhibidoras. El LSA se adicionó al espesante inerte, metilcelulosa, para mantener la misma viscosidad que presentan generalmente los productos vaginales (lubricantes, espermicidas y microbicidas). (Datos mostrados a continuación.)

Evaluación del LSA sin carragenano

25 **[0078]**

FORMULACIÓN	Nº RATONES INFECTADOS	% INFECTADOS
	Nº RATONES TOTAL	
3% Carragenano	14/20	70
3% LSA - metilcelulosa	8/20	40
1% LSA - metilcelulosa	8/20	40

30 **[0079]** El LSA demostró ser más eficaz que el carragenano, presentando un mejor bloqueo de la infección por HSV-2 que el carragenano. Sin embargo, la combinación de los dos ingredientes superó el rendimiento de cualquiera de los dos individualmente.

Ejemplo 13. Uso del LSA en Microbicidas

35 **[0080]** El LSA es eficaz como microbicida contra la infección por HSV-2, el VIH y otras STI, con o sin carragenano. El polímero sulfatado LSA es eficaz en la protección de células epiteliales *in vitro* contra la infección por VIH y de ratones contra la infección por HSV-2. El efecto inhibitorio puede observarse con otros virus con envoltura tales como el patógeno humano, virus de la leucemia de células T humanas. Además, las células epiteliales quedan protegidas contra el virus del papiloma humano, el cual no es un virus con envoltura. La eficacia inhibitoria del LSA puede ampliarse así a una gama más amplia de STI. Los resultados de las pruebas se muestran en la fig. 5.

Ejemplo 14. Efectos del Zn-carragenano contra el HSV-2

[0081] Se han llevado a cabo estudios sobre la eficacia del Zn-carragenano contra la infección por HSV-2 *in vitro* e *in*

5 *vivo*. Estudios *in vitro* sometieron a ensayo el efecto de sales de Zn solas en la prevención de la formación de placas en los ensayos de placas de HSV-2. Se observó que las sales de Zn presentan una IC₅₀ a una concentración de 50 mM en la reducción de la formación de placas. Se observó que el Zn-carragenano es significativamente más eficaz que las sales de carragenano o de Zn solas en la prevención de la formación de placas IC₅₀ < 10 µg/ml, o < 25 mM. Los resultados de las pruebas se muestran en la Fig. 6.

10 [0082] El Zn-carragenano también se ha evaluado en el sistema de HSV-2/Ratón (véase Fig. 7). Con el fin de comparar el Zn-carragenano con el espermicida OTC K-Y Plus y la composición de carragenanos K-II/λ, también se usaron dosis de exposición vírica de HSV-2 que van desde 10³ pfu o desde una dosis de infección 50% a 10⁷ pfu ó 1.000 x dosis de infección 100%. Los solicitantes habían determinado que la composición de carragenanos K-II/λ podría proteger algunos animales con una dosis de exposición vírica de 10⁶ pfu o de 100 x dosis de infección 100%. Ningún otro microbicida candidato probado fue capaz de aportar protección con esta dosis vírica. En estudios preliminares se ha observado que el Zn-carragenano protege significativamente a ratones contra la infección por HSV-2 con esta dosis así como con una dosis de exposición vírica de 10⁷ ó de 1.000 x dosis de infección 100%. El hecho de que la adición de Zn a la composición de carragenanos K-II/λ (para formar un complejo) incrementase el nivel de protección antivírica fue de lo más inesperado.

Ejemplo 15. Duración de la actividad de Zn-carragenano

20 [0083] La composición de carragenanos K-II/λ permanece activa en la vagina del ratón durante un período prolongado de tiempo. Se llevaron a cabo experimentos similares para comparar el Zn-carragenano con dos espermicidas OTC, Adventage S y Conceptrol, en cuanto a la duración de la actividad. Se observó que el Zn-carragenano no perdía ningún nivel de actividad en 6 horas, donde el Adventage S y el Conceptrol presentaban una reducción del 50% en la actividad a las 1,5 horas y ya no podían aportar protección cuando se alcanzaron las 3 horas (véase Fig. 8).

Ejemplo 16. Eficacia del Zn-carragenano tras exposición vírica

25 [0084] Un microbicida que pudiera ser eficaz incluso si se administrase tras exposición a un virus ampliaría el uso del producto de manera que incluiría mujeres que no pudieran utilizar el producto hasta después de haberse producido ya las relaciones sexuales, mujeres víctimas de violación. Previamente, los investigadores no han podido identificar un microbicida que pudiera aportar dicha protección. El Zn-carragenano puede aportar protección contra infección por HSV-2 en ratones tras exposición vírica. Tal como demuestran los datos posteriores, el Zn-carragenano es excepcional por cuanto ha demostrado actividad durante hasta 4 horas tras la exposición vírica (véase la Fig. 9). Este hallazgo es notable teniendo en cuenta las observaciones de solicitantes de que la composición de carragenanos K-II/λ no prevenía la infección tras exposición vírica a no ser que se administrase inmediatamente después de la exposición a HSV-2.

Ejemplo 17. Microbicida anticonceptivo para protección dual

40 [0085] La composición de carragenanos K-II/λ permanece en la vagina durante hasta 24 horas, permitiendo una aplicación de una vez al día para la protección contra el VIH y su uso como sistema de aplicación vaginal para una hormona anticonceptiva. La viabilidad de aplicar varios esteroides vaginalmente ha sido investigada minuciosamente con el reciente desarrollo de anillos vaginales anticonceptivos⁴³. Se ha demostrado que esteroides aplicados directamente en la mucosa vaginal son absorbidos rápidamente, y son necesarias solamente dosis muy pequeñas para lograr el efecto anticonceptivo deseado⁴⁸⁻⁵². Además, la aplicación vaginal viene acompañada habitualmente por una disminución de los efectos secundarios no deseables que están asociados con frecuencia a los anticonceptivos orales.

50 [0086] Las formulaciones vaginales de la presente invención proporcionan protección dual en forma de una combinación de microbicida/anticonceptivo que presenta la ventaja adicional de mejorar la motivación del usuario en relación con su cumplimiento. La hormona anticonceptiva NES es un agente anticonceptivo preferido. Esta progestina sintética ha demostrado ser una molécula excepcionalmente potente. Utilizando bioensayos clásicos de medición de la potencia progestacional, la NES ha demostrado ser 100 veces más activa que la progesterona y se requieren solamente cantidades muy pequeñas de NES para suprimir la actividad luteínica. Además, se han llevado a cabo estudios toxicológicos exhaustivos de la NES.

