



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 285 765**

51 Int. Cl.:  
**A01N 33/12** (2006.01)  
**A61K 31/14** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Número de solicitud europea: **98913086 .9**  
86 Fecha de presentación : **24.03.1998**  
87 Número de publicación de la solicitud: **0980203**  
87 Fecha de publicación de la solicitud: **23.02.2000**

54 Título: **Prevención antimicrobiana y tratamiento del virus de la inmunodeficiencia humana y de otras enfermedades infecciosas.**

30 Prioridad: **26.03.1997 US 824041**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**16.11.2007**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**16.11.2007**

73 Titular/es: **Meryl Squires**  
**2 Gooselake Drive**  
**Barrington Hills, Illinois 60010, US**

72 Inventor/es: **Squires, Meryl**

74 Agente: **Gil Vega, Víctor**

ES 2 285 765 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

Prevención antimicrobiana y tratamiento del virus de la inmunodeficiencia humana y de otras enfermedades infecciosas.

5 **Antecedentes de la invención**

La presente invención se refiere al virus de la inmunodeficiencia humana, y en particular, a tratamientos médicos y a la prevención del virus de la inmunodeficiencia humana y de otras infecciones microbianas.

10 Se estima que existen en la actualidad aproximadamente 22 millones de personas infectadas por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) en todo el mundo. La mayor parte de los nuevos casos de VIH tienen su origen en África y el Caribe. La progresión típica de la infección por VIH se divide en distintas etapas: 1) transmisión vírica; 2) síndrome retrovítico agudo; 3) seroconversión; 4) período clínico latente con o sin linfadenopatía persistente generalizada (PGL); 5) infección por VIH sintomática temprana, anteriormente conocida como complejo asociado al SIDA o ARC y más recientemente denominada "síntomas B" según la clasificación CDC de 1993); 6) síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) condición del indicador de SIDA según los criterios CDC de 1987 y los criterios CDC revisados de 1993, que incluyen un recuento celular de CD4 < 200/mm<sup>3</sup>); y 7) infección avanzada por VIH caracterizada por un recuento celular de CD4 < 50/mm<sup>3</sup>. Las células CD4 son linfocitos que constituyen el objetivo del VIH. En 1993, el CDC cambió la definición del SIDA para incluir a aquellos pacientes con un recuento de CD4 < 200/mm<sup>3</sup>; esta definición incluye a todos los pacientes en las etapas 4-7 sin tener en cuenta los síntomas.

25 El síndrome retrovítico agudo inicial viene acompañado de un descenso brusco de los recuentos celulares de CD4, de viremia en plasma altamente cultivable y de altas concentraciones plasmáticas de ARN de VIH. Con el desarrollo de una respuesta de los linfocitos T citotóxicos (CPL) se produce la recuperación clínica y se reduce el alto nivel de viremia del ARN de VIH en plasma. El recuento celular de CD4 disminuye gradualmente durante varios años y luego muestra una reducción acelerada 1,5-2 años antes de un diagnóstico definido del SIDA. Las concentraciones de ARN de VIH en plasma son relativamente estables hasta que el VIH se encuentra en una etapa tardía, cuando el recuento de CD4 es < 200/mm<sup>3</sup>, y hasta que el curso clínico se caracteriza por infecciones, determinados tumores, degeneración y complicaciones neurológicas. En general, aproximadamente el 10% de los pacientes desarrolla un diagnóstico definido de SIDA antes de que el recuento de CD4 disminuya a 200/mm<sup>3</sup>. El tiempo medio actual para una complicación en el SIDA declarado después de que el recuento de CDS sea de 200/mm<sup>3</sup> es de 12-18 meses. En ausencia de una terapia dirigida contra el VIH o de profilaxis PCP, el tiempo medio desde la transmisión vírica hasta una diagnóstico declarado de SIDA es de aproximadamente 10 años, y la supervivencia después de una complicación de SIDA definido era anteriormente de aproximadamente un año.

40 La secuencia entera de eventos en un paciente medio, en ausencia de tratamiento contra el VIH dirigido, es de aproximadamente diez años desde la seroconversión hasta la muerte. Se sabe que el tiempo medio desde la seroconversión al VIH hasta el SIDA era de 7 años en caso de receptores de transfusiones, de 10 años para los hemofílicos, de 10 años para los usuarios de drogas y de 8-12 años para los homosexuales. Parece que las velocidades de progresión son similares según el sexo, la raza y el nivel de riesgo si se ajusta para la calidad de la atención. Para los pacientes de 16-24 años en seroconversión el tiempo medio era de 15 años; para los mayores de 35 años en seroconversión era de 6 años.

45 La infección por VIH puede adquirirse en las relaciones sexuales, por transfusiones de medicamentos con sangre contaminada, por drogadictos con agujas infectadas o puede tratarse de una transmisión perinatal. Se sabe que la infección sintomática primaria por VIH, también denominada síndrome retrovítico agudo, tenía una frecuencia del 50-90% en las categorías de riesgo anteriores. Este síndrome ha sido observado también en siete de cada ocho trabajadores sanitarios con transmisión de VIH después de una exposición en el trabajo. El tiempo desde la exposición hasta el inicio de los síntomas normalmente es de 2-4 semanas, pero la incubación puede durar tanto como seis semanas. Los síntomas típicos son fiebre, adenopatía, faringitis, sarpullido que incluye rash maculopapular eritematoso con lesiones de 5-10 mm en la cara y el tronco, a veces en las extremidades incluidas las palmas y plantas o ulceración mucocutánea en la boca, esófago o genitales, mialgias o artralgias, diarrea, dolor de cabeza, hepatoesplenomegalia, candidiasis, náuseas y vómitos. Los síntomas neurológicos puede incluir meningoencefalitis, neuropatía periférica, parálisis facial, síndrome de Guillain-Barré, neuritis braquial, radiculopatía, deterioro cognitivo y psicosis. Generalmente la enfermedad aguda viene acompañada de viremia de VIH de alto nivel con antigenemia p24, viremia en plasma y altas concentraciones de VIH en células mononucleares de sangre periférica.

60 La respuesta del linfocito T citotóxico (CTL) es la primera y generalmente precede a la respuesta humoral durante varias semanas. La respuesta del CTL viene acompañada de una disminución logarítmica de 3-5 en la concentración de VIH en sangre periférica. El alto nivel de viremia durante esta fase aguda de la enfermedad puede estar asociado a la diseminación del virus hacia el SNC y el tejido linfático. El tejido linfático constituye la principal reserva de carga y replicación del VIH. La infección de órganos no linfoides con altos niveles de VIH parece ocurrir en las etapas tardías del VIH.

65 La presencia de otros síntomas diferentes a la seroconversión asintomática así como una enfermedad prolongada durante más de 14 días parece tener relación con una progresión más rápida hacia el SIDA. La seroconversión con serología VIH positiva tiene lugar a las 6-12 semanas después de una transmisión, por ejemplo por transfusión o

## ES 2 285 765 T3

por una herida con una aguja en un trabajador sanitario. El intervalo medio es de 63 días. La respuesta del CTL está asociada a una fuerte reducción de la carga vírica cuantitativa en sangre, la recuperación clínica del síndrome retrovítico agudo y la vuelta del recuento celular de CD4 a niveles más altos, que a menudo se encuentran el rango normal para la mayoría de los laboratorios.

5

El paciente de VIH se convierte clínicamente en asintomático y no suele dar resultados en un examen físico, excepto para la Linfadenopatía Persistente Generalizada (PGL) que comprende nódulos linfáticos aumentados. Los estudios de los nódulos linfáticos muestran altas concentraciones de VIH como virus extracelular atrapado en procesos de células dendríticas foliculares dentro de los centros germinales y como virus intracelular, predominantemente en forma latente. El tejido linfático sirve de reserva principal para el VIH, las células dendríticas foliculares filtran y atrapan los virus libres y las células CD4 infectadas, siendo la carga vírica en las células mononucleares de la sangre periférica relativamente baja. Con una enfermedad progresiva, la configuración del nódulo linfático está alterada por el VIH.

10

Estudios virales en pacientes con infección asintomática por VIH muestran altas velocidades de replicación del VIH, produciendo un promedio de  $10^9$  viriones al día. La replicación vírica es acompañada de una destrucción masiva y de la producción de  $10^9$  células CD4 al día. La renovación de las células CD4 representa un 6-7% de las células CD4 totales del cuerpo de modo que el suministro total se recupera cada 15 días. El SIDA ha sido considerado como una consecuencia de la replicación continua de alto nivel del VIH-1, que conduce al virus y a la terminación inmune mediada de los linfocitos CD4.

15

La infección avanzada por VIH ocurre en pacientes con un recuento celular de  $CD4 < 50/mm^3$ . Estos pacientes tienen una esperanza de vida limitada, con una supervivencia media de 12-18 meses. Prácticamente todos los pacientes que mueren de complicaciones asociadas al VIH se encuentran en este estrato de recuento celular CD4.

20

La Food & Drugs Administration (FDA) ha aprobado diversos inhibidores de la transcriptasa inversa (RT). Las enzimas de RT convierten el ARN vírico en ADN. Los inhibidores de la RT pueden interrumpir este proceso. El inhibidor AZT de la RT, vendido por Glaxo Wellcome bajo los nombres comerciales Retrovir y Zidovudina, ha sido aprobado por la FDA en 1987. El inhibidor ddI de la RT, vendido por Bristol-Myers Squibb bajo los nombres comerciales Videx y Didanosine, ha sido aprobado por la FDA en 1991. El inhibidor ddC de la RT, vendido por Hoffman-LaRoche bajo los nombres comerciales HIVID y Dideoxicitidina, ha sido aprobado por la FDA en 1992. El inhibidor d4T de la RT, vendido por Bristol-Myers Squibb bajo los nombres comerciales Zerit y Estavudina, ha sido aprobado por la FDA en 1994. El inhibidor 3TC de la RT, vendido por Glaxo Wellcome bajo los nombres comerciales Epivir y lamivudina, ha sido aprobado por la FDA en 1995. El inhibidor Nevirapina de la TR, vendido por Boehringer Ingelheim bajo el nombre comercial Viramuna, ha sido aprobado por la FDA en 1996.

25

30

35

La Food & Drugs Administration (FDA) ha aprobado ahora tres inhibidores de la proteasa para el tratamiento de la infección por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH). El saquinavir, vendido bajo el nombre comercial de Invirasa por Hoffman-LaRoche, ha sido el primer agente inhibidor de la proteasa aprobado por la FDA. El ritonavir, otro inhibidor de la proteasa vendido con el nombre comercial de Norvir por Abbott Laboratories, recibió la aprobación de la FDA en marzo de 1996, tal como lo hizo el indinavir vendido bajo el nombre del marca Crixivan por Merck & Co.

40

Los inhibidores de proteasa tienen un mecanismo de acción diferente del de los medicamentos anti-VIH anteriormente aprobados, tal como los análogos de nucleósido AZT y 3TC vendidos bajo los nombres comerciales de zidovudina y lamivudina por Glaxo Wellcome, ddI y d4T vendidos con los nombres comerciales didanosina y estavudina por Bristol-Myers Squibb y ddC vendido con el nombre comercial de dideoxicitidina por Roche Laboratories. Los inhibidores de proteasa bloquean la enzima que necesita el VIH para la finalización de su ciclo de replicación y la formación de nuevos virus viables. Sin la enzima proteasa, las proteínas víricas estructurales no pueden ser fabricadas adecuadamente y se forma un virus defectuoso, no infeccioso. Los análogos de nucleósido bloquean una enzima transcriptasa inversa diferente. Esta acción puede impedir que el ARN vírico produzca ADN vírico que pueda incorporarse luego en el ADN de las células humanas. Se reivindica que la combinación de uno o más inhibidores de la transcriptasa inversa junto con un inhibidor de la proteasa, a veces denominada "cóctel", ataca la replicación del VIH en dos puntos del ciclo de replicación. Los ensayos clínicos que combinan el saquinavir con AZT, ddC o ambos demuestran una mayor disminución en el número de partículas de VIH en sangre, a veces denominadas carga vírica, y un mayor incremento de células CD4 (linfocitos T) de los observados anteriormente con los inhibidores de transcriptasa solos. A veces, los cócteles han sido tóxicos e ineficaces para algunos pacientes. Las ventajas clínicas en términos de mayor supervivencia o de menor velocidad de progresión de la enfermedad, sin embargo, no han sido demostradas completamente todavía en cuanto a la combinación (cócteles) de los inhibidores de RT y los inhibidores de proteasa. Sin embargo, los médicos empiezan a considerar que el VIH es una enfermedad crónica manejable más que una sentencia de muerte.

45

50

55

60

Los inhibidores de proteasa saquinavir han sido aprobados por la FDA para su utilización en combinación con los inhibidores de transcriptasa inversa en pacientes con SIDA avanzado. Los inhibidores de proteasa saquinavir pueden ser tolerados por algunos pacientes sin que aparezca la toxicidad hematológica o neurológica encontrada con los análogos de nucleósidos. Ciertos medicamentos prescritos, incluyendo rifampina, rifabutina, fenobarbital, dilantina y dexametasona, pueden reducir notablemente los niveles en plasma de los inhibidores de proteasa saquinavir y deben evitarse en aquellos pacientes que toman saquinavir. Se ha notificado la resistencia vírica a los inhibidores de proteasa saquinavir así como con otros medicamentos anti-VIH.

65

## ES 2 285 765 T3

Parece que los inhibidores de proteasa ritonavir e indinavir son más potentes contra el VIH que la formulación actual del saquinavir. Los inhibidores de proteasa ritonavir requieren refrigeración. Los inhibidores de proteasa ritonavir se utilizan actualmente en combinación con análogos de nucleósido (medicamentos como AZT) o como terapia única. Un estudio anterior trató a 32 pacientes con ritonavir más AZT más ddC. Después de 20 semanas, los recuentos celulares medios de CD4 ascendieron desde 84 células/mm<sup>3</sup> de la línea de base hasta 106 células/mm<sup>3</sup>. La carga vírica, una medida del número de copias víricas en sangre, se redujo casi 100 veces. El ritonavir se dosifica a 600 mg vía oral dos veces al día, lo que puede implicar doce cápsulas cada día. Se dispone del medicamento en cápsulas de 100 mg. Los efectos secundarios son bastante comunes, incluidos síntomas gastrointestinales con náuseas, vómitos y diarrea. Otros efectos secundarios incluyen entumecimiento y hormigueo, particularmente alrededor de la boca, e inflamación del hígado, que comprende una forma de hepatitis.

Los inhibidores de proteasa indinavir recibieron la rápida aprobación de la FDA en base a estudios que demuestran un aumento medio del recuento de CD4 de aproximadamente 100 células/mm<sup>3</sup> y una caída de la carga vírica de casi 100 veces con una combinación de AZT más 3TC más indinavir. El indinavir se dosifica a 800 mg vía oral tres veces al día (2 cápsulas 3 veces al día). Contrariamente al ritonavir, el indinavir puede tomarse con el estómago vacío para mejorar su absorción. El indinavir provoca menos efectos secundarios gastrointestinales que el ritonavir y parece ser mejor tolerado, sobre todo por algunos pacientes. El mayor efecto secundario de los inhibidores de proteasa indinavir es el desarrollo de cálculos renales. El medicamento es parcialmente excretado en la orina y puede cristalizarse formando cálculos si no se mantiene una hidratación adecuada. Los inhibidores de proteasa indinavir pueden afectar también al hígado, provocando una subida en los niveles sanguíneos de bilirrubina, esto es un pigmento biliar formado a partir de la ruptura de los glóbulos rojos. Los inhibidores de proteasa indinavir pueden provocar también interacciones medicamentosas.

El análisis de la resistencia a los inhibidores de proteasa no ha sido determinado por completo. Los inhibidores de proteasa saquinavir y ritonavir pueden costar actualmente al paciente aproximadamente 600\$ americanos al mes. Los inhibidores de proteasa indinavir se valoran en aproximadamente un 30% por debajo de este nivel. Una combinación de tres medicamentos inhibidores de proteasa AZT más 3TC más ritonavir puede costar a un paciente por encima de 1.000\$ americanos al mes. Las combinaciones (cócteles) de inhibidores RT e inhibidores de proteasa pueden alcanzar los 25.000\$ al año. Aunque los inhibidores de proteasa puedan resultar útiles, la comunidad médica y la sociedad no han resuelto todavía los problemas económicos del paciente en cuanto a estos caros medicamentos.

El virus herpes simplex (HSV), denominado comúnmente “virus del herpes” o “herpes”, es una enfermedad infecciosa que también ha alcanzado proporciones críticas a nivel nacional, con un número estimado de personas infectadas del 70-80% de nuestra población, tal como lo comunicó la American Society Health Association (ASHA), y que aumenta anualmente en 500.000 personas. Existen dos tipos comunes de herpes: el virus herpes simplex 1 (HSV 1) y el virus herpes simplex 2 (HSV 2). El herpes penetra en el cuerpo humano a través de minúsculos cortes del tejido epidérmico, normalmente por contacto con un huésped infectado, y se caracteriza por la erupción de una o más vesículas, normalmente por grupos, después de un período de incubación de aproximadamente cuatro días. Típicamente, el curso del brote infeccioso empieza por una etapa prodromal que avanza hacia la erupción vesicular; seguida de la ulceración, coalescencia, resolución y período de latencia. El brote puede durar varias semanas, prolongándose en promedio de dos-tres semanas. En algunos individuos inmunes afectados, el brote puede durar meses. Las vesículas pueden aparecer en cualquier lugar en la piel o la mucosa, apareciendo típicamente en los labios como llagas frías, en las glándulas, mucosa bucal, conjuntiva y córnea, en los órganos genitales, la mucosa anal y el tejido perianal.

Los síntomas del herpes incluyen hinchazón inguinal, dolor, fiebre, malestar, dolor de cabeza, dolor muscular y glándulas inflamadas. Algunos individuos que tienen el nervio trigeminal comprometido con herpes oral padecen un dolor facial terrible, dificultad para tragar, hinchazón alimentaria y facial. Los individuos con el nervio sacro afectado sufren de dolor en la parte superior de las piernas, hinchazón y gran dificultad para andar.

La infección por virus herpes simplex (HSV) es recrudesciente, residiendo en los ganglios nerviosos, repitiéndose luego debido a algún estímulo todavía desconocido. Las infecciones por herpes recurrentes pueden ser precipitadas por casi cualquier cosa, incluyendo una sobreexposición a la luz solar, deficiencias nutricionales, estrés, menstruación, inmunosupresión, ciertos alimentos, medicamentos, enfermedad febril, etc. Recientemente, se ha aislado virus herpes del tejido cardíaco.

Las infecciones por HSV 1 y HSV 2 plantean amenazas muy serias a la salud causando a menudo ceguera, un mayor riesgo de cáncer de cuello del útero, meningitis aséptica y encefalitis, muerte neonatal, viremia, etc. Los efectos devastadores de esta enfermedad van bastante más allá del alcance médico del sufrimiento humano. El HSV es responsable de un serio sufrimiento psicológico y emocional, así como de una pérdida económica sustancial para la nación y el mundo.

Se han propuesto diversos tratamientos del herpes, incluyendo la aplicación tópica de agentes como yoduro de povodona, idoxuridina, trifluorotimidina o aciclovir. Estos tratamientos obtuvieron varios grados de éxito. Los tratamientos anteriores han sido decepcionantes. El aciclovir, tomado vía oral para el tratamiento sistémico del HSV, es algo eficaz. Sin embargo, el aciclovir tiene éxito solamente interrumpiendo la replicación del virus. No tiene éxito en el tratamiento de un brote infeccioso vía sistémica o tópica. Se conocen cepas resistentes al aciclovir. Los individuos con el Síndrome de Autoinmunodeficiencia Humana (SIDA) están severamente inmunocomprometidos y, en especial,

## ES 2 285 765 T3

padecen de brotes de HSV debilitadores. Además, los individuos con SIDA pueden portar cepas de HSV resistentes al aciclovir, lo que puede producir que el aciclovir sea ineficaz para estos individuos

5 Wainbert y col., (Arch. AIDS Res., 1(1), 1987, pp. 57-58), han observado que el cloruro de benzalconio reduce la actividad de la transcriptasa inversa del HIV-1 a su exposición al virus.

La US 4797420 describe una formulación desinfectante limpiadora de superficies duras. La formulación contiene cloruro de alquildimetilbencilamonio, y es particularmente eficaz contra el virus del herpes simplex.

10 Por tanto, es deseable desarrollar un tratamiento médico seguro y con éxito para ayudar al tratamiento y evitar los serios problemas del VIH y de otras enfermedades infecciosas.

### Sumario de la invención

15 Se proporciona un medicamento y un tratamiento médico mejorado que, cuando se administra sistémicamente, inhibe la unión del virus de inmunodeficiencia humana (virus de la inmunodeficiencia humana) (VIH) en células diana e impide la propagación del VIH. Ventajosamente, la utilización del nuevo tratamiento médico y del medicamento puede servir para impedir la transmisión sexual del VIH y de otros virus. En especial, el tratamiento médico mejorado y el medicamento son seguros, menos caros y más eficaces.

20 El medicamento mejorado, también denominado Viracea 2 VIH-4, comprende una nueva composición medicinal, una formulación, un compuesto antimicrobiano y una solución. El nuevo tratamiento médico antimicrobiano y el medicamento microbicida, en esencia, tienen éxito en el tratamiento del VIH de forma sistémica y pueden servir para tratar otras infecciones microbianas, incluidas, sin limitarse a las mismas, el virus de la varicela zoster (herpes zoster) y el citomegalovirus. En algunas circunstancias, puede resultar deseable utilizar el nuevo medicamento vía tópica.

25 Aunque el nuevo medicamento y compuesto antimicrobiano sea particularmente útil para inhibir drásticamente la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), puede emplearse para tratar otras enfermedades microbianas (enfermedades causadas por microbios) tales como Epstein-Barr, virus del papiloma, estafilococos, estreptococos, micobacterias, influenza, parainfluenza, adenovirus, encefalitis, meningitis, arbovirus, arenavirus, bacilos anaeróbicos, picornavirus, coronavirus y sineitialvirus, así como el virus herpes simplex, virus de varicela zoster y citomegalovirus.

30 Aunque el tratamiento médico y el medicamento sean particularmente útiles para inhibir el VIH y demás enfermedades infecciosas en personas (seres humanos) (*homo sapiens*), también pueden servir con propósitos veterinarios para tratar infecciones víricas y bacterianas, así como enfermedades infecciosas, en animales tales como perros, gatos, pájaros, caballos, vacas, ovejas, cerdos (puercos y cerdos castrados) y demás animales de granja, así como roedores y demás animales vistos en los zoológicos.

40 Ventajosamente, el tratamiento médico mejorado y el medicamento de la presente invención produjeron unos resultados inesperados sorprendentemente buenos. Esta solución microbicida fácil de utilizar puede proporcionar una absorción inmediata en su administración parenteral. A su administración puede aparecer un ligero efecto de hormigueo. A los pocos minutos de la aplicación se puede experimentar un ligero sabor a medicina en la boca. Las pruebas iniciales *in vitro* del nuevo tratamiento médico y del medicamento demostraron efectos inhibidores extremadamente sorprendentes sobre el virus VIH. Deseablemente, el nuevo medicamento se fabrica a partir de producto o productos químicos de libre adquisición (OTC) fácilmente obtenibles y proporciona un tratamiento seguro, cómodo y económico.

45 Deseablemente, el nuevo medicamento (composición medicinal) incluye inhibidores de microbios que inhiben, suprimen e interrumpen infecciones microbianas debidas a enfermedades causadas por microbios. Los inhibidores de microbios comprenden aislados antimicrobianos, extractos botánicos o productos fitoquímicos, de al menos una parte de una o más de las plantas especiales relacionadas a continuación. Los inhibidores de microbios pueden comprender inhibidores víricos para inhibir enfermedades víricas tales como VIH, virus del herpes simplex 1 (HSV 1), virus del herpes simplex 2 (HSV 2), virus de la varicela zoster (herpes zoster), citomegalovirus, Epstein-Barr, virus del papiloma, influenza vírica, parainfluenza vírica, adenovirus, encefalitis vírica, meningitis vírica, arbovirus, arenavirus, piconavirus, coronavirus y sineitialvirus. Los inhibidores de microbios pueden comprender también inhibidores bacterianos para inhibir enfermedades bacterianas tales como estafilococos, estreptococos, micobacterias, encefalitis bacteriana, meningitis bacteriana y bacilos anaeróbicos. En algunas circunstancias, los inhibidores de microbios pueden incluir inhibidores fúngicos.

50 Se pueden obtener mejores resultados si no se utilizan la *Echinacea* y *Commiphora* (también denominada *Commiphora*) u otras plantas en el medicamento en su estado puro, no tratado y no cortado. Para unos resultados aún mejores, el medicamento puede excluir arabinosa, betaína, celulosa, cobre, fructosa, ácidos grasos, galactosa, glucosa, hierro, potasio, proteína, resina, sacarosa y xilosa.

65 El tratamiento médico mejorado proporciona un nuevo método y un proceso para su utilización en el tratamiento de las enfermedades infecciosas anteriormente mencionadas. Para algunas enfermedades infecciosas los inhibidores microbianos pueden aplicarse y mantenerse en la zona infectada por los microbios (región o superficie) hasta que los síntomas externos y las manifestaciones físicas de la infección desaparezcan, residan o se descompongan en la zona

## ES 2 285 765 T3

infectada. El medicamento puede administrarse por medio de una inyección con jeringuilla, de forma sublingual, intramural, por aspersión, mediante toques, espolvoreo, torunda, esponja, pincel, vertiéndolo, distribución, revestimiento, o mediante recubrimiento grueso del medicamento en las zonas infectadas por microbios, por ejemplo nódulos linfáticos, sistema linfático, células T, mucosa bucal, mucosa nasal, tejido vaginal, tejido labial, tejido rectal, tejido anal, tejido perianal, labios, tejidos cutáneo, tejido ocular, conjuntiva y párpados.

Preferentemente, los inhibidores microbianos o el compuesto antimicrobiano se aplica sistémicamente con una jeringuilla en el canal rectal o la vagina para tratar o impedir la transmisión sexual del VIH. Los inhibidores microbianos o el compuesto antimicrobiano pueden aplicarse de la manera anteriormente mencionada 4-20 veces al día durante 1 a 18 días consecutivos, reduciendo sustancialmente la carga vírica de los pacientes infectados por VIH, es decir reduciendo la cantidad de VIH y virus del SIDA en el cuerpo.

Preferentemente, el medicamento mejorado, la composición medicinal o el compuesto microbiano es un concentrado fitoquímico que se combina y simultánea o concurrentemente se aplica con un agente tensioactivo, un nutriente y un soporte, disolvente o diluyente, para proporcionar una solución medicinal microbicida. El nutriente sirve de catalizador, activador, iniciador fitoquímico, suplemento nutricional y soporte auxiliar. El nutriente puede comprender uno o más de los siguientes: vitaminas hidrosolubles, vitaminas liposolubles, vitamina A, complejo vitamina B (complejo vitamínico B), vitamina D, vitamina E, vitamina K, vitamina B1, vitamina B2, vitamina B5, vitamina B6, vitamina B12, vitamina B15 y, preferentemente, folacina o ácido fólico.

Con este fin, la solución microbicida de interés comprende un agente tensioactivo detergente antimicrobiano con extractos botánicos. Los agentes tensioactivos son, preferentemente, agentes tensioactivos catiónicos que pueden comprender, individualmente o en cualquier número, cloruros de amonio cuaternarios de 6 a 18 carbonos tales como cloruro de alquilbencildimetilamonio, mezclas de cloruro de alquilbencildimetilamonio, cloruro de alquildimetil/etilbencilamonio, cloruro de diisobutilfenoxietoxietildimetilbencilamonio, cloruro de N-(C<sub>12</sub>C<sub>14</sub>C<sub>16</sub>)dimetilbencilamonio, cloruro de benzalconio, cloruro de octildecildimetiloamonio, cloruro de didecildimetilamonio, cloruro de dioctildimetilamonio, cloruro de dialquildimetilamonio, cloruro de dialquilmethylbencilamonio, cloruro de octildecildimetilamonio, cloruro de dimetilbencilamonio, cloruro de laurildimetilbencilamonio, *o*-bencil-*p*-clorofenol, cloruro de diderildimetilamonio, cloruro de doctildimetilamonio, cloruro de alquil(C<sub>14</sub>C<sub>12</sub>C<sub>16</sub>)dimetilbencilamonio, y comprende preferentemente cloruro de alquilbencildimetilamonio, en especial cloruro de benzalconio. El rango de actividad del agente tensioactivo catiónico puede ser del 5% al 90%, pero para mejores resultados es del 8% al 20%. Ya se dispone comercialmente de sales de amonio cuaternarias. En algunas circunstancias, puede resultar útil utilizar otros agentes tensioactivos tales como, pero sin limitarse a, DMSO, agentes tensioactivos de ácido glicólico, agentes tensioactivos enzimáticos, agentes tensioactivos anfólicos, agentes tensioactivos zwitteriónicos y agentes tensioactivos no iónicos. Los agentes tensioactivos pueden comprender detergentes, agentes humidificadores, emulsionantes, antiespumantes y/o aditivos reductores de la tensión superficial.

Los soportes sirven para mezclar los constituyentes, para mantener éstos en solución y para proporcionar un método de aplicación a la zona afectada fácil, bien sea por pulverización, con cuentagotas o con un aplicador. Aunque da mejores resultados una solución acuosa, preferentemente un soporte estéril acuoso y un disolvente, en algunas circunstancias puede resultar deseable utilizar otro líquido o soportes sólidos como glicerina, aceites minerales, sílice, aceite de semilla de algodón, aceite de coco, aceite vegetal, aceite de semillas, aceite de pescado o aceite animal, alcohol, talco, harina de maíz, cera de abeja, cera de carnaúba, caroteno beta, aceite de ajo, aceite de alcanfor, vitaminas solubles, minerales solubles, aceite de colza, aceite de nueces, aceite de oliva, liposomas, ácido ascórbico, aceite de onagra (“primavera de noche”), picnogenol, aceite de pepitas de uva, lanolina, etocina, colágeno, aloe vera, polen de abeja, jalea real, sulfato de condroitina A, algas, EDTA, ácidos grasos, hierbas, lecitina, bioflavonoides, aceites o polvos de cereales, algas, infusiones, vinagres, acidófilo, sales celulares, ácidos ascórbicos, hidra 5, glandulares, aminoácidos, psilio, derivados vegetales u otros soportes estériles.

Los extractos botánicos, aislados o los productos fitoquímicos antimicrobianos contenidos en este nuevo medicamento y tratamiento médico pueden estar compuestos por resina de goma de mirra, sesquiterpenos, curcena, dihidrofuranodien-6-ona, 2-metoxifuranodieno, ácido acético, alfa-amirina, arabinosa, alfa-bisaboleno, gamma-bisaboleno, cadineno, campesterol, colesterol, cinamaldehído, commiferina, ácido alfa-comifórico, ácido beta-comifórico, ácido gamma-comifórico, ácido comifórico, m-cresol, alcohol cumico, cuminaldehído, dipenteno, elemol, 3-epi-alfa-amirina, eugenol, furanodieno, furanodienona, galactosa, goma, heeraboleno, alfa-heerabomirrol, beta-heerabomirrol, heeraborasena, limoneno, ácido 4-O-metilglucurónico, n-nonacosano, beta-sitosterol, xilosa, caropilenos (carofilenos), linderestireno (lindestireno), arabinosa, betaína, equinacena, equinacina B, equinacósido, equinolona, enzimas, fructosa, ácidos grasos, galactosa, glucosa, ácido glucurónico, inulina, inuloide, pentadecadieno, compuestos poliacetileno; polisacáridos tales como arabinogalactano; resina, ramnosa, sacarosa, taninos, vitaminas A, C y E, alquilamidas, apigenina, arabinogalactano, ácido ascórbico, ácido-behénico-ácido etanoico, betaína, borneol, acetato de bornilo, ácido cafeínico, 2-O-cafeoil-3-(5-alfacarboxibeta)-3,4-dihidroxifenilo, ácido 2-O-cafeoil-3-O-cumaroil-tartárico, 6-O-cafeoilquinacósido, ácido 2-O-cafeoil-3-O-feruloiltartárico, ácido 2-O-cafeoil-tartárico, calcio, carbonato, beta-caroteno, carofileno, carofileno-epóxido, ácido clorogénico, ácido cicórico, metil éster de ácido cicórico, cianadina-3-O-(beta-d-glicopiranósido), cianadin-3-(6-O-malonil beta-d-glucopiranósido), cinarina, isobutil amida de ácido deca-(2e,4e,6e)trienoico, des-ramnosilverbascósido, ácido 3,5-dicafeoilquinico, ácido 4-5-O-dicafeoilquinico, ácido 2,3-O-diferuloiltartárico, isobutil amida de ácido dodeca-(2e, 4e)-dienoico, isovalerato de dodeca-2,4-dieno-1-ilo, isobutil amida de ácido dodeca-(2e,6z,8e,10e)-tetraenoico, beta-farneseno, ácido 2-O-feruloiltartárico, germa-creno, heptadeca-(8z,11z)-dieno-2-ona, heteroxilano, humuleno 8-12, (e)-10-hidroxi-4,10-dimetil-4,11-dodecadien-2-

ona, ácido 13-hidroxiocetadeca-(9z,11c,15z)-trienoico, inulina, ácido isoclorogénico, isorhamnetina-3-rutinósido, isotusilagina, caempferol, caempferol-3-glucósido, caempferol-3-nutinósido, limoneno, luteolina, luteolina-7-glucósido, 2-metiltetradeca-5,12-dieno, 2-metiltetradeca-6,12-dieno, metil-*p*-hidroxycinamato, marcina, niacina, ácido palmítico, pentadeca-(8z,11z)-dien-2-ona, pentadeca-(8z,13z)-dien-11-lin-2-ona, pentadeca-8-en-2-ona, pentadeca-(8z)-en-2-ona, pentadeca-(8z)-en-11,13-dien-2-ona, 1-pentadeceno, penta-(1,8z)-dieno, fósforo, alfa-pineno, beta-pineno, poliacetilenos, pontica epóxido, quercetagina-7-glucósido, quercetina, quercetina-3-galactósido, quercetina-3-glucósido, quercetina-3-robinósido, quercetina-3-xilósido, quercetina-3-xilosilgalactósido, ramnoarabinogalactano, riboflavina, rutina, rutósido, beta-sitosterol, sitosterol-3-beta-O-glucósido, estigmasterol, ácido tartárico, tetradeca-(8z)-en-11,13-dien-2-ona, tiamina, n-triacontanol, trideca-1-en-3,5,7,9,10-pentaína, tusilagina, vanilina, verbascósido. Para mejores resultados, los concentrados fitoquímicos incluyen los productos fitoquímicos anteriores, excluyendo arabinosa, betaína celulosa, fructosa, ácidos grasos, galactosa, glucosa, sacarosa y xilosa.