Ejemplo 18. Difusión de la NES desde la mezcla de carragenanos K/λ

60 [0087] Con el fin de que la formulación que contiene la composición de carragenanos K-II/λ y la NES (en lo sucesivo en la presente "CARRA /NES") constituya un anticonceptivo eficaz, es esencial que la NES sea liberada desde el carragenano y absorbida a través de la vagina. Hemos llevado a cabo ensayos *in vitro* para determinar si se libera NES a partir de CARRA/NES.

[0088] Examinamos la difusión de NES a través de una membrana de diálisis con un valor de corte del peso molecular de 1.000. El peso molecular de la NES es 370. La NES se difundía desde la bolsa de diálisis a una velocidad constante, según se midió por HPLC. Los resultados se ilustran en la Fig. 10. Estos resultados demuestran que la NES no está

unida al carragenano. Sin embargo, la velocidad de difusión observada a través de la membrana de diálisis no se puede relacionar con la velocidad de difusión que se observaría en la vagina humana ya que la velocidad de difusión dependía del área superficial de la bolsa de diálisis. Las condiciones en la vagina serían diferentes.

5 **[0089]** También llevamos a cabo un experimento que involucraba la centrifugación de CARRA/NES a través de un conjunto de filtro y tubo de centrífuga Ultrafree-15 a 2.000 g durante 99 minutos, para calcular el porcentaje de NES liberado. El filtro de centrífuga es un dispositivo que encaja en un tubo de centrífuga. El dispositivo tiene un filtro plegado en la parte inferior, que permite que moléculas con un peso molecular MW por debajo de 500 pasen a través del mismo. Usando este dispositivo, más del 98% de la NES adicionada se recuperó en el filtrado. Este experimento confirma que la NES no se une al carragenano.

Ejemplo 19. CARRA/NES (velocidades de liberación)

CARRA/NES

15 **[0090]** Se formularon soluciones de concentraciones crecientes de NES en la composición de carragenanos K-II/λ para establecer la compatibilidad de los dos compuestos. Una concentración de 500 μg/ml de NES en la composición de carragenanos K-II/λ conservaba las propiedades reológicas, según se midió por el pH, la viscosidad, la homogeneidad y el aspecto visual, y presentaba conservación de la fuerza, según se midió por el ensayo de HSV-2/ratón. Esta concentración de NES es 40 veces mayor que la concentración prevista necesaria para una formulación de alta dosis de 100 pg/ml.

20 **[0091]** La difusión de NES desde CARRA/NES se investigó por dos métodos diferentes, diálisis de membrana y centrifugación Ultrafree-15. En los experimentos de diálisis de membrana, el valor de corte de la membrana es 1.000 y la difusión de NES se midió por HPLC. Los resultados indican que la NES no está unida al carragenano cargado negativamente y, aunque la velocidad de difusión a través de una membrana de diálisis es diferente de la absorción sistémica in vivo, la difusión se produce de una manera que depende del tiempo. En los experimentos de centrifugación Ultrafree-15, se usó un conjunto de filtro y tubo de centrífuga Millipore, Ultrafree-15, que permite el paso, a través del mismo, de moléculas de un peso molecular MW < 500; el peso molecular MW de la NES es 370. El uso de esta técnica demostró que se recuperó el 98,6% de la NES.

Ejemplo 20. Zn/Carragenano/MIV-150

35 **[0092]** La combinación de los carragenanos más preferidos de la presente invención junto con acetato de cinc como metal hidrosoluble y MIV-150 como NNRTI se comparó con combinaciones de cinc/carragenano (PC-707), MIV-150/carragenano (PC-815), y carragenano (Carraguard®). En particular, cuando los animales se expusieron a SHIV-RT 8 horas ó 24 horas después de la última dosis de cada uno de estos geles, el PC-707 y el PC-815 por separado bloquearon la infección vaginal de SHIV-RT a aproximadamente el mismo nivel que el Carraguard® (con un valor p mayor de 0,05) simultáneamente en los dos instantes de tiempo el PC-1005 bloqueó la infección vaginal de SHIV-RT mejor que estos compuestos (con un valor p inferior a 0,03). Por lo tanto, aunque el PC-707 y el PC-815 sí que bloquearon la infección vaginal de SHIV-RT en cierta medida durante hasta 24 horas, no era previsible que la combinación de acetato de cinc, carragenanos y MIV-150 bloquease totalmente la infección vaginal de SHIV-RT durante hasta 24 horas.

45 Los procedimientos experimentales se llevaron a cabo de la manera siguiente:

50 **[0093]** Un recipiente de mezclado de vidrio de 700 ml se cargó con 1,5 gramos de acetato de cinc dihidratado, 15,0 gramos de los carragenanos (en este caso 95% de carragenano lambda y 5% de carragenano kappa) y 300,3 gramos de agua purificada estéril. El contenido se mezcló con un agitador superior a 300 rpm durante tres horas a temperatura ambiente. Por separado, un matraz Erlenmeyer de 250 ml se cargó con 1,0 gramo de metil parabeno y 150,9 gramos de agua purificada estéril. El matraz Erlenmeyer se calentó a 60 °C con agitación para obtener una solución clara, y el contenido del matraz se adicionó inmediatamente a la mezcla de agua y cinc-carragenano contenida en el recipiente de mezclado de 700 ml. La mezcla se agitó durante dos horas a temperatura ambiente, momento en el cual, al contenido del recipiente de mezclado de 700 ml, se adicionaron 5 ml de una solución madre de MIV-150/DMSO preparada resolviendo 18,5 mg de MIV-150 en 10 ml de dimetil sulfóxido. Esta mezcla se agitó a continuación a 300 rpm durante 55 35 minutos a temperatura ambiente, y se adicionaron entonces 26 gramos de agua purificada estéril al recipiente de mezclado y el contenido se agitó durante 30 minutos a temperatura ambiente.

60 **[0094]** Se inyectó Depo-Provera a macacos y tres semanas más tarde se les aplicó 2 ml por día del gel preparado según se ha descrito anteriormente, durante dos semanas antes de exponerlos a 1.000 TCID₅₀ de SHIV-RT en los momentos indicados después de que se aplicase el último gel. El número de animales infectados que se expone en la siguiente Tabla 1 refleja el número con viremia típica (copias de ARN del virus SIV en plasma).