Los extractos botánicos, los aislados y los productos fitoquímicos antimicrobianos pueden separarse, extraerse y aislarse de partes de plantas, tales como *Pimpinella anisum*, *Myroxylon*, *Arctostaphylos*, *Earum*, *Capsicum*, *Eugenia*, *Myrtaceae*, *Coriandrum*, *Inula*, *Allium*, *Gentiana*, *Juniperus*, *Calendula*, *Origanum*, *Mentha labiate*, *Commiphora*, *Plantago*, *Rosmarinus*, *Ruta*, *Lamiaceae*, *Meliosa*, *Baptisa*, *Artemisa*, *Sage*, *Mentha*, *Parthenium integrifolium*, *Eucalyptus*, *Asteriaceae*, y preferentemente: (1) del género *Echinacea* de la familia *Astericaea*, a saber, *Echinacea purpurea*, *Echinacea angustifolia*, (*Echinacea pallidae*), *Echinacea vegetalis*, *Echinacea atribactilus* y sus *Echinacea pallidum* y cultivados; así como del género *Commiphora*, a saber, *Commiphora myrrha*, *Commiphora molmol*, *Commiphora erythraea*, y sus cultivos. Para mejores resultados, los productos fitoquímicos y aislados antimicrobianos son extractos de *Echinacea purpurea*, *Echinacea angustifolia* y *Commiphora myrrha*.

La tecnología, el tratamiento y el medicamento de la invención producen resultados muy atractivos, inesperados, sorprendentemente buenos y coherentes. Las pruebas demuestran que la solución microbicida (medicamento) y el tratamiento médico son extremadamente útiles para controlar la infección por VIH, para inhibir la unión del virus VIH en células diana, para actuar como microbicida preventivo, para ampliar los períodos de latencia del VIH y demás enfermedades, y para inhibir drásticamente el VIH y demás virus, al mismo tiempo que, en general, son seguros para el paciente y el medioambiente.

Se proporciona una explicación más detallada de la invención en la siguiente descripción y reivindicaciones adjuntas.

#### Descripción detallada de las realizaciones preferentes

Se proporciona un microbicida y un tratamiento para inhibir el virus de la inmunodeficiencia humana, también denominado virus inmunodeficiente humano o VIH. Deseablemente, el microbicida del VIH y el tratamiento inhiben completamente el VIH así como otras enfermedades microbianas infecciosas, y son seguros y no tóxicos para los humanos, animales y medioambiente.

El microbicida del VIH y el medicamento pueden comprender un agente tensioactivo y un producto botánico herbáceo que proporciona un extracto botánico, un aislado fitoquímico, un antimicrobiano, un aislado antivírico, un inhibidor microbiano y un inhibidor vírico. La composición microbicida preferente puede comprender un agente tensioactivo, un diluyente acuoso, un nutriente y un producto botánico herbáceo del género *Echinacea* (E), de la familia *Asteraceae*, especies: *purpurea*, *angustifolia*, *pallidae*, *vegetalis*, *atribactilus* y sus cultivos, así como el producto botánico herbáceo del género *Commiphora*, especies *Commiphora myrrha*, *Commiphora molmol*, *Commiphora erythraea*, y sus cultivos. Preferentemente, el producto botánico herbáceo es un extracto y un aislado que comprende productos fitoquímicos de *Commiphora* y productos fitoquímicos de *Echinacea* tal como se encuentran y se extraen de las *Commiphora myrrha*, *Echinacea purpurea*, *Echinacea Pallidae*, y *Echinacea angustifolia*. Para mejores resultados, el tratamiento médico y el microbicida (medicamento) comprenden un agente tensioactivo catiónico, productos fitoquímicos procedentes de *Echinacea purpurea*, *Echinacea angustifolia*, y *Commiphora myrrha*, un diluyente acuoso estéril y folacina. La proporción de *Commiphora myrrha* con respecto a la *Echinacea purpurea* y la *Echinacea angustifolia* oscila preferentemente entre 1:2 y 1:4.

El agente tensioactivo proporciona cierto desbridamiento a nivel celular superficial con un amplio espectro de acción antimicrobiana. Los agentes tensioactivos de esta naturaleza pueden comprender sales de amonio cuaternarias de 6 a 18 átomos de carbono. Preferentemente, el agente tensioactivo de sal amónica cuaternaria es una mezcla de cloruros de alquildimetilbencilamonio que pueden ser haluro de benzalconio, bromuro de benzalconio, cloruro de benzalconio y, en especial, cloruro de benzalconio. El tratamiento del VIH puede comprender un 100% de solución acuosa activa, pero puede utilizarse también en concentrado. La solución puede comprender varias concentraciones en peso de agentes tensioactivos tal como desde un 0,005% hasta un 0,8%, preferentemente del 0,02% al 0,30% y en particular del 0,02% al 0,26%.

Los productos fitoquímicos del producto botánico *Echinacea* han demostrado tener una actividad impresionante contra bacterias, virus y algunos hongos. Se desconoce el mecanismo exacto. Cuando se sometió a prueba el microbicida de la invención vía tópica sobre VIH y HSV 1 y 2, demostró ser eficaz en el tratamiento de brotes infecciosos por herpes simplex. Cuando se sometió a prueba *in vitro*, demostró una actividad inhibidora contra el VIH-1 y los HSV 1 y 2.

## ES 2 285 765 T3

La composición del concentrado fitoquímico comprende los siguientes constituyentes aislados, extractos botánicos, inhibidores microbianos y aislados antimicrobianos: polisacáridos, equinacena, equinaceína, equinacósido (éster de ácido cafeico), equinolona, equinadiol, enzimas, ácido glucurónico, inuloide, pentadecadieno, compuestos poliacetileno; arabinogalactano; ramnosa, PS I (un 4-O-metilglucoronarabinosilano, M 35 kD) y PS II (un ácido ramnoarabinogalactano, M 450 kD), cinarina (ácido 1,5-di-O-cafeoilquinico), ácido achicórico (ácido 2,3-O-dicafeoiltartárico) y derivados, alquilamidas, cetoalquinos y cetoalquenos; quinonas; aceites. incluyendo borneol, acetato de borneol; pentadeca-8(z)-en-2-ona, germacreno D; cariofileno; epóxido de cariofileno; antocianinas alcaloides pirrolizidina; amidas lipofílicas, isobutilamidas; poliacetilenos; resina de goma mirra; curcenenona (del tipo furanoeudesmano); dihidrofuandien-6-ona; 2-metoxifuranodieno (del tipo furanoelemento); lindestireno (del tipo furanogermacrano); alquilamidas, apigenina, arabinogalacta, ácido ascórbico, ácido behénico-ácido etanoico, betaína, borneol, acetato de borneol, ácido cafeico, 2-O-cafeoil-3-(5-alfa-carboxibeta), 3,4-dihidroxifenilo, ácido 2-O-cafeoil-3-O-cumaroiltartárico, 6-O-cafeoilquinacósido, ácido 2-O-cafeoil-3-O-feruloiltartárico, ácido 2-O-cafeoiltartárico, beta-caroteno, carofileno, carofileno-epóxido, ácido clorogénico, ácido cicórico, metil éster de ácido cicórico, cianadin-3-O-(beta-D-glicopiranosido), cianadin-3-(6-O-malonil-beta-D-glucopiranosido), cinarina, isobutil amida de ácido deca-(2e,4e,6e)-trienoico, des-ramnosilverbascósido, ácido 3,5-dicafeoilquinico, ácido 4,5-O-dicafeoilquinico, ácido 2,3-O-diferuloiltartárico, isobutil amida de ácido dodeca-(2e,4e)-dienoico, isovalerato de dodeca-2,4-dieno-1-ilo, isobutil amida de ácido dodeca(2e,6z,8e,10e)-tetraenoico, beta-farneseno, ácido 2-O-feruloiltartárico, germacreno, heptadeca-(8z,11z)-dien-2-ona, heteroxilano, humuleno 8-12, (e)-10-hidroxi-4,10-dimetil-4,11-dodecadien-2-ona, ácido 13-hidroxi-octadeca-(9z,11e,15z)-trienoico, inulina, ácido isoclorogénico, isorhamnetina-3-rutinósido, isotusilagina, caempferol, caempferol-3-glucósido, caempferol-3-nutinósido, limoneno, luteolina, luteolina-7-glucósido, 2-metiltetradeca-5,12-dieno, 2-metiltetradeca-6,12-dieno, metil-p-hidroxicinamato, marcina, niacina, ácido palmítico, pentadeca-(8z,11z)-dien-2-ona, pentadeca-(8z,13z)-dien-11-lin-2-ona, pentadeca-8-en-2-ona, pentadeca-(8z)-en-2-ona, pentadeca-(8z)-en-11,13-dien-2-ona, 1-pentadeceno, penta-(1,8z)-dieno, fósforo, alfa-pineno, beta-pineno, poliacetilenos, pontica epóxido, quercetagina-7-glucósido, quercetina, quercetina-3-galactósido, quercetina-3-glucósido, quercetina-3-robinósido, quercetina-3-xilósido, quercetina-3-xilosilgalactósido, ramnoarabinogalactano, riboflavina, rutina, rutósido, beta-sitosterol, sitosterol-3-beta-O-glucósido, estigmasterol, ácido tartárico, tetradeca-(8z)-en-11,13-dien-2-ona, tiamina, n-triacontanol, trideca-1-en-3,5,7,9,10-pentaína, tusilagina, vanilina, verbascósido, sesquiterpenos, ácido acético, alfa-amirona, arabinosa, alfa-bisaboleno, gamma-bisaboleno, cadineno, campesterol, colesterol, cinamaldehído, commiferina, ácido alfa-comiforico, ácido beta-comiforico, ácido gamma-comiforico, ácido comiforínico, m-cresol, alcohol cúmico, cuminaldehído, dipenteno, 3-epi-alfa-amirina, eugenol, furanodieno, furanodienona, galactosa, goma, heeraboleno, alfa-heerabomirrol, beta-heerabomirrol, heeraborasena, limoneno, ácido 4-O-metilglucurónico, n-nonacosano, beta-sitosterol, xilosa, caropilenos (carofilenos), resina de goma mirra, curcenenona, dihidrofuandien-6-ona, y 2-metoxifurandieno.

Para mejores resultados, los aislados antimicrobianos del concentrado fitoquímico comprenden, en peso (con respecto al peso total de la composición medicinal de la invención), del 0,3-9% de equinacósido; 0,1-7% de PS I (un 4-O-metilglucoronarabinosilano, M 35 kD) y PS II (un ácido ramnoarabinogalactano, M 450 kD); del 0,1-10% de cinarina (ácido 1,5-di-O-cafeoilquinico) y ácido achicórico (ácido 2,3-O-dicafeoiltartárico) y derivados; del 0,2-4% de equinolona; del 0,2-8% de equinacina B; del 0,1-6% de equinaceína; del 0,2-7% de antocianinas que comprenden cianadin-3-O-beta-D-glucopiranosido y 3-O-(6-O-malonil-beta-D-glucopiranosido); del 0,01-0,06% de alcaloides de pirrolizidina que comprenden tusilagina e isotusilagina; del 0,003-0,009% de dodecaisobutilamidas isoméricas y 2E, 4E, 8Z, 10EZ-ácido tetraenoico; del 0,01-2% de caropilenos; así como los productos fitoquímicos de *Commiphora myrrha* que comprenden resina de goma mirra, curcenenona, dihidrofuandien-6-ona; 2-metoxifuranodieno, lindestireno (lindestreno), sesquiterpenos, ácido acético, alfa-amirona, arabinosa, alfa-bisaboleno, gamma-bisaboleno, cadineno, campesterol, colesterol, cinamaldehído, commiferina, ácido alfa-comiforico, ácido beta-comiforico, ácido gamma-comiforico, ácido comiforínico, m-cresol, alcohol cúmico, cuminaldehído, dipenteno, elemol, 3-epi-alfa-amirina, eugenol, furanodieno, furanodienona, galactosa, goma, heeraboleno, alfa-heerabomirrol, beta-heerabomirrol, heeraborasena, limoneno, ácido 4-O-metilglucurónico, n-nonacosano, beta-sitosterol, xilosa, caropilenos (carofilenos) y linderestireno (lindestireno).

El concentrado fitoquímico puede comprender, en peso, del 2%-90% de la composición y la solución medicinal y preferentemente comprende no menos del 15% de la composición y la solución; y para mejores resultados, comprende del 40%-60% de la composición y la solución medicinal.

El diluyente disuelve el agente tensioactivo y los agentes fitoquímicos y puede actuar como soporte en pulverizadores, tubos y botellas cuentagotas. El diluyente preferente es un diluyente acuoso y, en especial, es un diluyente acuoso estéril. La proporción de agua en la solución acuosa con respecto al agente tensioactivo puede oscilar entre 30.000:1 y 250:1 y preferentemente entre 5.000:1 y 750:1. La proporción de agua con respecto a los concentrados combinados de cloruro de benzalconio y los productos fitoquímicos puede comprender un rango de 2:1 a 100:1, con un rango preferente de 4:1 a 40:1, y para mejores resultados puede comprender una proporción de 6:1 a 20:1.

Para mejores resultados, el medicamento (microbicida) y tratamiento microbicida mejorado para el herpes comprende, en peso, del 0,02% al 0,3% de agentes tensioactivos y, para evitar toda toxicidad, preferentemente menos del 0,26%; del 40% al 60% de productos fitoquímicos *Echinacea* y *Commiphora*; del 0,01% al 25%, con más preferencia del 2% al 12%, de nutrientes; y del 20% al 60%, con más preferencia del 29,74% al 59,8%, de agua estéril. El medicamento (microbicida) comprende preferentemente un nutriente vitamínico que sirve de soporte nutricional y proporciona un efecto sinérgico cuando se combina con *Commiphora myrrha*, *Echinacea purpurea* y *Echinacea angustifolia*. El nutriente puede comprender uno o más de lo siguiente: vitamina A, complejo vitamina B; vitamina D,



## ES 2 285 765 T3

vitamina E, vitamina K, una vitamina hidrosoluble, una vitamina liposoluble, vitamina B1, vitamina B2, vitamina B5, vitamina B6, vitamina B12, vitamina B15, y preferentemente folacina o ácido fólico.

5 Aunque el agua sea el diluyente y soporte acuoso preferente, puede resultar deseable en algunas circunstancias utilizar otros soportes para propulsar el concentrado por una jeringuilla o un pulverizador, o para una mayor solubilidad y eficacia. También puede resultar deseable en algunas circunstancias incluir un agente de control de viscosidad. Además, aunque se estime que la vida útil en depósito del medicamento mejorado es de dos años, puede resultar necesario añadir un conservante adecuado.

10 Para su uso preferente como preventivo microbicida contra el VIH, la solución medicinal (medicamento) debe ser aplicada sistémicamente, de forma vaginal o rectal. El método de aplicación del medicamento puede ser mediante jeringuilla, pulverizador, toques, cuentagotas, u otros métodos. La aplicación o recubrimiento de la solución (medicamento) debe ser mantenido durante el coito. Los jabones y detergentes aniónicos, y especialmente los jabones que contienen proteínas, pueden estar contraindicados. Preferentemente, la zona de aplicación debe lavarse, limpiarse y  
15 secarse antes de la aplicación del medicamento. Para el tratamiento como antivírico del VIH, el medicamento puede aplicarse por medio de inyección con jeringuilla con la dosis de tratamiento en el recto o en la vagina, o mediante otros métodos.

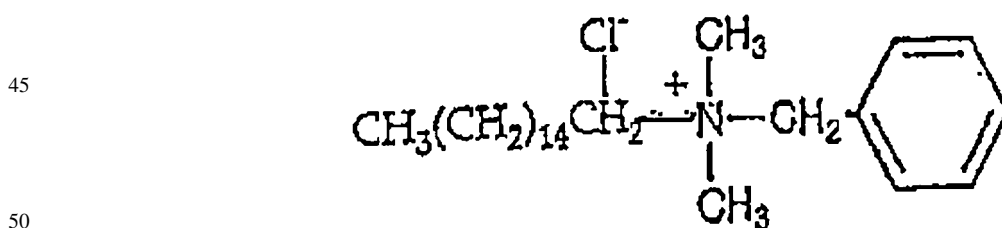
### Cloruro de benzalconio

20 El agente tensioactivo preferente es cloruro de benzalconio. Se dispone comercialmente del cloruro de benzalconio en solución acuosa bajo el nombre y la marca comercial Zephiran<sup>®</sup>, distribuido por Sanofi Winthrop Pharmaceuticals (anteriormente Winthrop Labs). El cloruro de benzalconio es un agente tensioactivo antiinfeccioso de acción rápida con una actividad moderadamente larga. El agente tensioactivo es activo contra las bacterias y algunos virus, hongos  
25 y protozoos. Se considera que las esporas bacterianas son resistentes. Las soluciones de cloruro de benzalconio son bacteriostáticas o bacteriocidas según la concentración. El mecanismo exacto de la acción bacteriana del cloruro de benzalconio es desconocido, pero se piensa que es debido a la inactivación enzimática. Generalmente, la actividad del cloruro de benzalconio aumenta a medida que aumentan la temperatura y el pH. Las bacterias gram-positivas son más sensibles al cloruro de benzalconio que las bacterias gram-negativas.

30 Desafortunadamente, el cloruro de benzalconio es inactivado por los jabones, detergentes aniónicos, sueros y ciertas proteínas. En muchos laboratorios se ha dejado de contar con el cloruro de benzalconio por las razones anteriormente mencionadas. Cuando el cloruro de benzalconio se utilizó solo y se sometió a prueba vía tópica *in vivo*, era ineficaz para los brotes infecciosos del herpes simplex. Cuando se sometió a prueba *in vitro* sobre el VIH y los HSV 1 y 2, el cloruro de benzalconio demostró altos niveles no deseados de toxicidad celular incluso bajo altas diluciones, lo que es médicamente inaceptable. Se muestra a continuación la fórmula química del cloruro de benzalconio. Se pueden  
35 utilizar otros tipos de cloruro de benzalconio.

Cloruro de benzalconio:

40



### 55 Productos fitoquímicos

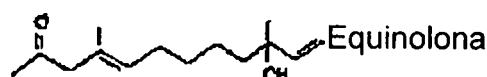
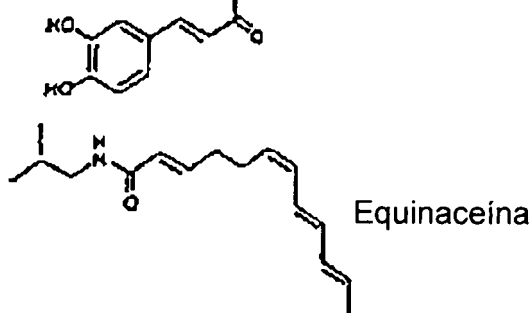
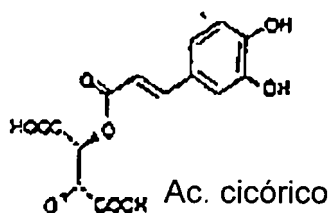
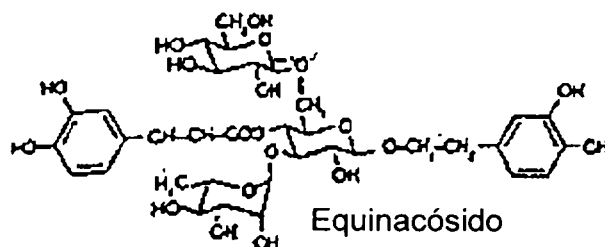
Aunque la *Echinacea* pura, no tratada, no procesada, no aislada, en general no sea deseable para tratar el VIH y el herpes de forma intramural, cuando está filtrada adecuadamente la administración intramural puede ser factible. En especial parece que algunos, pero no todos, los constituyentes aislados y extractos botánicos de *Echinacea* y *Commiphora* (tal como se han descrito anteriormente) proporcionan productos fitoquímicos, aislados antimicrobianos,  
60 extractos botánicos e inhibidores de microbios que tienen o muestran una actividad antimicrobiana y que parecen ser eficaces en el tratamiento del VIH, del virus del herpes y de otras enfermedades infecciosas.

Tal como se ha establecido anteriormente, la composición del concentrado fitoquímico comprende los siguientes constituyentes aislados, extractos botánicos, inhibidores microbianos y aislados antimicrobianos: polisacáridos, equinacena, equinaceína, equinacosido (éster del ácido cafeico), equinolona, equinadiol, enzimas, ácido glucurónico, inuloide, pentadecadieno, compuestos poliacetileno, arabinogalactano, ramnosa, PS I (un 4-O-metilglucoronoarabinosilano, M 35 kD) y PS II (un ácido ramnoarabinogalactano, M 450 kD), cinarina (ácido 1,5-di-O-cafeoilquínico), ácido  
65

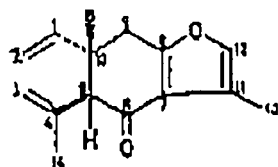
## ES 2 285 765 T3

achicórico (ácido 2,3-O-dicafeoiltartárico) y derivados, alquilamidas, ceto-alquinos y ceto-alquenos; quinonas; aceites que incluyen borneol, acetato de bornilo; pentadeca-8(z)-en-2-ona, germacreno D; cariofileno; epóxido de cariofileno; antocianinas alcaloides pirrolizidina; amidas lipofílicas, isobutilamidas; poliacetilenos; resina de goma mirra; curce-  
 renona (del tipo furanoeudesmano); dihidrofuranodien-6-ona; 2-metoxifuranodieno (del tipo furanoelemeno); elamol;  
 5 lindestreno (del tipo furanogermacrano); alquilamidas, apigenina, arabinogalacta, ácido ascórbico, ácido-behénico-  
 ácido etanoico, betaína, borneol, bornilacetato, ácido cafeico, 2-O-cafeoil-3-(5-alfa-carboxibeta), 3,4-dihidroxifenilo,  
 ácido 2-O-cafeoil-3-O-cumaroiltartárico, 6-O-cafeoilquinacósido, ácido 2-O-cafeoil-3-O-feruloiltartárico, ácido 2-O-  
 cafeoiltartárico, beta-caroteno, carofileno, carofileno-epóxido, ácido clorogénico, ácido cicórico, metil éster de ácido  
 10 cicórico, cianadin-3-O-(beta-d-glicopiranosido), cianadin-3-(6-O-malonil-beta-d-glucopiranosido), cinarina, isobutil  
 amida de ácido deca-(2e,4e,6e)-trienoico, des-ramnosilverbascósido, ácido 3,5-dicafeoilquinico, ácido 4,5-O-dica-  
 feoilquinico, ácido 2,3-O-diferuloltartárico, isobutil amida de ácido dodeca-(2e,4e)-dienoico, isovalerato de dodeca-  
 2,4-dien-1-ilo, isobutil amida de ácido dodeca-(2e,6z,8e,10e)-tetraenoico, epishobunol, beta-farneseno, ácido 2-O-fe-  
 ruloiltartárico, germacreno, heptadeca-(8z,11z)-dien-2-ona, heteroxilano, humuleno 8-12, (e)-10-hidroxi-4,10-dimetil-  
 15 4,11-dodecadien-2-ona, ácido 13-hidroxiocetadeca-(9z,11e,15z)-trienoico, ácido isoclorogénico, isorhamnetina-3-ruti-  
 nósido, isotusilagina, caempferol, caempferol-3-glucósido, caempferol-3-nutinósido, limoneno, luteolina, luteolina-7-  
 glucósido, magnesio, manganeso, 2-metiltetradeca-5,12-dieno, 2-metiltetradeca-6,12-dieno, metil-p-hidroxicinamato,  
 marcina, niacina, ácido palmítico, pentadeca-(8z,11z)-dien-2-ona, pentadeca-(8z,13z)-dien-11-lin-2-ona, pentadeca-  
 8-en-2-ona, pentadeca-(8z)-en-2-ona, pentadeca-(8z)-en-11,13-dien-2-ona, 1-pentadeceno, penta-(1,8z)-dieno, fósfo-  
 20 ro, alfa-pineno, beta-pineno, poliacetilenos, pontica epóxido, quercetagetina-7-glucósido, quercetina, quercetina-3-  
 galactósido, quercetina-3-glucósido, quercetina-3-robinósido, quercetina-3-xilósido, quercetina-3-xilosilgalactósido,  
 ramnoarabinogalactano, riboflavina, rutina, rutósido, selenio, silicato, beta-sitosterol, sitosterol-3-beta-O-glucósido,  
 sodio, estigmasterol, sulfato, ácido tartárico, tetradeca-(8z)-en-11,13-dien-2-ona, tiamina, n-triacontanol, trideca-1-  
 en-3,5,7,9,10-pentaína, tusilagina, vanilina, verbascósido, sesquiterpenos, ácido acético, alfa-amirona, arabinosa, alfa-  
 25 bisaboleno, gamma-bisaboleno, cadineno, campesterol, colesterol, cinamaldehído, commiferina, ácido alfa-comifori-  
 co, ácido beta-comiforico, ácido gamma-comiforico, ácido comiforínico, m-cresol, alcohol cúmico, cuminaldehído,  
 dipenteno, elemol, 3-epi-alfa-amirina, eugenol, furanodieno, furanodienona, galactosa, goma, heeraboleno, alfa-hee-  
 rabomirrol, beta-heerabomirrol, heeraborasena, limoneno, ácido 4-O-metilglucurónico, n-nonacosano, beta-sitosterol,  
 xilosa, caropilenos (carofilenos), linderstireno (lindestireno), caropilenos (carofilenos), resina de goma mirra, curce-  
 30 nona, dihidrofurandien-6-ona, 2-metoxifurandieno y linderstireno (lindestireno).

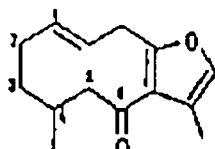
A continuación se muestran las fórmulas químicas de algunos de los extractos botánicos de *Echinacea*:



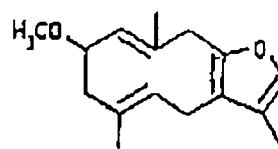
A continuación se muestran las fórmulas químicas de algunos de los extractos botánicos de *Commiphora myrrha*:



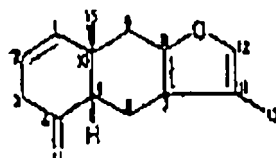
Curzerenona  
(Tipo furanoeudesmano)



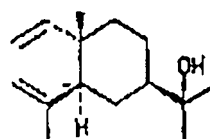
4,5-dihidrofuranodien-8-ona  
(Tipo furano)



2-metoxifurandiona



Undestrone  
(Tipo furanogermacrano)



Elemol

Algunas veces la mirra es denominada también myrrh, mirre, myrrhis, *gummi myrrha*, *myrrha vera*, mirra goma, resina de *Commiphora*, goma gruggal, resina gruggal, *Heerabol myrrh*, myrrhe, mirra *Manniliche*, Opopanax y mirra Hirabol. La mirra puede comprender resina de goma obtenida a partir de cortes realizados en la corteza de los árboles del género *Commiphora myrrha*, es decir el árbol de la mirra. La mirra puede comprender también jugos balsámicos procedentes de *Balsamodendron myrrha*, es decir, la mirra árabe, árbol buráceo. También se puede extraer la mirra de la *Osmorhiza* o *Washingtonia*, que se denomina también a veces, cicely dulce. El árbol de mirra es originario de Eritrea, Abisinia, Somalia, Yemen, Sudán y otros lugares.

Las especies de *Commiphora* que producen la mirra son arbustos o pequeños árboles de espinas puntiagudas y largas en el tallo. Las hojas desiguales trifolias son alternas y las flores pequeñas están dispuestas en panochas terminales. Cuando se hieren, los conductos esquizógenos de la resina producen la mirra del medicamento.

La mirra es una oleogoma resina secada al aire que exuda de la corteza de la especie *Commiphora*. El material comprende granos o grumos irregulares, redondeados de varios tamaños con agujeros y cuyo color va del marrón oscuro y casi negro al marrón anaranjado claro u oscuro; algunas partes pueden ser amarillas o de incoloras a amarillo pálido. La superficie está principalmente cubierta de un polvo gris que va del amarillo al gris; la fractura es concoidal y produce fragmentos finos, translúcidos. La mirra puede tener una fragancia dulce y un orden áspero y aromático. La mirra puede tener un sabor amargo y aromático. La mirra puede ser acre y puede pegarse a los dientes cuando se mastica.

La *Commiphora molmol* y demás especies de *Commiphora*, en cuanto a la composición química de su goma resina, es comparable con la de la mirra DAB 10. Existe una confusión considerable en la literatura con respecto a los orígenes de la mirra y la identidad de las especies de *Commiphora* involucradas. La mirra común (o hirabol) parece proceder de la *Commiphora myrrha*. Se dice que la mirra somalí proviene de la *Commiphora molmol*. Sin embargo, la relación sistemática (taxonómica) entre la *Commiphora myrrha* y la *Commiphora molmol* no queda clara. El origen de la mirra abisinia es la *Commiphora madagascariensis* o *Commiphora abyssinica*. Se piensa que el Opopanax, que se denomina también mirra bisabol o bdelio perfumado, procede de la *Commiphora erythraea* (Ehrenb) u Opopanax.

La composición de la mirra es muy compleja y sólo parcialmente conocida, del 40 al 60% de la mirra es soluble en etanol y comprende una resina y un aceite esencial. La mirra se compone casi en su totalidad de sesquiterpenos. Los principales componentes de los sesquiterpenos son furanosesquiterpenos del tipo germacrano, elemmano, eudesmano y guaiano. Además, aparecen hidrocarburos de sesquiterpeno, por ejemplo  $\beta$  y  $\delta$ -elemeno,  $\beta$ -bourboneno,  $\beta$ -cariofileno, humuleno y alcoholes de sesquiterpeno, por ejemplo elemol. Presumiblemente, algunos de los furanosesquiterpenos son característicos de la mirra farmacéutica. La goma cruda de mirra o mucílago incluye un 20% de proteínas y un 65% de carbohidratos, que consisten en galactosa, ácido 4-O-metilglucurónico y arabinosa. Los productos fitoquímicos de la mirra *Commiphora* comprenden ácido acético, alfa-amirona, arabinosa, alfa-bisaboleno, gamma-bisaboleno, cadineno, campesterol, colesterol, cinamaldehído, commiferina, ácido alfa-comifórico, ácido beta-comifórico, ácido gamma-comifórico, ácido comiforínico, m-cresol, alcohol cúmico, cuminaldehído, dipenteno, elemol, 3-epi-alfa-amirina, eugenol, furanodieno, furanodienona, galactosa, goma, heeraboleno, alfa-heerabomirrol, beta-heerabomirrol, heeraborasena, limoneno, ácido 4-O-metilglucurónico, n-nonacosano, beta-sitosterol, xilosa, caropilenos (carofilenos), resina de goma mirra, curcenona, dihidrofurandien-6-ona, 2-metoxifurandieno y linderstireno (lindestireno).

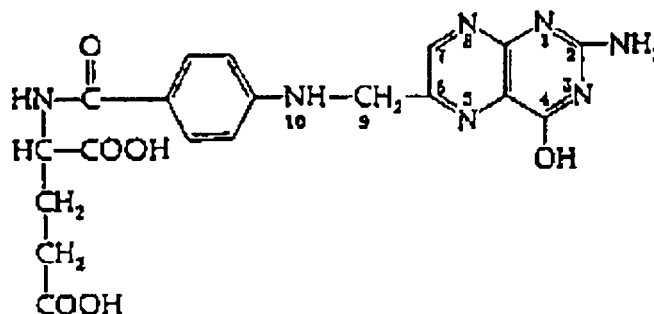
## ES 2 285 765 T3

La tintura de mirra puede tener un efecto antiinflamatorio. Macro y microscópicamente, la mirra puede aparecer como un polvo amarillo parduzco caracterizado por astillas amarillentas o granos esféricos de varios tamaños, junto con un material granular fino que se hincha en el agua. En cantidades de clorhidrato, se encuentran sólo unos pocos fragmentos de tejido procedentes del origen de la planta: fragmentos marrón rojizo de corcho, porciones individuales y grupos de células pétreas poliédricas a rectangulares, en parte con paredes muy aumentadas, picadas y lignificadas y contenido parduzco; fragmentos de parénquima de paredes finas y de fibras esclereoquimatosas y cristales de oxalato de calcio prismáticos a poliédricos irregulares de 10-25  $\mu\text{m}$ .

La mirra debe ser protegida de la luz y la humedad en recipientes bien cerrados. Es mejor con un desecante, ya que la parte carbohidrato del medicamento absorbe inmediatamente el agua. Preferentemente, no se debe almacenar la mirra en su forma en polvo.