Tabla 1. La aplicación repetida de PC-1005 protege contra la infección vaginal por SHIV-RT durante hasta 24 h

Microbicida#	Exposición tras aplicación de último gel	Número infectados/Total	Porcentaje infectados	Significación^ (valor p; MC vs prueba)	Significación^ (valor p; Carr vs prueba)
MC	4 h, 8 h, 24 h	12/14	85,71%		
PC-1005	4 h	0/7	0%	<0,0003	
Carraguard	8 h	5/7	71,43%	<0,6	
PC-815	8 h	2/7	28,57%	<0,02	<0,3
PC-707	8 h	1/7	14,29%	<0,004	<0,2
PC-1005	8 h	0/7	0%	<0,0003	<0,03
Carraguard	24 h	4/7	57,1%	<0,3	
PC-815	24 h	4/7	57,1%	<0,3	
PC-707	24 h	2/7	28,57%	<0,02	<0,3
PC-1005	24 h	0/7	0%	<0,0003	<0,03

MC = Placero de metil celulosa; PC-707 = Carraguard + 0,3% acetato de cinc;
PC-815 = Carraguard + MIV-150 50 µM; PC-1005 = Carraguard + 0,3% acetato de cinc + MIV-150 50 µM
^Calculada utilizando las pruebas exactas de Fisher.

Referencias

[0095]

5

1. Butini, L. et al. *Intercellular adhesion molecules (ICAM)-1, ICAM-2 and ICAM-3 function as counter receptors for lymphocyte function-associated molecule 1 in human immunodeficiency virus-mediated syncytia formation.* *Eur J Immunol* 24, 2191-2195 (1994).

10

2. *Food and Drug Administration. GRAS (Generally recognized as safe) food ingredients: Carrageenan.* FDA Publications PB-221 206, (1972).

3. Benitz, K. F., Abraham, R., Golberg, L. & Coulston, F. *Carrageenan: an ulcerogenic agent.* *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 22, 282 (1972).

15

4. Fox, M. R. S. & Jacobs, R. M. *Metal Ions in Biological Systems.*, págs. 214-248 (Marcel Decker, Inc., 1986).

5. Luscombe, D. K & Nicholls, P. J. *Acute and subacute oral toxicity of AHR-2438B, a purified sodium lignosulphonate in rats.* *Fd. Cosmet. Toxicol.* 11, 229-237 (1973).

20

6. Naess, B. *The effect of microbial and animal proteinases on peptide- and protein lignosulphonic acid complexes in agar gel.* *Acta Vet. Scand.* 12, 592-600. 1971. Tipo de referencia: Extracto

7. Samman, S. & Roberts, D. C. K. *The effect of zinc supplements on plasma zinc and copper levels and the reported symptoms in healthy volunteers.* *Med. J. Australia* 146, 246-249 (1987).

25

8. U.S. EPA. *Health Effects Assessment of for Zinc (and Compounds).* EPA/540-1-96-048. 1984. Washington, D.C., US Environmental Protection Agency, Office of Research and Development. Tipo de referencia: Archivo de datos

9. Walden, J. T. & Derreth, D. *FDA New Release 72/55.* FDA Publications 72/55, (1972).

10. Walker, A. P. et al. *Test guidelines for the assessment of skin tolerance of potentially irritant cosmetic ingredients in man.* *Fd. Chem. Toxic.* 3.5, 1099-1106 (1997).

30

11. Weiner, M. L. *Intestinal transport of some macromolecules in food.* *Fd. Chem. Toxic.* 26, 10, 867-880 (1988).

12. *Food and Drug Administration. Study of mutagenic effects of calcium carrageenan (FDA n.º. 71-5).* FDA Publications PB-221 820, (1972).

13. Elias, C. J. et al. *Colposcopic Evaluation of a Vaginal Gel Formulation of iota-Carrageenan.* *Contraception* 56, 387-389 (1997).

14. Lines, A. D. *Value of the K+ Salt of Carrageenan as an Agar Substitute in Routine Bacteriological Media.* *Applied and Environmental Microbiology* 34, 637-639 (1977).

15. Phillips, D. M. & Tan, X. *Mechanism of trophoblast infection by HIV.* *AIDS Res Hum Retroviruses* 9, 1697-1705 (1992).

35

16. Baba, M. et al. *Pentosan polysulfate, a sulfated oligosaccharide, is a potent and selective anti-HIV agent in vitro.* *Antiviral Res* 9, 335-343 (1988).

17. Baba, M. et al. *Mechanism of inhibitory effect of dextran sulfate and heparin on replication of human immunodeficiency virus in vitro.* *Proc Natl Acad Sci* 85, 6132-6126 (1988).

18. Pearce-Pratt, R. & Phillips, D. M. *Studies of adhesion of lymphocytic cells: Implications for sexual transmission of human immunodeficiency virus.* *Biol Reprod* 48, 431-445 (1993).

40

19. Pearce-Pratt, R. & Phillips, D. M. *Sulfated polysaccharides inhibit lymphocyte-to-epithelial transmission of HIV-1.* *Biol Reprod* 54, 173-182 (1996).