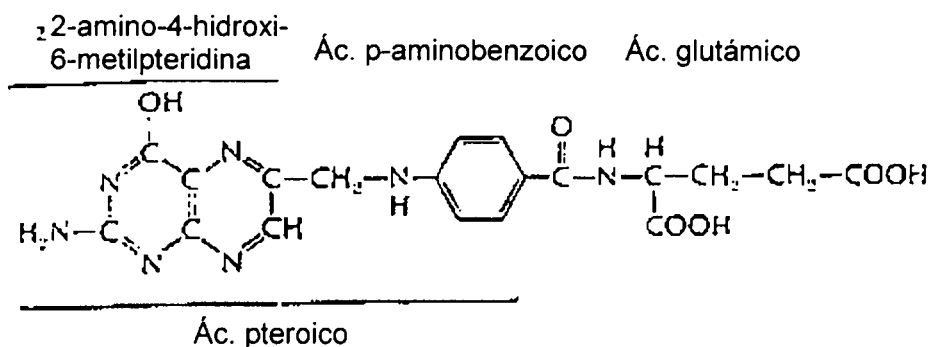
### Ácido fólico

El nutriente preferente para un mejor resultado es el ácido fólico. El ácido fólico, también denominado folacina, ácido pteroilglutámico, foldina, folaemina, foliamina, folicet, folipac, follettes, folsán, folvita, incafolic, millafol o citofol es una vitamina del complejo B amarilla, cristalina, soluble en agua, del grupo esencial para el crecimiento celular y la reproducción. El ácido fólico funciona como coenzima con las vitaminas B<sub>12</sub> y la vitamina C en la ruptura y utilización de las proteínas y en la formación de ácidos nucleicos y del hemo en la hemoglobina. El ácido fólico aumenta también el apetito y estimula la producción de ácido clorhídrico en el tracto digestivo. El ácido fólico se almacena en el hígado y puede ser sintetizado por la flora bacteriana del tracto gastrointestinal. Una deficiencia en ácido fólico puede resultar en un escaso crecimiento, pelo canoso, glositis, estomatitis, lesiones gastrointestinales y diarrea, y puede conducir a una anemia megaloblástica. La deficiencia es causada por una inadecuada ingesta alimenticia de la vitamina, una mala absorción o anomalías metabólicas. La necesidad de ácido fólico aumenta en el embarazo, la infancia y con el estrés. El ácido fólico es inestable tanto al calor como a la luz y se produce una pérdida considerable de vitamina cuando ha sido almacenado durante un período largo. El ácido fólico no es tóxico y es eficaz en el tratamiento específico de estados carenciales. A continuación se muestra la fórmula química del ácido fólico:



Ácido fólico (ácido pteroilglutámico)

Se presenta a continuación la estructura del ácido fólico:

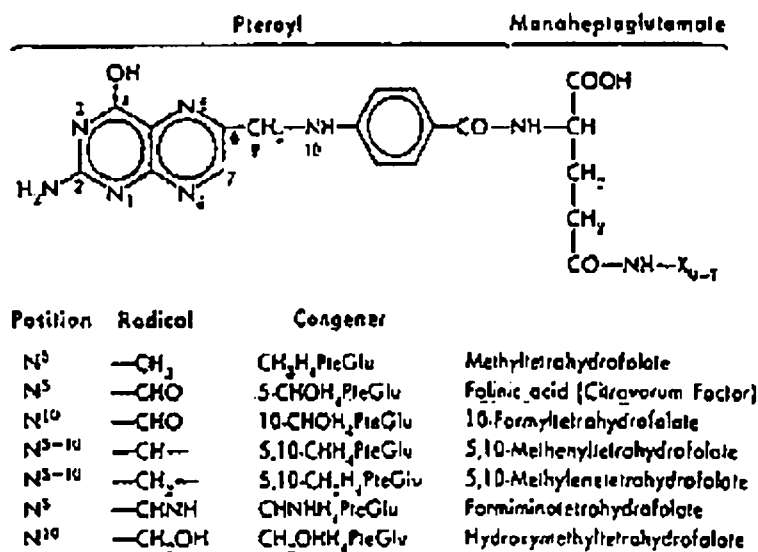


Ácido pteroilglutámico (ácido fólico)

## ES 2 285 765 T3

La molécula de ácido fólico contiene ácido glutámico, ácido p-aminobenzoico y una pterina; la combinación de la pterina y el ácido p-aminobenzoico se denomina ácido pterócido. La estructura mostrada es el ácido pteroilglutámico del hígado. El ácido fólico producido por las bacterias contiene tres residuos de ácido glutámico combinados en un enlace  $\gamma$ -glutamilo. Numerosos tejidos animales contienen ácido pteroilheptaglutámico, encontrándose de nuevo los residuos de ácido glutámico en el enlace  $\gamma$ -glutamilo. Los ácidos pteroilpoliglutámicos sintéticos, en los cuales las moléculas de ácido glutámico están enlazadas con enlaces glutamilo, son activos en los ensayos de crecimiento bacteriano; los ácidos pteroil- $\gamma$ -glutámicos son eficaces tanto frente a bacterias como en el tratamiento de la anemia macrocítica en el humano. Una enzima en los tejidos animales hidroliza los compuestos pteroilpoliglutamato naturales en ácido pteroilmonoglutámico y ácido glutámico libre.

Se muestra a continuación otra fórmula estructural del ácido pteroilglutámico (PteGlu<sub>1</sub>).



Estructuras y nomenclatura del ácido pteroilglutámico (ácido fólico).

La mayor parte de la molécula de ácido fólico incluye un anillo pteridina enlazado por un puente metileno al ácido para-aminobenzoico, que es unido por un enlace amida al ácido glutámico. Aunque el ácido pteroilglutámico sea la forma farmacéutica común del ácido fólico, no es el congénere principal del folato en los alimentos ni la coenzima activa para el metabolismo intracelular. Después de la absorción, el PteGlu<sub>1</sub> se reduce rápidamente en las posiciones 5, 6, 7 y 8 en ácido tetrahidrofólico (H<sub>4</sub>PteGlu<sub>1</sub>), que actúa entonces como aceptor de un número de unidades de un carbono. Éstas están unidas en la posición 5 o la posición 10 del anillo pteridina o puentean estos átomos para formar un nuevo anillo de cinco miembros.

La vitamina B<sub>12</sub> y el ácido fólico son productos alimenticios básicos para el ser humano. Una carencia de una de estas vitaminas resulta en la síntesis defectuosa del ADN en cualquier célula que intente la replicación y división cromosómicas. Como los tejidos con mayor velocidad de renovación celular muestran los cambios más drásticos, el sistema hematopoyético es especialmente sensible a las carencias de estas vitaminas. Clínicamente, la primera señal de carencia es una anemia megaloblástica, donde la desorganización en la síntesis del ADN resulta en una anomalía morfológica característica de las células precursoras en la médula ósea. Los glóbulos rojos macrocíticos anormales son el producto y el paciente se convierte en seriamente anémico.

La metilcobalamina soporta la reacción de la metionina-sintetasa, que es esencial para el metabolismo normal del folato. Los grupos metilo aportados por el metiltetrahydrofolato (CH<sub>3</sub>H<sub>4</sub>PteGlu<sub>1</sub>) son utilizados para formar la metilcobalamina que actúa entonces como donante del grupo metilo para la conversión de la homocisteína en metionina. Esta interacción folato-cobalamina es crucial para la síntesis normal de las purinas y pirimidinas y, por tanto, del ADN. La reacción de metionina-sintetasa es ampliamente responsable del control del reciclaje de los cofactores del folato, del mantenimiento de las concentraciones intracelulares de los folilpoliglutamatos, y, a través de la síntesis de metionina y su producto, la S-adenosilmetionina, del mantenimiento de diversas reacciones de metilación. Como el metiltetrahydrofolato es el principal congénere del folato suministrado a las células, la transferencia del grupo metilo a la cobalamina es esencial para el suministro adecuado del tetrahydrofolato (H<sub>4</sub>PteGlu<sub>1</sub>), sustrato para diversas etapas metabólicas. El tetrahydrofolato es un precursor para la formación de folilpoliglutamatos intracelulares; actúa asimismo como aceptor de una unidad de un carbono en la conversión de serina en glicina, con la formulación resultante de 5,10-metilenotetrahydrofolato (5,10-CH<sub>2</sub>H<sub>4</sub>PteGlu). El último derivado dona el grupo metileno al desoxiuridilato para la síntesis del timidilato, una reacción extremadamente importante en la síntesis del ADN. En el proceso, el 5,10-CH<sub>2</sub>H<sub>4</sub>PteGlu se convierte en dihydrofolato (H<sub>2</sub>PteGlu). El ciclo luego se completa con la reducción del H<sub>2</sub>PteGlu en

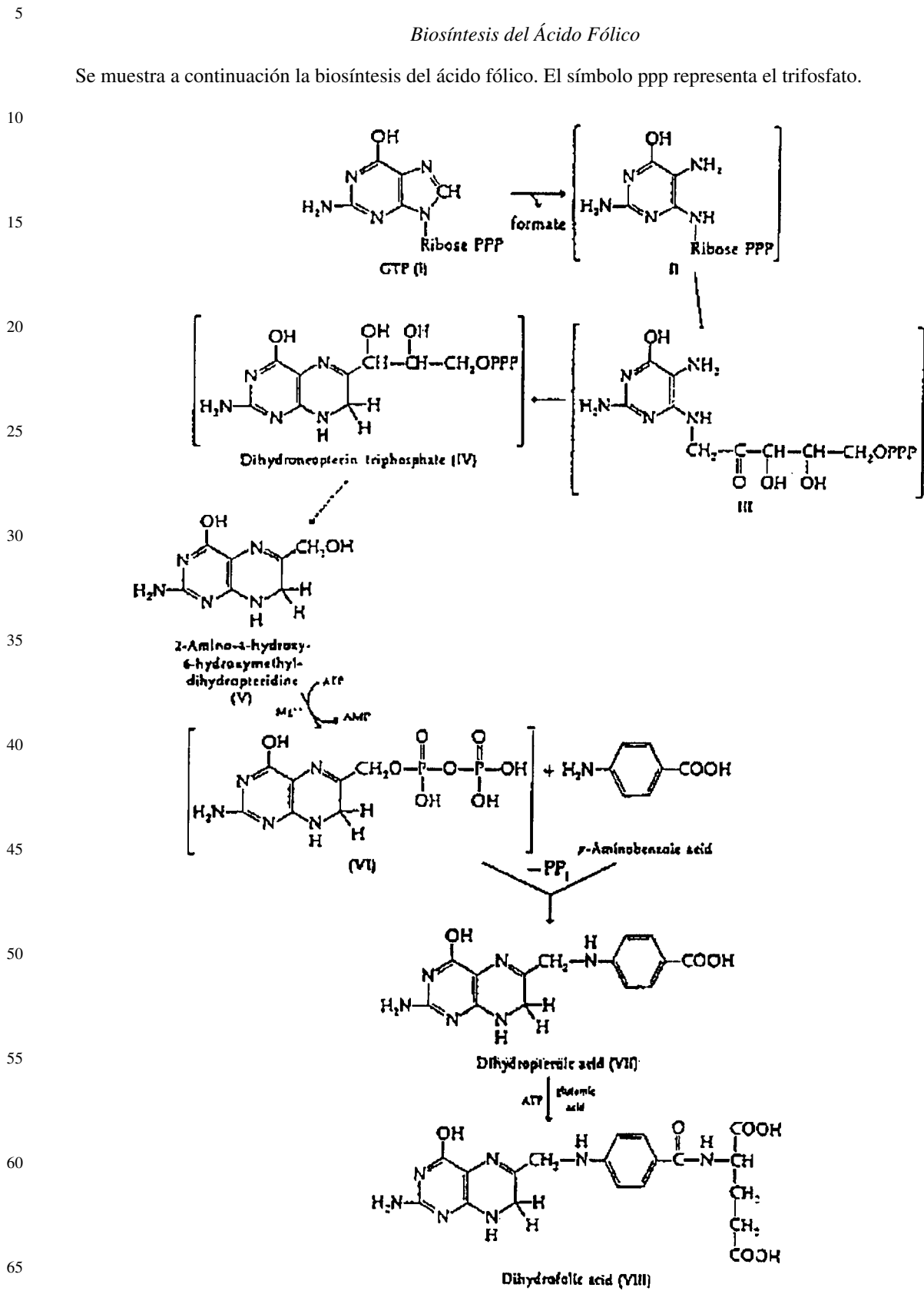
ES 2 285 765 T3

H<sub>2</sub>PteGlu por la dihidrofolato-reductasa, etapa que es bloqueada por los antagonistas del folato como el metotrexato. Otros caminos conducen también a la síntesis de 5,10-metilenotetrahidrofolato.

TABLA A

Biosíntesis del Ácido Fólico

Se muestra a continuación la biosíntesis del ácido fólico. El símbolo ppp representa el trifosfato.



## ES 2 285 765 T3

El folato puede ser transportado hacia los tejidos como  $\text{CH}_3\text{H}_4\text{PteG}_1$ . El hígado reduce y metila activamente el  $\text{PteGlu}_1$  (y  $\text{H}_2$  ó  $\text{H}_4\text{PteGlu}_1$ ) y luego transporta el  $\text{CH}_3\text{H}_4\text{PteGlu}_1$  en la bilis para la reabsorción por el intestino y el suministro posterior a los tejidos, el  $\text{CH}_3\text{H}_4\text{PteGlu}$  actúa como dador de metilo para la formación de la metilcobalamina y como fuente del  $\text{H}_4\text{PteGlu}$  y demás congéneres del folato, tal como se ha descrito anteriormente. El folato se almacena dentro de las células como poliglutamato.

### *Agentes tensioactivos*

Aunque el cloruro de benzalconio sea el agente tensoactivo preferente para obtener mejores resultados, en algunas circunstancias puede resultar deseable utilizar otros agentes tensioactivos de amonio cuaternarios u otros agentes tensioactivos.

El compuesto de amonio cuaternario puede ser cloruro de di-cocodiamonio, conocido también como cloruro de di-coco-alkuildimetilo, cloruros o cloruro de di-cocodimetilamonio o cloruros de Di-C8-18-alkuildimetilo. Este puede ser utilizado en combinación con isopropanol, tal como un 20-30% de isopropanol. El origen preferente del compuesto cuaternario comprende un 70-80% del compuesto de amonio cuaternario y menos de un 0,03% de cloruro de metilo, tiene un peso específico de aproximadamente 0,87 a 115°F (46°C), una presión de vapor de 33 mm/Hg a 68°F (20°C), un punto de ebullición inicial de 180°F (82°C) a 760 mm/Hg, y una volatilidad del 20-30%, y es producido con el nombre comercial CarSpray 300 por Witco Corporation, Dublin, Ohio, USA. El compuesto cuaternario puede proporcionar calidades desinfectantes y sirve de fungicida para tratar infecciones por hongos y levaduras.

Otros compuestos de amonio cuaternario pueden ser útiles, por ejemplo los producidos con el nombre comercial Jet Quat 2C-75 por Jetco Chemicals, Inc. de Corsicana, Texas, USA, o con los nombres comerciales Carspray 400 y Carnuba Spray 200 de Witco Corporation, Dublin, Ohio, USA, o que contienen un 9% de alcohol etílico desnaturado, como el vendido con el nombre comercial BTC 2125M por Stephan Company, Northfield, Illinois, USA, o los siguientes productos de MAQUAT, que comprenden cloruro de n-alkuildimetilbencilamonio producidos por Mason Chemical Company, Arlington Heights, Illinois, USA. LC-12S (67% de C12, 25% de C14, 7% de C16, 1% de C18), MC 1416 (5% de C12, 60% de C14, 30% de C16, 5% de C18), MC1412 (40% de C12, 50% de C14, 10% de C16), SC-18 de pasta o copo de estearilo (5% de C16, 95% de C18), TC-76 ó MQ-2525 (5% de C12, 60% de C14, 30% de C16, y 5% de C18) y MC6025-50% (25% de C12, 60% de C14 y 15% de C16). El Jet Quat 2C-75 comprende un 50-75% de cloruro de di-cocodimetilamonio cuaternario, un 20-50% de isopropanol, tiene un peso específico de 0,88 y un punto de ebullición de 180°F (82°C). CarSpray 400 comprende un 55-65% de un compuesto de amonio cuaternario, un 20-30% de aminas, C-14-18 y C16-18 alquilos insaturados, etoxilados, un 10-20% de isopropanol y menos de un 0,03% de cloruro de metilo, y tiene un peso específico de aproximadamente 0,88 a 75°F (24°C), una presión de vapor de 33 mm/Hg a 68°F (20°C), un punto de ebullición inicial de 180°F (82°C) a 760 mm/Hg y una volatilidad del 10-20%. El Carnuba Spray 200 comprende un 50-60% de compuestos de amonio cuaternarios, un 10-20% de isopropanol, un 15-25% de agua, un 1-10% de cera de carnaúba alquilada y menos de un 0,03% de cloruro de metilo, y tiene un peso específico de aproximadamente 0,90 a 80°F (27°C), una presión de vapor de 33 mm/Hg a 68°F (20°C), un punto de ebullición inicial de 180°F (82°C) a 760 mm/Hg y una volatilidad del 20-40%.

Los agentes tensioactivos no iónicos son compuestos activos en superficie que no se ionizan en solución acuosa. Muchas veces éstos poseen características hidrofílicas en virtud de la presencia de una cadena oxigenada (por ejemplo, una cadena polioxietileno), procediendo la parte liofílica de la molécula de ácidos grasos, fenoles, alcoholes, amidas o aminas. Los compuestos típicos son condensados de poli(óxido de etileno) de alquilfenoles, por ejemplo el producto de condensación formado a partir de un mol de nonilfenol y diez moles de óxido de etileno, y los productos de condensación de alcoholes alifáticos y óxido de etileno, por ejemplo el producto de condensación formado a partir de 1 mol de tridecanol y 12 moles de óxido de etileno.

Los agentes tensioactivos no iónicos pueden comprender etoxilatos de fenol que comprenden un producto condensado de óxido de etileno y un alquilfenol o un alcohol alifático. Los agentes tensioactivos no iónicos comprenden preferentemente etoxilato de nonilfenol como T-DET y/o etoxilato de octilfenol. Los agentes tensioactivos son los productos de reacción de óxido de etileno y nonilfenol y/o octilfenol. La proporción entre el fenol y el óxido de etileno puede oscilar entre 2:20 y 4:16 y se encuentra preferentemente en 8:12 aproximadamente.

Los agentes tensioactivos no iónicos sintéticos pueden comprender detergentes no iónicos. Los agentes tensioactivos no iónicos sintéticos pueden formarse también mediante condensación de óxido de etileno con una base hidrófoba, formada por condensación de óxido de propileno con propilenglicol. La parte hidrófoba de la molécula que, por supuesto, es insoluble en agua, tiene un peso molecular de aproximadamente 1.200 a 2.500. La adición de radicales de polioxietileno a esta parte hidrófoba tiende a incrementar la solubilidad en agua de la molécula como un todo y el carácter líquido del producto puede conservarse hasta el punto donde el contenido en polioxietileno es de aproximadamente un 50% del peso total del producto de condensación. Otros agentes tensioactivos no iónicos sintéticos pueden incluir condensados de óxido de polietileno de alquilfenoles, por ejemplo productos de condensación de alquilfenoles o dialquilfenoles en los cuales el grupo alquilo contiene aproximadamente de 6 a 12 átomos de carbono en una configuración de cadena lineal o cadena ramificada, con óxido de etileno. El óxido de etileno puede estar presente en cantidades de 8 hasta 25 moles de óxido de etileno por mol de alquilfenol. El sustituyente alquilo en estos compuestos puede ser un derivado de propileno polimerizado, diisobutileno, n-octeno o n-noneno.

## ES 2 285 765 T3

Los agentes tensioactivos no iónicos pueden obtenerse también a partir de la condensación de óxido de etileno con el producto de reacción de óxido de propileno y etilendiamina, por ejemplo compuestos que contienen desde aproximadamente un 40% hasta aproximadamente un 80% de polioxi-etileno en peso y que tienen un peso molecular de aproximadamente 5.000 hasta aproximadamente 11.000 que resultan de la reacción de los grupos óxido de etileno con una base hidrófoba que comprende el producto de reacción de etilendiamina y un exceso de óxido de propileno; teniendo la base un peso molecular del orden de 2.500 a 3.000.

Otros agentes tensioactivos no iónicos incluyen el producto de condensación de alcoholes alifáticos de 8 a 18 átomos de carbono, en una configuración de cadena lineal o ramificada, con óxido de etileno, por ejemplo una condensación de óxido de etileno y alcohol de coco que tiene de 10 a 30 moles de óxido de etileno por mol de alcohol de coco, y teniendo la fracción de alcohol de coco de 10 a 14 átomos de carbono.

Otros agentes tensioactivos no iónicos incluyen óxidos de amina terciaria de cadena larga que corresponden a la siguiente fórmula general:  $R_1R_2R_3N \rightarrow O$ , en la cual  $R_1$  es un grupo alquilo de aproximadamente 8 a 18 átomos de carbono, y  $R_2$  y  $R_3$  son cada uno grupos metilo o etilo. La flecha en la fórmula es una representación convencional de un enlace semipolar. Ejemplos de óxidos de amina adecuados para su utilización incluyen óxido de dimetildodecilamina, óxido de dimetiloctilamina, óxido de dimetildecilamina, óxido de dimetiltetradecilamina y óxido de dimetilhexadecilamina.

Otros agentes tensioactivos no iónicos pueden incluir óxidos de fosfina terciarios de cadena larga, correspondientes a la siguiente fórmula general:  $RR'R''P \rightarrow O$ , en la cual R es un grupo alquilo, alqueno o monohidroalquilo que oscila entre 10 a 18 átomos de carbono de longitud de cadena y  $R'$  y  $R''$  son ambos grupos alquilo o monohidroalquilo que contienen de 1 a 3 átomos de carbono. La flecha en la fórmula es una representación convencional de un enlace semipolar. Ejemplos de óxidos de fosfina adecuados son óxido de dimetildodecilfosfina, óxido de dimetiltetradecilfosfina, óxido de etilmetiltetradecilfosfina, óxido de cetildimetilfosfina, óxido de dimetilestearilfosfina, óxido de cetilpropilfosfina, óxido de dietildodecilfosfina, óxido de dietiltetradecilfosfina, óxido de dipropildodecilfosfina, óxido de bis(2-hidroximetil)dodecilfosfina, óxido de bis(2-hidroxi-etil)dodecilfosfina, óxido de (2-hidroxipropil)metiltetradecilfosfina, óxido de dimetileilfosfina y óxido de dimetil(2-hidroxidodecil)fosfina.

En algunas circunstancias, puede resultar útil utilizar otros agentes tensioactivos tales como otro agente tensioactivo catiónico, un agente tensioactivo anfótero o un agente tensioactivo zwitteriónico.

Los agentes tensioactivos catiónicos pueden incluir detergentes catiónicos. Los agentes tensioactivos catiónicos comprenden compuestos que se ionizan en un medio acuoso para producir cationes que contienen el grupo liofílico. Son compuestos típicos las sales de amonio cuaternarias que contienen un grupo alquilo de aproximadamente 12 a aproximadamente 18 átomos de carbono, tal como cloruro de laurilbencildimetilamonio.

Los agentes tensioactivos anfóteros son compuestos que tienen grupos tanto aniónicos como catiónicos en la misma molécula. Son compuestos típicos los derivados de aminas alifáticas de cadena larga de aproximadamente 8 a aproximadamente 18 átomos de carbono y un grupo aniónico soluble en agua, por ejemplo carboxisulfo, sulfo o sulfato. Ejemplos de detergentes anfóteros son sulfonato de 3-dodecilaminopropano-sodio, taurato de N-metil-sodio y sustancias asociadas, tales como aminoácidos superiores alquil disustituidos, betaínas, tetinas, aminas olefínicas sulfatadas de larga cadena olefínica y derivados sulfatados de imidazolina.

Los agentes tensioactivos zwitteriónicos pueden incluir detergentes sintéticos. En general, los agentes tensioactivos zwitteriónicos se derivan de compuestos alifáticos de amonio cuaternarios en los cuales el grupo alifático puede ser una cadena lineal o ramificada y donde uno de los sustituyentes alifáticos contiene desde aproximadamente 8 hasta 18 átomos de carbono y uno contiene un grupo aniónico soluble en agua, por ejemplo carboxi, sulfo o sulfato. Ejemplos de compuestos englobados en esta definición son 3-(N,N-dimetil-N-hexadecilamonio)-propano-1-sulfonato y 3-(N,N-dimetil-N-hexadecilamonio)-2-hidroxipropano-1-sulfonato.

### Farmacología clínica

Cuando los productos fitoquímicos (aislados antimicrobianos, extractos botánicos e inhibidores de microbios) de *Echinacea* y *Commiphora* fueron mezclados, combinados y aplicados con un agente tensioactivo, preferentemente cloruro de benzalconio, un soporte nutriente, preferentemente ácido fólico, y un soporte estéril acuoso, los resultados fueron inesperados y sorprendentemente buenos en la resolución (tratamiento) del VIH y demás enfermedades infecciosas y la eficacia del medicamento (microbicida) aumentó drásticamente. En especial, cuando se sometió a prueba *in vitro*, el único compuesto demostró inesperada y sorprendentemente una buena actividad antivírica contra el VIH, incluida la inhibición de la unión del VIH a células diana. Cuando se sometió a prueba tópicamente *in vivo* el medicamento sinérgico, se interrumpieron inmediatamente las infecciones por herpes simplex. Cuando se sometió a prueba *in vitro* el medicamento sinérgico, el agente tensioactivo de cloruro de benzalconio fue sustancialmente menos tóxico y se mantuvo dentro de un nivel seguro y se encontró un nivel más alto de actividad inhibitoria contra el VIH y los HSV 1 y 2. La interacción sinérgica y la mezcla de los productos fitoquímicos de *Echinacea* y *Commiphora*, el ácido fólico y el agente tensioactivo fueron demostradas y observadas considerando la solubilidad rápida de los componentes cuando se mezclan y la ligera calidad adhesiva creada por las propiedades en solución. Además, las propiedades químicas de los productos fitoquímicos de *Echinacea* y *Commiphora*, del soporte nutriente del agente tensioactivo (nutriente) y



## ES 2 285 765 T3

del soporte acuoso aumentaron la estabilización e incrementaron la reactividad, lo cual es útil en el tratamiento de las enfermedades infecciosas.

5 El medicamento puede utilizarse en varias diluciones en la mucosa bucal y nasal; tejido vaginal; tejido labial; tejido anal y perianal; tejido del pene; tejido cutáneo, tejido subcutáneo abierto; y en diluciones más altas en infecciones oculares; preferentemente por administración rectal o vaginal. Al variar las concentraciones, el medicamento puede ser administrado posiblemente de forma parenteral. El medicamento puede estar contraindicado en los conductos vaginales o anales; en apósitos en paquete; en el canal auditivo; apósitos oclusivos; escayolas o ingestión y este uso puede producir irritación o quemaduras químicas. Puede no ser aconsejable utilizar el medicamento para tratar 10 infecciones fúngicas anaeróbicas, ya que algunos hongos pueden ser resistentes.

Ejemplos 1 - 7

### *Pruebas In Vivo*

15 En una aplicación inicial, tópica, se emprendió un estudio *in vivo* para evaluar los efectos del tratamiento médico y del medicamento de la presente invención en siete sujetos humanos de prueba que dieron positivo para el HSV 1 ó 2. Los sujetos fueron tratados tópicamente con el medicamento que comprendía el agente tensioactivo de cloruro de benzalconio en solución acuosa (en una proporción de 1:750) en combinación con el producto botánico herbáceo 20 *Echinacea purpurea* en forma de polvo que contenía los productos fitoquímicos anteriormente relacionados. La aplicación de la composición se realizó mediante un procedimiento en dos etapas, humidificando primero la zona afectada o vesícula con el agente tensioactivo de cloruro de benzalconio en solución acuosa mediante pulverización, toques o con un cuentagotas; luego aplicando un recubrimiento de los productos fitoquímicos en polvo sobre la zona humidificada mediante torunda o espolvoreando manualmente el polvo sobre la zona infectada. Un importante aspecto en este 25 tratamiento fue el hecho de mantener el revestimiento completo de la zona afectada mientras duraba el brote. Por ello, la zona del brote se mantuvo cubierta con la composición medicinal volviendo a aplicarla si hacía falta.

De los siete sujetos, seis eran mujeres y uno era varón. Al principio de este estudio, la edad del varón era de 38 años, los sujetos mujeres tenían 8, 27, 30, 32, 38 y 39 años. Hubo doce brotes infecciosos durante aproximadamente 30 seis semanas. Nueve de los brotes fueron de HSV 2, herpes genital, y tres fueron HSV 1, llagas frías. Las mujeres de 8 y 27 años de edad dieron muestras de HSV 1 (llagas frías). Las mujeres de 30, 38 y 39 años de edad dieron muestras de HSV 2 (herpes genital). La de 38 años de edad tenía también llagas frías de HSV 1. El varón dio muestras de HSV 2 (herpes genital). Todos los sujetos sometidos a prueba tenían una historia bien probada de la enfermedad y pudieron identificar el curso estándar de su enfermedad. Para obtener datos objetivos, ninguno de los sujetos sometidos a prueba 35 conocía nada sobre el tratamiento de prueba o acción cualquiera del medicamento. En las pruebas de repetición, se dijo a los sujetos que podía haber placebos mezclados en las muestras de la fórmula.

En siete casos, el compuesto antimicrobiano (medicamento) fue aplicado directamente en el tejido en la etapa de pródromo. En cinco casos, el compuesto antimicrobiano fue aplicado directamente sobre las vesículas en erupción. El 40 compuesto antimicrobiano se volvió a aplicar según era necesario para mantener el revestimiento.

*Observaciones:* con cada aplicación del medicamento, cada individuo (sujeto de prueba) indicó una sensación de hormigueo durante unos segundos. Indicaron también que existía un grado sustancial de adherencia del compuesto medicinal (antimicrobiano) a la(s) vesícula(s) o zona afectada. La adherencia de la composición al tejido epitelial 45 permaneció hasta cierto grado aun después de duchar o enjuagar con agua la zona.

*Resultados:* los resultados de las pruebas de los 7 sujetos con el tratamiento médico y la medicina fueron inesperados y sorprendentemente buenos y muy coherentes. En cada caso, el sujeto indicó felizmente que una vez aplicada la 50 composición (medicamento) a la zona afectada, el dolor se interrumpió totalmente a los 10 a 20 minutos, cuando nada en el pasado había calmado el dolor antes. En los siete casos, en los cuales se aplicó el compuesto (medicamento) en la etapa de pródromo, los sujetos indicaron que el dolor había parado, todos los síntomas que se hubieran intensificado anteriormente hasta un brote total cesaron y el brote no se volvió a producir. Todos los síntomas externos y manifestaciones físicas del herpes desaparecieron a las pocas horas después de aplicar el medicamento. En cinco casos, en los cuales se aplicó el compuesto (medicamento) a vesículas en erupción, los sujetos indicaron que el dolor se había 55 interrumpido en unos minutos y que la quemazón, picor e irritación se habían resuelto en dos a cuatro horas y que las vesículas se habían secado y habían desaparecido en veinticuatro horas. En todos los casos, los demás síntomas más extremos debilitadores, fiebre, malestar, hinchazón inguinal, llagas supurantes y dolor con la orina, cesaron una vez aplicada la medicina.

60 En el seguimiento en el cual se suministró a los sujetos la composición (medicamento) para someter a prueba los futuros brotes, se comunicó que si las señales iniciales de un brote aparecían, señalando la etapa de pródromo un brote, el compuesto (medicamento) era aplicado inmediatamente por los sujetos según las instrucciones y se paraba y resolvía totalmente el brote. Especialmente los sujetos que estaban acostumbrados a experimentar varios brotes al año, indicaron también que tenían períodos de latencia notablemente más largos. En un seguimiento de tres años 65 con un individuo que había indicado severos brotes todos los meses durante los cuatro años anteriores al empleo de este medicamento, informa ahora que no ha tenido ningún brote durante un año desde que está utilizando este medicamento.

## ES 2 285 765 T3

*Observaciones Adicionales:* un sujeto humano varón informó que después de la aplicación inicial durante la fase de pródromo de un brote se duchó y olvidó volver a aplicar la composición (medicamento) durante un período de aproximadamente 30 horas. En consecuencia, varias vesículas entraron en erupción y empezaron a juntarse. El sujeto procedió a reaplicar la composición (medicamento) y a continuación mantuvo la zona bien revestida con la composición. Posteriormente, el brote se resolvió en 21 horas de la misma manera que la descrita con los demás sujetos humanos.

Otra observación indicaba que la composición (medicamento) puede debilitarse o ser menos eficaz en presencia de ciertas proteínas o jabones. Un sujeto humano mujer puede haber tenido un exceso de celo en limpiar la zona afectada antes de la aplicación de la composición (medicamento). Esto ocurrió durante un tercer brote después de haber tenido éxito con la composición (medicamento) en los dos brotes anteriores. En este caso, cuando se aplicó la composición (medicamento), no había sensación familiar de hormigueo y ningún alivio de los síntomas. Transcurrieron aproximadamente 24 horas antes de que buscara consejo y el brote se había intensificado hasta la etapa de erupción vesicular total con todos los síntomas anteriormente mencionados de la enfermedad. Se le dieron instrucciones de enjuagar minuciosamente todo residuo de jabón de la zona, secar la zona y volver a aplicar la composición (medicamento). Tras haber seguido las instrucciones, informó que el brote se había resuelto totalmente, como lo había hecho en los dos brotes anteriores, mediante la aplicación de la composición medicinal.

Ejemplos 8 - 13

### Pruebas Dermatológicas y Veterinarias

Se realizaron pruebas en animales para determinar cualquier posible reacción dermatológica alérgica inducida por la composición medicinal (medicamento). Se utilizaron seis sujetos animales. Los animales incluyeron 3 conejos hembra (edades no conocidas); 2 perros (1 hembra de 2 años y 1 macho de 9 años); un gato macho castrado de 3 años de edad. En estas pruebas con animales, se aplicó la composición anteriormente mencionada (medicamento) según el método anteriormente establecido en la parte interna del oído externo de cada animal. En todos los casos, la zona que se estaba tratando se mantuvo recubierta con el compuesto durante veinticuatro horas, coincidiendo con el tiempo que los sujetos humanos la habían utilizado. Las pruebas realizadas en los seis sujetos animales indicaban que no había señales de irritación dermatológica o reacción alérgica.