20. Maguire, R. A., Zacharopoulos, V. R. & Phillips, D. M. *Carrageenan-N9 Spermicides for Preventing Pregnancy and Sexually Transmitted Infections*. *Sex Transm Dis* 25, 494-500 (1998).
21. Phillips, D. M. *Perspectives in Drug Discovery and Design*. Fantini, J. & Sabatier, J. M. (eds.), págs. 213-223 (1996).
- 5 22. Zacharopoulos, V. R. & Phillips, D. M. *Vaginal formulations of carrageenan protect mice from herpes simplex virus infection*. *Clin. Diag. Lab. Immunol.* 4, 465-468 (1997).
23. Phillips, D. M. & Zacharopoulos, V. R. *Nonoxynol-9 Enhances Rectal Infection by Herpes Simplex Virus in Mice*. *Contraception* 57, 341-348 (1998).
24. Masuner, C. et al. *Dendritic cells route Human Immunodeficiency Virus to lymph nodes after vaginal or intravenous administration to mice*. *J Virol* 72, 7822-7829 (1998).
- 10 25. Masuner, C. et al. *Dendritic Cells in Fundamental and Clinical Immunology*. Ricciardi-Castagnoli (ed.), págs. 411-414 (Plenum Press, Nueva York, 1997).
26. Anderson, D. J. *Mechanisms of HIV-1 transmission via semen*. *J. NIH Res.* 4, 104-111 (1992).
27. Levy, J. A. *The transmission of AIDS: the case of the infected cell*. *JAMA* 259, 3037-3038 (1988).
- 15 28. Zacharopoulos, V. R., Perotti, M. E. & Phillips, D. M. *A role for cell migration in the sexual transmission of HIV?* *Current Biol.* 7, 534-537 (1997).
29. Howett M. K., K. J. W. C. K. D. *Human xenografts. A model system for human papillomavirus infection*. *Intervir.* 31, 109-115 (1990).
30. Jerse, A. E. *Experimental gonococcal genital tract infection and opacity protein expression in estradio-treat mice*. *Infect Immun* 67, 5699-5708 (1999).
31. Kolopp, M. et al. *Predictive value of an in vitro model for skin irritation (SkinEthic) applied to the testing of topical vehicles for SDZ ASM 981*. *Proc. Clin. Dermatol. 2000 Singapore* 141. 1998. Tipo de referencia: Extracto
32. Mitsuya, H. et al. *Dextran sulfate suppression of viruses in the HIV family: inhibition of virion binding to CD4+ cells*. *Science* 240, 646-649 (1988).
- 25 33. Suzuki H, T. T. I. K. Y. S. Y. N. T. S. *Lignosulfonate, a water-solubilized lignin from the waste liquor of the pulping process, inhibits the infectivity and cytopathic effects of Human Immunodeficiency Virus in Vitro*. *Agric Bid Chem* 53, 3369-3372 (1989).
34. Baba, M., Schols, D., Pauwels, R., Nakashima, H. & De Clercq, E. *Sulfated polysaccharides as potent inhibitors of HIV-induced syncytium formation: a new strategy towards ADS chemotherapy*. *JAIDS* 3, 493-499 (1990).
- 30 35. NRC (National Research Council). *Recommended Dietary Allowances*. (National Academy Press, Washington D.C., 1989).
36. Nicklin, S. & Miller, K *Effect of orally administered food-grade carrageenans on antibody-mediated and cell-mediated immunity in the inbred rat*. *Fd. Chem. Toxic.* 22, 8, 615-621 (1984).
37. CEAMSA (Compañía Española de Algas Marinas, S. A. *Technical Information 1999-2000*. 1999. South America. Tipo de referencia: Archivo de datos
- 35 38. ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry). *Toxicological Profile for Zinc*. Agency for Toxic Substances and Disease Registry, U. S. Public Health Service, Atlanta, Ga. 121 pp (2001).
39. Haraguchi, Y., Sakurai, H., Hussain, S., Anner, B. & Hoshino, H. *Inhibition of HIV-1 Infection by Zinc Group Metal Compounds*. *Antiviral Res* 43, 123-133 (1999).
- 40 40. Sergio, W. *Zinc Salts that may be Effective Against the ADS Virus HIV*. *Medical Hypotheses* 26, 253 (1988).
41. Arens, M. & Travis, S. *Zinc Salts Inactivate Clinical Isolates of Herpes Simplex Virus In Vitro*. *J Clin Microbiol* 38, 1758-1762 (2000).
42. Tennican, P., Carl, G., Frey, J., Thies, C. & Chvapil, M. *Topical Zinc in the Treatment of Mice Infected Intravaginally with Herpes Genitalis Virus*. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 164, 593-597 (1980).
- 45 43. Alvarez-Sanchez, F., Brache, V., Jackanicz, T. & Faundes, A. *Evaluation of four different contraceptive vaginal rings: steroid serum levels, luteal activity, bleeding control and lipid profiles*. *Contraception* 46, 387-397 (1992).
44. Mishell, D. J., Lumkin, M. & Jackanicz, T. *Initial clinical studies of intravaginal rings containing norethindrone and norgestrel*. *Contraception* 12, 253 (1975).
- 50 45. Ballagh, S., Mishell, D., Jackanicz, T., Lacarra, M. & Eggena, P. *Dose-finding study of a contraceptive ring releasing norethindrone acetate/ethinyl-estradiol*. *Contraception* 50, 535-549 (1994).
46. Sivin, I., Mishell, D. J., Victor, A. & et al. *A multicenter study of levonorgestrel/estradiol contraceptive vaginal rings I—use of effectiveness*. *Contraception* 24, 341-358 (1981).
47. Sivin, I., Mishell, D. J., Victor, A. & et al. *A multicenter study of levonorgestrel/estradiol contraceptive vaginal rings II—subjective and objective measures of effects. An international comparative trial*. *Contraception* 24, 359-376 (2001).
- 55 48. Fanchin R et al. *Transvaginal administration of progesterone: dose-response data support a first uterine pass effect*. *Obstet Gynecol* 90, 396-401 (1997).
49. Cicinelli, E., Cignarelli, M., Sabatelli, S. & et al. *Plasma concentrations of progesterone are higher in the uterine artery than in the radial artery after vaginal administration of micronized progesterone in an oil-based solution to postmenopausal women*. *Fertil Steril* 69, 471-473 (1998).
- 60 50. Rigg, L., Milanese, B., Villanueva & Yen, S. *Efficacy of intravaginal and intranasal administration of micronized estradiol-17B*. *JCE&M* 45, 1261-1264 (1977).
51. Martin, P. et al. *Estradiol, estrone, and gonadotropin levels after use of vaginal estradiol*. *Obstet & Gyn* 63, 441-

444 (1984).

52. Schiff, I., Tulchinsky, D. & Yan, K. *Vaginal absorption of esterone and 17B-estradiol. Fertil Steril* 28, 1063-1066 (1977).

53. Kumar, N., Koide, S., Tsong Y & Sundaram, K. *Nestorone: a progestin with a unique pharmacologic profile. Steroid* 65, 629-636 (2000).

54. Odland, V., Lithell, H., Selinus, I. & Vessby, B. *Unaltered lipoprotein and carbohydrate metabolism during treatment with contraceptive subdermal implants containing 5T1435. Contraception* 31, 130 (1985).

55. Robins, A. & Bardin, C. *Nestorone Progestin—the ideal progestin for use in controlled release delivery systems. Ann N Y Acad Sci* 828, 38-46 (1997).