Ejemplo 14

El compuesto medicinal anterior que contenía inhibidores víricos fue sometido a prueba también sobre una verruga causada por el virus de papiloma en el hocico de un caballo purasangre castrado de dos años de edad. Las verrugas del virus de papiloma son difíciles de tratar. La verruga medía 25 mm de diámetro. Se aplicó el compuesto antimicrobiano (medicamento) dos veces al día. Se midió luego la verruga en cada aplicación.

*Resultados:* De forma totalmente inesperada, la verruga se redujo drásticamente en su tamaño de aproximadamente 3 mm por día mientras se aplicaba el medicamento a la verruga y al quinto día se cayó completamente. Se observó que, al principio, las capas superficiales de la verruga empezaron a degradarse, exponiendo grandes pápulas eritematosas. Luego, las verrugas no sólo disminuyeron en tamaño mediante exfoliación o descamación, sino que disminuyeron hasta el punto de fijación en la epidermis del sujeto y cayeron todavía algo intactas, sin marcas como secuela.

En un estudio *in vivo* continuo a largo plazo de esta invención, que empezó con los primeros siete sujetos en abril de 1989 y abarca ahora 7 años, aproximadamente 100 brotes infecciosos han sido tratados con el medicamento en distintas concentraciones, tal como se ha descrito anteriormente. En todos los casos los resultados sorprendentemente buenos fueron los mismos: 1. el dolor desapareció en unos minutos; 2. no se produce ningún brote cuando se aplica la composición en la etapa de pródromo; 3. el brote se resuelve en veinticuatro horas cuando es aplicado en la etapa vesicular.

### Pruebas *In Vitro*

Se realizaron pruebas en el laboratorio en la Universidad de Chicago, Clinical Microbiology Laboratories, para determinar la actividad inhibidora *in vitro* del tratamiento médico y de la composición (medicamento). Las pruebas en laboratorio fueron dirigidas por el Director Adjunto, PhD, y el Profesor Adjunto de Patología. Las pruebas *in vitro* de la composición medicinal, denominada a continuación "Medicamento", sorprendentemente produjeron buenos resultados. Se determinó que el tratamiento médico y la composición inesperadamente tenían una excelente actividad inhibidora sorprendente en el HSV 1 y el HSV 2. El patólogo indicó que había ensayado "cientos" de otros compuestos y que no había visto nunca nada tan bueno como este compuesto.

Lo siguiente son las pruebas del medicamento que se realizaron y los resultados que se obtuvieron en la Universidad de Chicago. Para facilitar la interpretación de algunos datos científicos y resultados de pruebas, son aplicables las siguientes definiciones:

"MEM" indica un Minimal Essential Medium (Medio Mínimo Esencial). Este es el medio de cultivo utilizado en los laboratorios para cultivar las células sobre las cuales se realizaron las pruebas.

## ES 2 285 765 T3

“Fibroblasto” es una célula humana del mesénquima (una célula que se encuentra en el tejido conectivo, la sangre, los huesos, el sistema linfático y el cartílago).

5 “IC<sub>50</sub>” indica Inhibitory Concentrate (Concentración de Inhibición). Para estas pruebas, como es típico, se seleccionó un punto final del 50%. El número que sigue indica la mayor dilución por debajo del 50%. Por lo tanto, es la definición del punto final.

10 Si una zona bajo dilución se queda en blanco, indica que puede haber habido toxicidad a esta dilución, puede que no haya valido la pena leer la prueba, o que no se disponga de ningún dato interpretable.

Si una zona bajo dilución está marcada con un guión (-), indica que no se encuentran placas y que hay una inhibición exitosa del herpes (HSV).

Ejemplos 15 - 17

15 En estas pruebas *in vitro* se utilizaron las siguientes drogas (medicamentos):

Medicamento #1 de Referencia = Agente tensioactivo de cloruro de benzalconio en solución acuosa en una proporción 1:750. El agente tensioactivo en solución acuosa se filtró antes de su uso y se diluyó en un volumen igual de 2X MEM para producir una dilución al 1:1.500 en 1X MEM.

25 Medicamento #2 de Referencia = Polvo de *Echinacea* (productos+ fitoquímico) en solución acuosa. Esta preparación fue extraída por infusión caliente en agua estéril. El producto fitoquímico extraído se centrifugó y filtró antes de su uso. El producto fitoquímico filtrado fue diluido en un volumen igual de 2X MEM para producir la preparación no diluida en 1X MEM.

30 Medicamento #3 de Referencia = Se extrajo polvo de *Echinacea* (producto fitoquímico) y se combinó con el agente tensioactivo de cloruro de benzalconio mediante un proceso de infusión en frío. La preparación combinada se centrifugó y filtró antes de su uso y se diluyó en un volumen igual de 2X MEM para producir la preparación no-diluida en 1X MEM.

35 1. Tres placas de 24 compartimentos fueron inoculadas con fibroblastos. Se utilizaron tres extracciones diferentes (para su comparación) en cinco concentraciones de la composición para controlar la actividad antivírica en las concentraciones de 1:2, 1:4, 1:8 y 1:16 no diluidas en 1X MEM. Existían cuatro compartimentos de control en cada placa que contenían MEM sin medicamento.

40 2. Se eliminaron los medios de cultivo de los compartimentos y se añadieron 200  $\mu$ l de HSV-1 a cada compartimento de la mitad superior de cada placa. El HSV-1 se diluyó al 1:5.000 (2,0  $\mu$ l de stock de HSV-1 en 10 ml de MEM). La valoración del virus fue de  $3 \times 10^6$  por ml. Asimismo, se añadieron 200  $\mu$ l de HSV-2 a cada compartimento de la mitad inferior de cada placa. El HSV-2 se diluyó al 1:2.000 (5,0  $\mu$ l de stock de HSV-2 en 10 ml de MEM). La valoración del virus fue de  $6 \times 10^5$  por ml.

3. Se incubaron las placas a 37°C durante dos horas.

45 4. Se eliminó el inóculo y se añadió 1 ml de MEM que contenía los Medicamentos #1-3 a los cuatro compartimentos. Se indica a continuación la concentración del medicamento en comparación con el MEM.

50 TABLA 1

Concentración	No diluido	1:2	1:4	1:8	1:16
Medicamento ( $\mu$ l)	4.000	2.000	1.000	500	250
MEM ( $\mu$ l)	-	2.000	3.000	3.500	3.750

60 5. Resultados: HSV-1, revestimiento de líquido, medicamento añadido inmediatamente después de la absorción del virus.

Placa 1, Medicamento #1 contaminada con bacterias. Ningún cultivo, quizás restos.

65 Placa 2, Medicamento #2 contaminada con bacterias. Ningún cultivo, quizás restos.

Placa 3, Medicamento #3. Se indican los resultados en las Tablas 2 y 3 a continuación.

## ES 2 285 765 T3

TABLA 2

*Medicamento #3 - HSV-1 - Resultados de las Pruebas*

<b>Concentración</b>	<b>No diluido</b>	<b>1:2</b>	<b>1:4</b>	<b>1:8</b>	<b>1:16</b>
Placas 54	tóxico	tóxico	-	6*	12**
Placas 42	tóxico	tóxico	-	4*	16**
Promedio 48				5	14

IC<sub>50</sub> > 1:16 \*ligera toxicidad

\*\*placas muy pequeñas

TABLA 3

*Medicamento #3 - HSV-2 - Resultados de las Pruebas*

<b>Concentración</b>	<b>Nodiluido</b>	<b>1:2</b>	<b>1:4</b>	<b>1:8</b>	<b>1:16</b>
Placas 46	tóxico	tóxico	-	22*	32**
Placas 49	tóxico	tóxico	-	21*	28**
Promedio 48				22	30

IC<sub>50</sub> > 1:8 \*ligera toxicidad

\*\*placas muy pequeñas

Comentarios: Las pruebas con el Medicamento #3 dieron excelentes resultados. Las células parecían estar bien, sin contaminación. A diluciones más bajas, la preparación puede ser tóxica para algunas de las células. Esta preparación fue inesperadamente exitosa en su actividad inhibitoria.

### Ejemplos 18 - 20

Tres placas de 24 compartimentos fueron inoculadas con fibroblastos y los siguientes medicamentos:

Medicamento de Prueba #1A de Referencia = Agente tensioactivo de cloruro de benzalconio en solución acuosa. El agente tensioactivo de cloruro de benzalconio se preparó realizando una dilución al 1:375 en agua (32 µl en 12,0 ml de agua estéril). Este se filtró antes de su uso. Se diluyó en un volumen igual de 2X MEM para producir una dilución al 1:750 en 1X MEM. Se realizó la dilución para mantener la proporción.

Medicamento de Prueba #2A de Referencia = Polvo de *Echinacea purpurea* (producto fitoquímico) en solución acuosa. Esta preparación era una solución de 50 mg/ml (300 mg en 6,0 ml de agua) de polvo de *Echinacea purpurea* en agua estéril. La mezcla se agitó y se refrigeró durante cuatro horas. La preparación de polvo de *Echinacea* se centrifugó a 3.500 rpm durante 15 minutos a 10°C y se filtró antes de su uso y luego se diluyó en un volumen igual de 2X MEM para producir la preparación no diluida en 1X MEM.

Medicamento de Prueba #3A de Referencia = Polvo de *Echinacea purpurea* (producto fitoquímico) se disolvió en el agente tensioactivo de cloruro de benzalconio. Esta preparación era una solución de 50 mg/ml (300 mg en 6,0 ml de cloruro de benzalconio, 1:375). La mezcla se agitó y se refrigeró durante cuatro horas. La mezcla de producto fitoquímico y agente tensioactivo se centrifugó a 3.500 rpm durante 15 minutos a 10°C y se filtró antes de su uso, y luego se diluyó en un volumen igual de 2X MEM para producir la preparación no diluida en 1X MEM.

1. Se utilizaron tres placas para controlar las tres preparaciones de medicamento. Las concentraciones necesarias para controlar la actividad antivírica fueron de 1:2, 1:4, 1:8 y 1:16 en 1X MEM. Existían cuatro compartimentos de control en cada placa que contenían MEM sin medicamento.

2. Se eliminaron los medios de cultivo de los compartimentos y se añadieron 200 µl de HSV-1 a cada compartimento de la mitad superior de cada placa. El HSV-1 se diluyó a 1:5.000 (2,0 µl de stock de HSV-1 en 10 ml de MEM). La valoración del virus fue de 3 x 10<sup>6</sup> por ml.

3. Se incubaron las placas a 37°C durante cuatro horas.

## ES 2 285 765 T3

4. Se eliminó el inóculo y se añadió 1 ml de MEM que contenía los Medicamentos #1A-3A a los cuatro compartimentos.

5

TABLA 4

Concentración	No diluido	1:2	1:4	1:8	1:16
Medicamento (µl)	4.000	2.000	1.000	500	250
MEM (µl)	-	2.000	3.000	3.500	3.750

15

5. Resultados: HSV-1, revestimiento de líquido, composición añadida inmediatamente después de la absorción del virus.

20

TABLA 5

*Medicamento #1A - HSV-1 - Resultados de las Pruebas*

Concentración	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32
Placas 70	tóxico	tóxico	tóxico	tóxico	tóxico
Placas 68					
Placas 58					
Placas 74					
Promedio 70					

35

IC<sub>50</sub>

Comentarios: Estos compartimentos tienen un fino precipitado sobre las células. El cloruro de benzalconio precipita probablemente con la proteína en el medio.

40

TABLA 6

*Medicamento #2A - HSV-1 - Resultados de las Pruebas*

Concentración	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32
Placas 72	-	-	-	9*	12*
Placas 74	-	-	-	7	8
Placas 79	-	-	-	4	12
Placas 71	-	-	-	7	11
Promedio 70					

50

55

IC<sub>50</sub> > 1:32

60

Comentarios: Aunque hubiera algunas placas, eran muy pequeñas.

65

## ES 2 285 765 T3

TABLA 7

*Medicamento #3A - HSV-1 - Resultados de las Pruebas*

Concentración	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32
Placas 72	tóxico	tóxico	tóxico	tóxico	-*
Placas 68				-	
Placas 67				-	
Placas 70				-	
Promedio 70					

IC<sub>50</sub> > 1:32

Comentarios: Aunque hubiera alguna toxicidad, este medicamento fue muy exitoso en la inhibición del virus, no parece que fueran placas.

Ejemplos 21 - 24

Se inocularon cuatro placas de 24 compartimentos con fibroblastos.

Medicamento de Prueba #1B de Referencia = Agente tensioactivo de cloruro de benzalconio en un diluyente acuoso. El cloruro de benzalconio se preparó realizando una dilución al 1:1.000 en agua (10 µl en 10,0 ml de agua estéril). Este se filtró antes de su uso y se diluyó en un volumen igual de 2X MEM para producir una dilución al 1:2.000 en 1X MEM (500 µl de medicamento más 500 µl de 2X MEM).

Medicamento de Prueba #2B de Referencia = Polvo de *Echinacea purpurea* (producto fitoquímico) en solución acuosa. Esta preparación era una solución de 50 mg/ml (250 mg en 5,0 ml de agua) de polvo de *Echinacea purpurea* en agua estéril. La mezcla se agitó y refrigeró durante cuatro horas. Esta preparación en polvo de *Echinacea* se centrifugó a 3.500 rpm durante 15 minutos a 10°C y se filtró antes de su uso, y se diluyó en un volumen igual de 2X MEM para producir la preparación no diluida en 1X MEM (500 µl de medicamento más 500 µl de 2X MEM).

Medicamento de Prueba #3B de Referencia = Polvo de *Echinacea purpurea* (producto fitoquímico) disuelto en el agente tensioactivo de cloruro de benzalconio. Esta preparación fue una solución de 50 mg/ml (250 mg en 5,0 ml de cloruro de benzalconio, 1:1.000). La mezcla se agitó y refrigeró durante cuatro horas. El producto fitoquímico de *Echinacea* y el agente tensioactivo se centrifugaron a 3.500 rpm durante 15 minutos a 10°C y se filtraron antes de su uso, y luego se diluyeron en un volumen igual de 2X MEM para producir la preparación en 1X MEM (500 µl de medicamento más 500 µl de 2X MEM).

Medicamento de Prueba #4B de Referencia = Polvo de *Echinacea purpurea* (producto fitoquímico) en solución acuosa (diluyente) y luego mezclado con el agente tensioactivo de cloruro de benzalconio a una proporción de 1:1.000. Esta preparación era una solución de 50 mg/ml (250 mg en 5,0 ml de agua) de polvo de *Echinacea purpurea* en agua estéril. La mezcla se agitó y refrigeró durante cuatro horas. El producto fitoquímico acuoso se centrifugó a 3.500 rpm durante 15 minutos a 10°C y se filtró antes de su uso. Esta preparación se diluyó en un volumen igual de cloruro de benzalconio a una proporción de 1:1.000, para obtener la mezcla de *Echinacea*-cloruro de benzalconio. Esta mezcla se diluyó con un volumen igual de 2X MEM para producir la preparación al 1:4 en 1X MEM (500 µl de medicamento #1 y 250 µl de medicamento #2 más 500 µl de 2X MEM).

1. Se utilizaron cuatro placas para controlar las cuatro preparaciones de medicamento. Las concentraciones necesarias para controlar la actividad antivírica fueron de 1:20, 1:40, 1:80, 1:160 y 1:320 en 1X MEM. Había cuatro compartimentos de control en cada placa que contenían MEM sin medicamento.

2. Se eliminaron los medios de cultivo de los compartimentos y se añadieron 200 µl de HSV-1 a cada compartimento de las dos filas superiores de cada placa. El HSV-1 se diluyó al 1:5.000 (2,0 µl de stock de HSV-1 en 10 ml de MEM). La valoración del virus fue de 3 x 10<sup>6</sup> por ml. Asimismo, se añadieron 200 µl de HSV-2 a cada compartimento de la mitad inferior de cada placa. El HSV-2 se diluyó al 1:2.000 (5,0 µl de stock de HSV-2 en 10 ml de MEM). La valoración del virus fue de 6 x 10<sup>5</sup> por ml.

3. Se incubaron las placas a 37°C durante cuatro horas.

4. Se eliminó el inóculo y se añadió 1 ml de MEM que contenía los Medicamentos #1-4 a los cuatro compartimentos.

## ES 2 285 765 T3

TABLA 8

<b>Concentrado</b>	<b>1:20</b>	<b>1:40</b>	<b>1:80</b>	<b>1:160</b>	<b>1:320</b>
Medicamento ( $\mu$ l)	400	200	100	50	25
MEM ( $\mu$ l)	3.600	3.800	3.900	3.950	3.975

5. Resultados: HSV-1, revestimiento de líquido, medicamentos añadidos inmediatamente después de la absorción del virus.

TABLA 9

*Medicamento #1B - HSV-1 - Resultados de las Pruebas*

<b>Concentración</b>	<b>1:20</b>	<b>1:40</b>	<b>1:80</b>	<b>1:160</b>	<b>1:320</b>
Placas 37	tóxico	tóxico	tóxico	tóxico	15?*
Placas 45					18?*
Promedio 41					

IC<sub>50</sub>

Comentarios: Ligeramente tóxico, la prueba fue difícil de leer.