56. Massai, R., Diaz 5, Jackanicz, T. & Croxatto R B. *Vaginal rings for contraception in lactating women. Steroid* 65, 703-707 (2000).

57. Lahteenmaki P L A, Daz 5, Miranda P & Croxatto K B. *Milk and plasma concentrations of the progestin ST 1435 in women treated parenterally with ST 1435. Contraception* 42, 555-562 (1990).

58. *World Health Organization. Microdose intravaginal levonorgestrel contraception: a multicentered clinical trial I. Contraception* 41, 105-124 (1990).

59. Yen, S. *Reproductive Endocrinology*. Yen S S C and Jaffe R B (ed.), págs. 200-236 (W.B. Saunders Co, Philadelphia, 1986).

60. Henzl, M. *Reproductive Endocrinology*. Yen S S C and Jaffe R B (ed.), págs. 243-682 (W.B. Saunders Co., Philadelphia, 1986).

61. Brache V. et al. *Ovarian function during use of vaginal rings delivering three different doses of Nestorone. Contraception*. 2001. Tipo de referencia: En prensa

62. Fraser I et al. *Vaginal epithelial surface appearances in women using vaginal rings for contraception. Contraception* 61, 13 1-138 (2000).

63. Couch, R. C. *A 12-month systemic toxicity study of subdermal implant for 5T1435 in female cynomolous monkeys. New Mexico Regional Primate Research Laboratory, Mew Mexico State University Holloman AFB New Mexico. Population Council Files*. 1992. Tipo de referencia: trabajo no publicado

64. Lahteenmaki, P., Weiner, E., Johansson, E. & Luukkainen, T. *Contraception with subcutaneous capsules containing 5T1435. Pituitary and ovarian function and plasma levels of 5t1435. Contraception* 23, 63-75 (1981).

65. Lahteenmaki P, Weiner E, Johansson E & Luukkainen T. *Pituitary and ovarian function during contraception with one subcutaneous implant releasing a progestin, 5T1435. Contraception* 25, 299-306 (1982).

66. Haukkamaa, M., Laurikka-Routti, M. & Heikinheimo, O. *Transdermal absorption of the progestin 5T1435: Therapeutic serum steroid concentrations and high excretion of the steroid in saliva. Contraception* 44, 269-276 (1991).

67. Laurikka-Routti, M., Haukkamaa, M. & Lahteenmaki, P. *Suppression of ovarian function with the transdermally given synthetic progestin 5T1435. Fertil Steril* 58, 680-684 (1992).

Aplicabilidad industrial

[0096] La presente invención proporciona composiciones antimicrobianas que se pueden utilizar específicamente para la inhibición antimicrobiana prolongada con humanos, preferentemente para mujeres por administración vaginal. Por ello, son específicamente útiles para inhibir la transmisión de infecciones de transmisión sexual.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Composición antimicrobiana acuosa que comprende una cantidad eficaz de un agente antimicrobiano que comprende carragenanos los cuales son carragenano lambda en una cantidad de por lo menos aproximadamente el 50% en peso seco de dichos carragenanos, siendo el resto de dichos carragenanos por lo menos un carragenano no lambda, y una sal metálica hidrosoluble fisiológicamente aceptable, y un agente antirretroviral seleccionado del grupo compuesto por inhibidores de la transcriptasa inversa no nucleósidos e inhibidores de la transcriptasa inversa nucleósidos.
- 10 2. Composición antimicrobiana de la reivindicación 1, que incluye un agente controlador del pH fisiológicamente aceptable.
3. Composición antimicrobiana de la reivindicación 1, que incluye un conservante fisiológicamente aceptable.
- 15 4. Composición antimicrobiana de la reivindicación 2 en donde dicho agente controlador del pH fisiológicamente aceptable se selecciona del grupo compuesto por tampones de acetato, citrato y lactato.
- 20 5. Composición antimicrobiana de la reivindicación 4 en donde dicho tampón de acetato comprende una mezcla de ácido acético y acetato de sodio, comprendiendo dicho tampón de citrato una mezcla de ácido cítrico y citrato de sodio y comprendiendo dicho tampón de lactato una mezcla de ácido láctico y lactato de sodio.
- 25 6. Composición antimicrobiana de la reivindicación 3 en donde dicho conservante fisiológicamente aceptable comprende metil parabeno.
7. Composición antimicrobiana de la reivindicación 1 en donde dicho agente antirretroviral comprende un inhibidor de la transcriptasa inversa no nucleósido.
- 30 8. Composición antimicrobiana de la reivindicación 7 en donde dicho inhibidor de la transcriptasa inversa no nucleósido comprende MIV-150.
9. Composición antimicrobiana de la reivindicación 8 en donde dicho MIV-150 está presente en cantidades de 5 μ M a 5.000 μ M, preferentemente de 20 μ M a 250 μ M.
- 35 10. Composición antimicrobiana de la reivindicación 1 en donde dicha cantidad eficaz de dicho agente antimicrobiano es del 1% al 5% en peso total de dicha composición, preferentemente el 3% en peso total de dicha composición.
- 40 11. Composición antimicrobiana de la reivindicación 1, que tiene un pH de 3,5 a 8,5.
12. Composición antimicrobiana de la reivindicación 11 en donde el pH es de 6,8 a 7,2.
- 45 13. Composición antimicrobiana de la reivindicación 1 en donde dicho metal es cinc, cobre o plata, preferentemente una sal metálica seleccionada de acetato de cinc o lactato de cinc.
14. Composición antimicrobiana de la reivindicación 1 en donde dicha sal metálica está presente en una cantidad desde el 0,03% al 1,5% sobre la base del peso total de dicha composición.
- 50 15. Composición antimicrobiana de la reivindicación 14 en donde dicha sal metálica está presente en una cantidad desde el 0,3% al 1,0% sobre la base del peso total de dicha composición.

FIG. 1

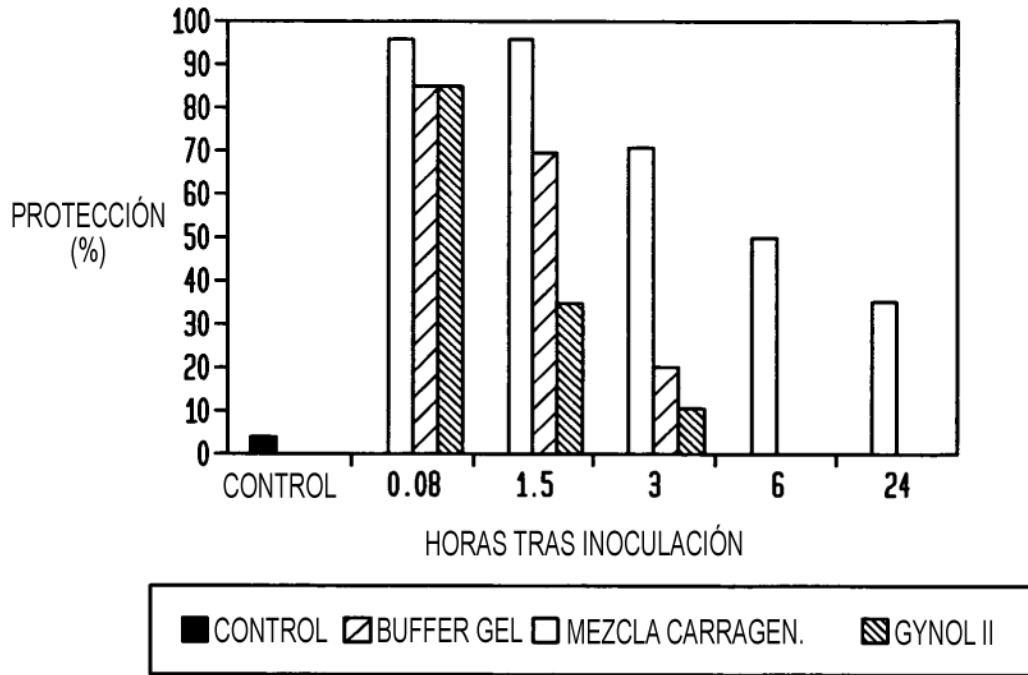
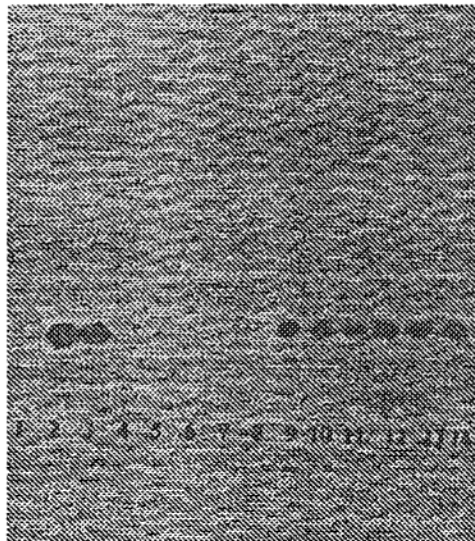


FIG. 2



TRATAMIENTO	PT-PCR +/TOTAL	PORCENTAJE POSITIVO
PBS	16/22	72%
METIL CELULOSA	7/10	70%
MEZCLA CARRAGENANOS	2/22	9%

FIG. 3

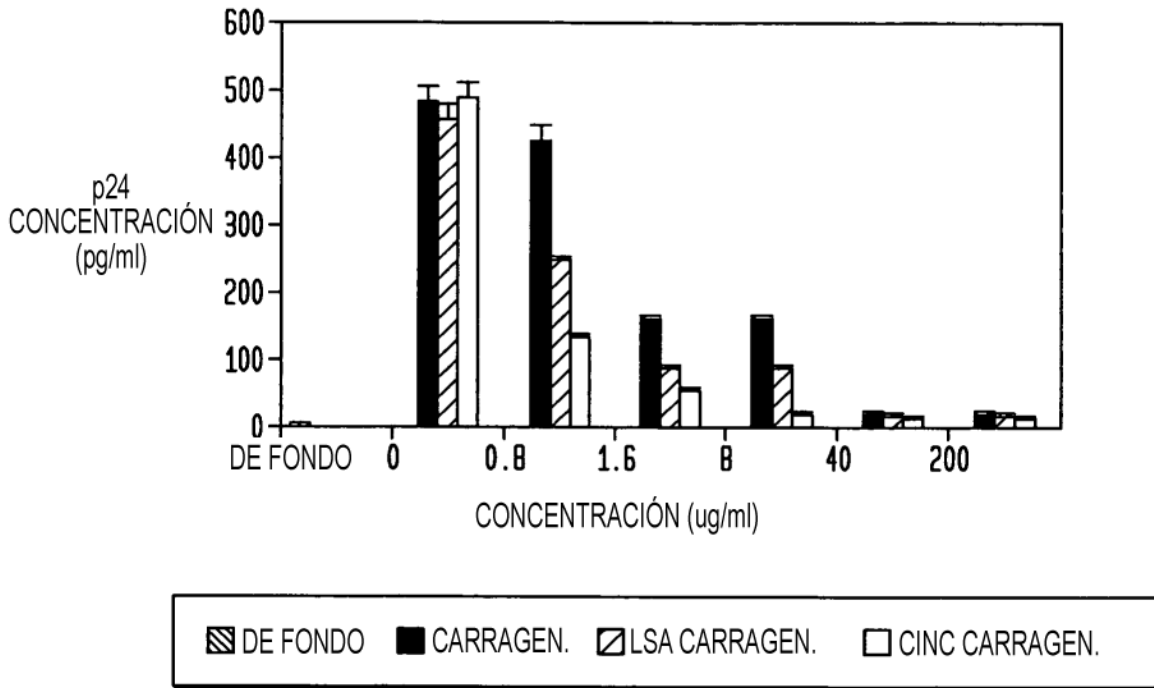


FIG. 4

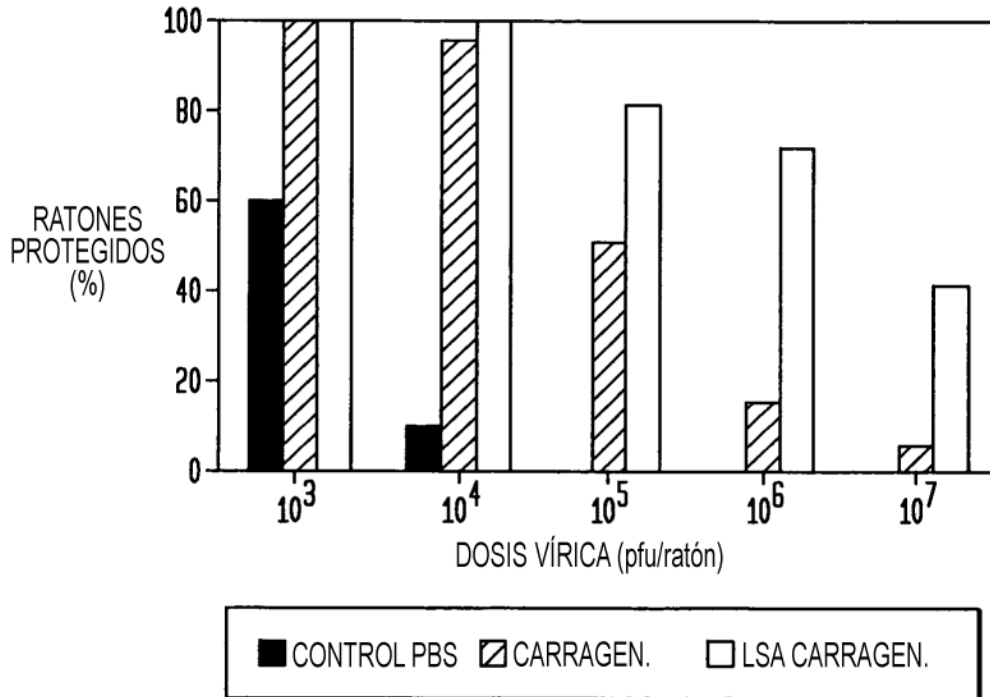


FIG. 5

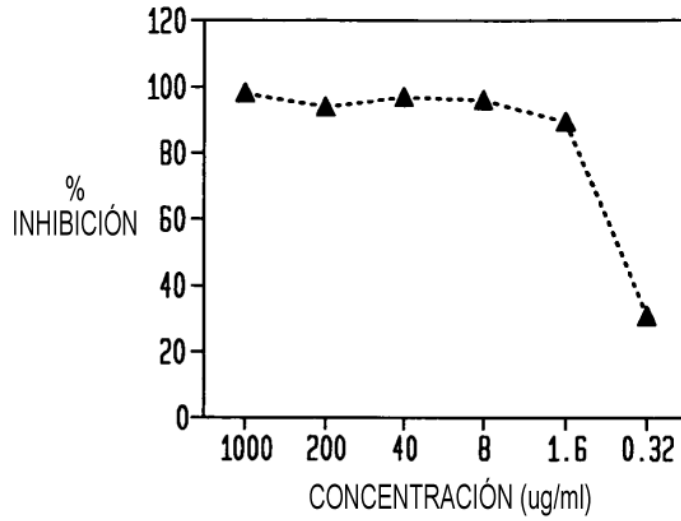


FIG. 6

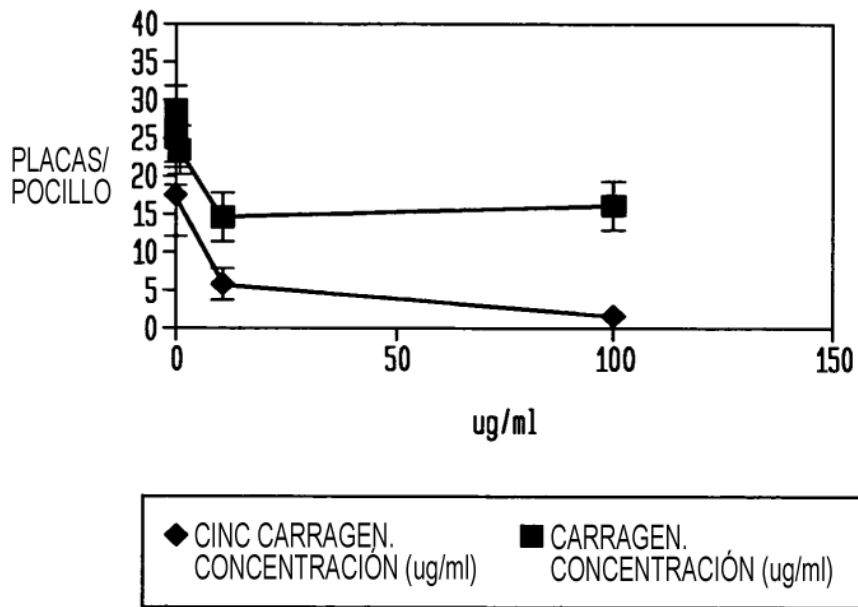


FIG. 7

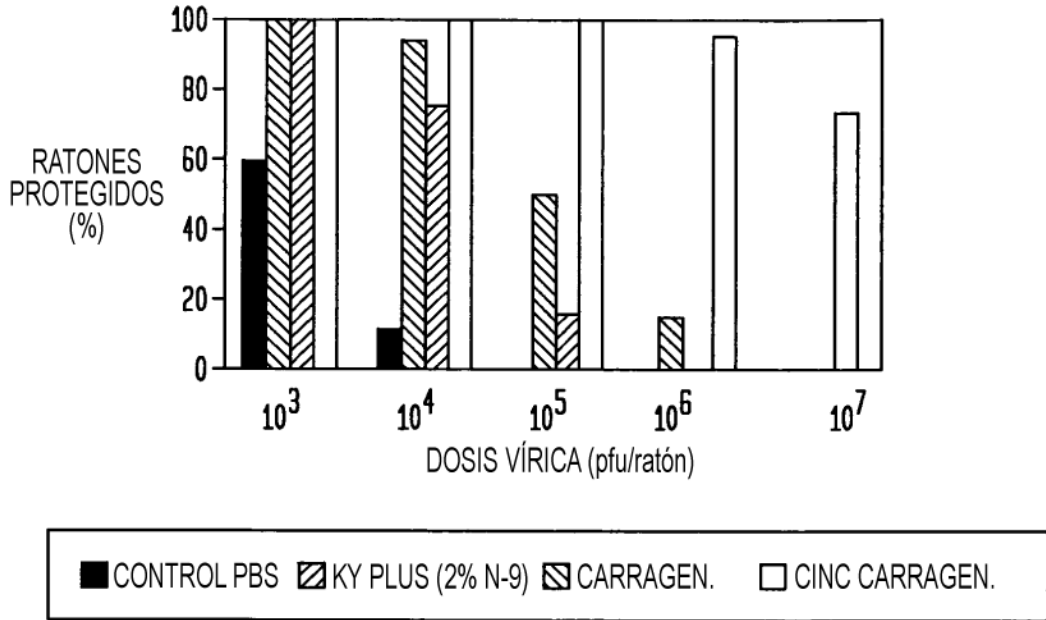


FIG. 8

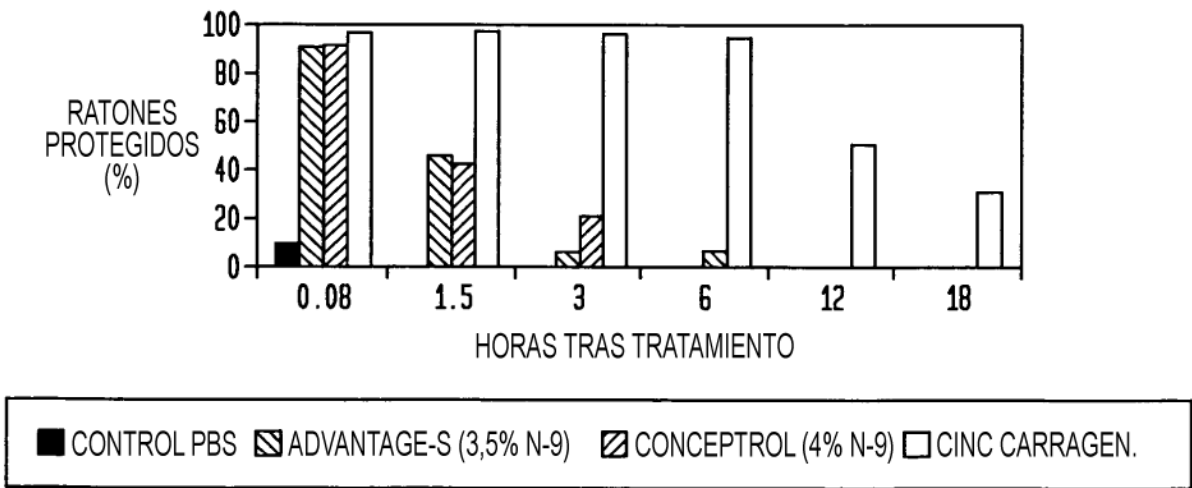


FIG. 9

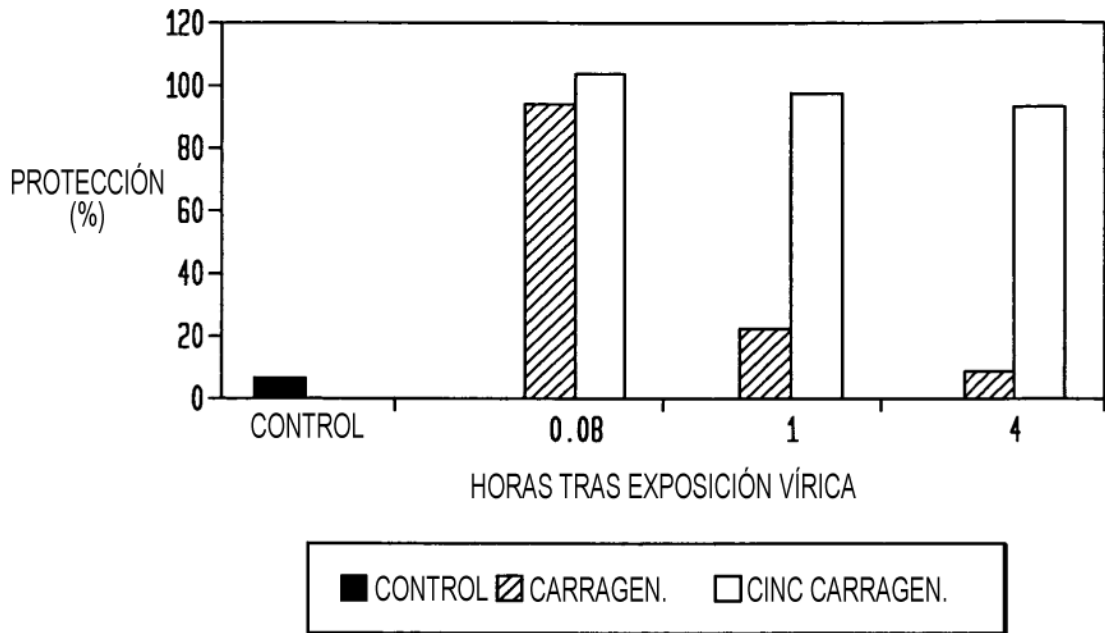


FIG. 10

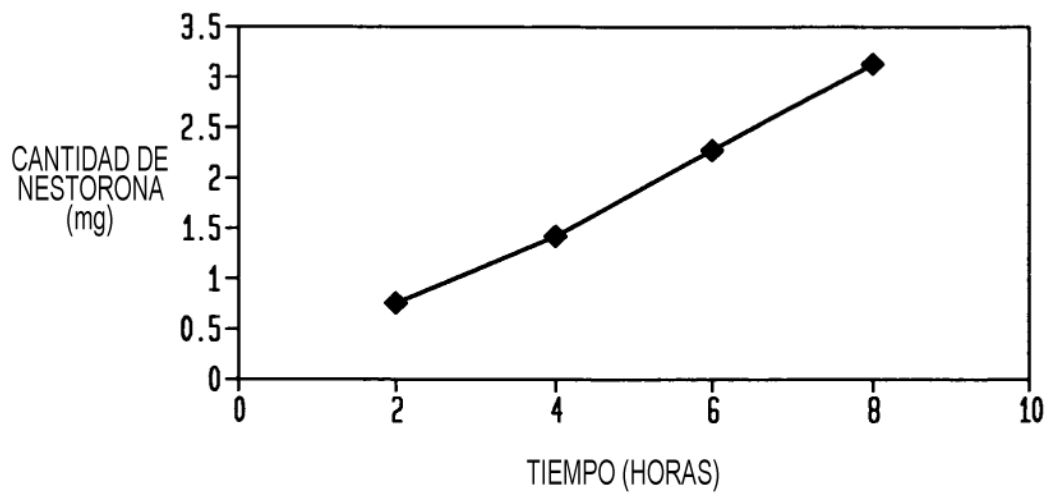


FIG. 11