HSV-2, revestimiento de líquido, medicamentos añadidos inmediatamente después de la absorción del virus.

TABLA 10

*Medicamento #1B - HSV-2 - Resultados de las Pruebas*

<b>Concentración</b>	<b>1:20</b>	<b>1:40</b>	<b>1:80</b>	<b>1:160</b>	<b>1:320</b>
Placas 38	tóxico	tóxico	tóxico	tóxico	21
Placas 42					17
Promedio 40					19

IC<sub>50</sub> > 1:320

Comentarios: La prueba era demasiado tóxica para dar una buena lectura.

TABLA 11

*Medicamento #2B - HSV-1 - Resultados de las Pruebas*

<b>Concentración</b>	<b>1:20</b>	<b>1:40</b>	<b>1:80</b>	<b>1:160</b>	<b>1:320</b>
Placas 39	2*	8*	23*	24	44
Placas 40	3	18	11	28	38
Promedio 40	3	13	17	26	

IC<sub>50</sub> > 1:80

Comentarios: Placas pequeñas.

## ES 2 285 765 T3

TABLA 12

*Medicamento #2B - HSV-2 - Resultados de las Pruebas*

<b>Concentración</b>	<b>1:20</b>	<b>1:40</b>	<b>1:80</b>	<b>1:160</b>	<b>1:320</b>
Placas 48	21	33			
Placas 52	22	38			
Promedio 50	21,5	35,5			

IC<sub>50</sub> > 1:20

TABLA 13

*Medicamento #3B - HSV-1 - Resultados de las Pruebas*

<b>Concentración</b>	<b>1:20</b>	<b>1:40</b>	<b>1:80</b>	<b>1:160</b>	<b>1:320</b>
Placas 44	1*	17	31	37	
Placas 46	-	16	28	27	
Promedio 45	-	17	30	32	

IC<sub>50</sub> > 1:40

Comentarios: Aunque hubiera cierta toxicidad, el medicamento tuvo mucho éxito, parece que no había placas.

TABLA 14

*Medicamento #3B - HSV-2 - Resultados de las Pruebas*

<b>Concentración</b>	<b>1:20</b>	<b>1:40</b>	<b>1:80</b>	<b>1:160</b>	<b>1:320</b>
Pocas células	11*	27	30	35	
Placas 44	10	32			
Promedio 44	11	29,5			

IC<sub>50</sub> > 1:20

Comentarios: Prueba difícil para obtener una lectura realmente buena. Sin embargo, el medicamento tiene una actividad inhibidora exitosa.

TABLA 15

*Medicamento #4B - HSV-1 - Resultados de las Pruebas*

<b>Concentración</b>	<b>1:40</b>	<b>1:80</b>	<b>1:160</b>	<b>1:320</b>	<b>1:640</b>
Placas 47	tóxico	tóxico	tóxico	33	
Placas 48			28		
Promedio 48			30		

IC<sub>50</sub> > 1:320

Comentarios: Demasiado tóxico a los niveles más altos. Sin embargo, había actividad inhibidora a 1:320.



## ES 2 285 765 T3

TABLA 16

*Medicamento #4B - HSV-2 - Resultados de las Pruebas*

<b>Concentración</b>	<b>1:40</b>	<b>1:80</b>	<b>1:160</b>	<b>1:320</b>	<b>1:640</b>
Placas 38	tóxico	tóxico	tóxico	2*	16
Placas 40				4	20
Promedio 39				3	18

IC<sub>50</sub> > 1:640

Comentarios: Toxicidad probablemente debida al cloruro de benzalconio. El medicamento a dilución 1:320 mostró una actividad inhibitora muy fuerte.

Las pruebas *in vitro* de los Ejemplos 21-24 utilizaron materias primas que no estaban refinadas. Sin embargo, las pruebas demuestran sorprendentemente una buena actividad inhibitora vírica y una sinergia probable entre los constituyentes.

En las pruebas *in vitro* anteriores en las cuales los Medicamentos de Referencia #3, 3A y 3B eran productos fitoquímicos de *Echinacea purpurea* extraídos y combinados con el agente tensioactivo de cloruro de benzalconio, éstos demostraron una actividad antivírica más elevada y demostraron de forma más notable una sinergia entre los componentes: *Echinacea purpurea* y cloruro de benzalconio. Esto se puede explicar posiblemente por una estabilidad compartida y una reactividad aumentada entre los dos componentes. El cloruro de benzalconio en la mezcla sinérgica mostraba un menor grado de toxicidad y la combinación sinérgica mostraba un mayor grado de actividad antivírica, particularmente con HSV-2.

### *Pruebas de VIH*

Se sometió a prueba el Viracea-2 para evaluar la actividad del anti-VIH en ensayos del modelo de infección aguda. Se realizaron ensayos adicionales para evaluar el espectro y mecanismo de acción del compuesto.

El Viracea-2 fue suministrado como solución. La formulación incluía la filtración de la solución y la centrifugación. La alta concentración de prueba utilizada en cada ensayo variaba de una dilución al 1:5 a una dilución al 1:100 en el medio de cultivo de tejidos. Se almacenó cada compuesto a 70°C antes de su utilización.

### *Propagación y Cuantificación de Stocks de Líneas Celulares y Virus*

Las células utilizadas en los ensayos de control del compuesto fueron designadas como línea celular CEM-SS. Estas células son muy susceptibles de infección por VIH, forman rápidamente sincitios multinucleados, y eventualmente son matadas por el VIH. Estas células se mantienen fácilmente ( $2-7 \times 10^3$  células por ml) en el medio de cultivo de tejidos RPMI 1640 complementado con un 10% de suero fetal bovino, glutamina y antibióticos. Las células son pasadas dos veces por semana a una dilución de 1:20. El número de pasajes es registrado cada semana y se descartan las células después de veinte semanas de pasajes y se descongelan y utilizan nuevas células CEM-SS en el ensayo. Stocks de células CEM-SS se congelan en nitrógeno líquido en viales NUNC de 1 ml en un 90% de suero fetal de ternera y un 10% de sulfóxido de dimetilo (DMSO). Después de la descongelación, las células CEM-SS están listas normalmente para ser utilizadas en el ensayo principal de control después de dos semanas en el cultivo. Antes de sustituir una línea celular de último pasaje, se someten a prueba las nuevas células CEM-SS en el protocolo de ensayo de control que utiliza el stock actual de virus infeccioso y AZT. Si la infectividad del virus es notablemente distinta en las nuevas células o si el AZT parece menos activo de lo esperado, no se introducirán las nuevas células en el programa de control. Las pruebas de micoplasma se realizan normalmente en todas las líneas celulares (véase lo anterior).

Se preparan y valoran grupos de virus en células CEM-SS, se colocan en partes alícuotas de 5 ml y se congelan a -135°C. Después de descongelación, se descartan los virus inutilizados para evitar cambios en la valoración infecciosa. Los ensayos de optimización han documentado una reducción logarítmica 1 en la valoración del virus en el primer ciclo de congelación-descongelación, y una reducción menos drástica en la valoración con los ciclos posteriores de congelación-descongelación. Los grupos de virus son preparados mediante infección aguda de  $5 \times 10^5$  células CEM-SS por VIH en un volumen de 200  $\mu$ l, a una multiplicidad de infección determinada, para producir una muerte celular completa el día 7 después de la infección (aproximadamente 0,05 para el aislado III<sub>B</sub> del VIH-1 y 0,01 para el aislado RF del VIH-1). Se deja que la infección prosiga durante una hora a 37°C y luego las células son trasladadas a un matraz T25 y el volumen se aumenta a 2 ml. El día 1 después de la infección, se lleva el volumen a 5 ml y el día 2 se incrementa el volumen a 10 ml. Al principio del día 4, se granulan las célu-

## ES 2 285 765 T3

las, se guarda el agente tensioactivo y se vuelven a suspender las células en una nueva parte alícuota de 10 ml de medio de cultivo de tejido. La totalidad del medio cambia sobre una base diaria, permitiendo crecer las células en el medio durante un período de tiempo más largo, lo que permite que el inóculo del virus utilizado en la comprobación principal quede relativamente no agotado de nutrientes cuando se utiliza para infectar las células. La reacción de coloración utilizada (XTT) requiere que la concentración de glucosa sea alta. Los pozos empobrecidos de glucosa por el crecimiento celular no permitirán la conversión metabólica del tinte de tetrazolio en el producto de formazan.

Los agentes tensioactivos exentos de células procedentes de células muy infectadas se guardan el día 4, día 5, día 6 y día 7. Se guarda por separado una parte alícuota de agente tensioactivo cada día para su utilización en la determinación de la valoración. Las determinaciones de valoración incluyen el ensayo de la actividad de la transcriptasa inversa, la valoración del punto final o la cuantificación por ensayo en placas (CEM-SS) de las partículas infecciosas, y la cuantificación de la cinética de muerte celular. Se ha determinado que los niveles máximos del virus infeccioso se producen en los cultivos gravemente infectados ya que la viabilidad de las células se viene abajo hasta el nivel del 50%. Como el ensayo principal de control cuantifica los efectos protectores de un compuesto según su capacidad para inhibir los efectos citopáticos inducidos por el VIH, la cantidad de virus necesaria para matar las células CEM-SS en 6 días se utiliza normalmente para determinar la cantidad de virus necesaria por pozo en el ensayo principal de control. Cada uno de los grupos diarios es valorado en el protocolo de ensayo principal de control XTT mediante la realización de diluciones multiplicadas por dos del virus, empezando a una concentración de prueba elevada de 50  $\mu$ l de virus por pozo. Se utiliza el método de coloración con tinte de tetrazolio XTT para determinar la cantidad exacta de virus necesaria para matar todas las células CEM-SS en cada pozo y esta cantidad mínima de virus se utiliza para la ejecución de todas las pruebas primarias. Se utilizan métodos idénticos para preparar todos los aislados de virus empleados en el laboratorio, incluidas las cepas procedentes de laboratorio del VIH-1, VIH-2 y STV. Los aislados clínicos utilizados son trasladados a nuevas células humanas y los métodos para el crecimiento de estas células y la producción de grupos de virus se describen a continuación.

### *Ensayo XTT Antivirico de Microvaloración*

#### *Preparación de las células*

Las células CEM-SS u otra línea celular humana establecida, utilizadas en estos experimentos, fueron trasladadas a matraces T-150 para su utilización en el ensayo. El día anterior al ensayo, se partieron las células en 1:2 para asegurarse de que se encontrarían en una fase de crecimiento exponencial en el momento de la infección. El día del ensayo se lavaron dos veces las células con el medio de cultivo de tejido y se volvieron a suspender en un nuevo medio de cultivo de tejido. El recuento total de células y viabilidad se realizó utilizando un hemacitómetro y exclusión de tinte azul tripan. La viabilidad celular era superior al 95% para las células que debían ser utilizadas en el ensayo. Las células se granularon y resuspendieron a  $2,5 \times 10^4$  células por ml en el medio de cultivo de tejido. Se añadieron células a las placas que contenían el medicamento en un volumen de 50  $\mu$ l.

#### *Preparación del virus*

Se retiró del congelador (-80°C) una parte alícuota prevalorada de virus y se dejó descongelar lentamente a temperatura ambiente en un armario biológico de seguridad. El virus se resuspendió y diluyó en el medio de cultivo de tejidos para que la cantidad de virus añadida a cada pozo en un volumen de 50  $\mu$ l fuera la cantidad determinada para producir la muerte celular total a los 6 días después de la infección. En general los grupos de virus producidos con el aislado IIB del VIH necesitaban la adición de 5  $\mu$ l de virus por pozo. Los grupos de virus RF eran de cinco a diez veces más potentes, necesitando 0,5-1  $\mu$ l por pozo. El cálculo de TCID<sub>50</sub> por valoración del punto final en las células CEM-SS indicaba que la multiplicidad de la infección de estos ensayos oscilaba entre 0,005 y 2,5.

#### *Formato de las Placas*

El formato de la placa de prueba ha sido estandarizado y contenía pozos de control celular (solamente células), pozos de control viral (células más virus), pozos de control de la toxicidad del medicamento (células más medicamento solamente), pozos de control colorimétrico del medicamento (medicamento solamente), así como pozos experimentales (medicamento más células más virus).

### Ejemplos 25 - 48

#### *Coloración XTT de las Placas de Control*

Después de 6 días de incubación a 37°C en un incubador de CO<sub>2</sub> al 5%, se analizaron las placas de prueba mediante coloración con el tinte de tetrazolio XTT. El XTT-tetrazolio es metabolizado por las enzimas mitocondriales de las células metabólicamente activas en un producto formazan soluble, lo que permite el análisis cuantitativo rápido de la inhibición de la muerte celular inducida por VIH por las sustancias anti-VIH de prueba. Al día 6 después de la infección, se retiraron las placas del incubador y se observaron. La utilización de placas de microvaloración de fondo redondo permite el análisis macroscópico rápido de la actividad de determinado compuesto de prueba mediante

## ES 2 285 765 T3

la evaluación del tamaño de los gránulos. Los resultados de las observaciones macroscópicas fueron confirmadas y mejoradas por otro análisis microscópico. Se preparó la solución de XTT solamente como un stock de 1 mg/ml en PBS. La solución de metosulfato de fenazina (PMS) se preparó a 15 mg/ml en PBS y se almacenó en oscuridad a -20°C, se preparó el stock de XTT/PMS inmediatamente antes de su uso diluyendo el PMS al 1:100 en PBS y añadiendo 40  $\mu$ l por ml de solución de XTT. Cincuenta microlitros de XTT/PMS fueron añadidos a cada pozo de la placa y la placa fue reincubada durante 4 horas a 37°C. Se utilizaron selladores adhesivos de placa en lugar de tapas, se invirtió la placa sellada varias veces para mezclar el producto formazan soluble y se leyó la placa de forma espectrofotométrica a 450 nm con un lector de placa de Molecular Devices Vmax. Mediante un % de Reducción CPE, % de Viabilidad Celular, se calcularon los IC<sub>25.50 y 95</sub>, TC<sub>25.50 y 95</sub> y demás índices.

TABLA 17

*Resultados Antivíricos In Vitro - Ensayo por XTT para Viracea 2*

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>Fondo Reactivo</b>						<b>Fondo Plástico</b>					
0,169	0,163	0,164	0,166	0,160	0,170	0,074	0,072	0,067	0,067	0,067	0,068
<b>Tox.</b>	<b>cc/vc</b>	<b>Alta Concentración Experimental</b>			<b>Tox.</b>	<b>Tox.</b>	<b>Baja Concentración Experimental</b>			<b>cc/vc</b>	<b>Tox.</b>
1,468	1,421	0,461	0,257	1,170	1,467	1,501	0,207	0,222	0,214	1,506	1,503
1,321	1,397	1,316	0,209	0,191	1,340	1,494	0,200	0,202	0,204	1,446	1,487
0,906	1,345	0,249	0,764	0,836	0,953	1,485	0,227	0,179	0,179	1,453	1,500
0,219	0,256	1,190	0,207	0,210	0,234	1,491	0,204	0,190	0,228	0,192	1,506
0,168	0,190	0,161	0,161	0,148	0,157	1,503	0,237	0,195	0,202	0,186	1,501
0,242	0,223	0,238	0,239	0,230	0,242	1,495	0,201	0,204	0,227	0,189	1,503
<b>Fondo Colorimétrico - Altas Concentraciones</b>						<b>Fondo Colorimétrico - Bajas Concentraciones</b>					
0,258	0,172	0,159	0,165	0,163	0,165	0,165	0,166	0,166	0,171	0,159	0,169

TABLA 18

*Viracea 2*

STRN	RF				
Reactivo	0,165	Medicamento Viracea 2	25%	50%	95%
Control de Virus	0,041	TC	1:450	:250	1:100
Control Celular	1,263	IC	1:900		
Diferencial	1,222	Índice Antivírico (AI)	2,02		

ES 2 285 765 T3

TABLA 19

Viracea 2

	Medicamento Viracea 2		Valores Prueba Antivírica		Valores Prueba Citotoxicidad		Control Colorimétrico
	Fila en Placa	Conc. ( $\mu$ m)	O.D. Medio	% Rojo en CPE vírico	O.D. Medio	% Visibilidad Celular	
Basado en los valores de las columnas 7 a 12 (lado derecho de la placa)	Baja	0,00003	0,004	0%	1,335	100%	0,004
	B	0,0001	0,002	0%	1,331	100%	- 006
	C	0,00032	- 017	0%	1,321	100%	0,006
	D	0,001	0,000	0%	1,332	100%	0,001
	E	0,0032	0,004	0%	1,336	100%	0,001
	F	0,01	0,005	0%	1,334	100%	0,000
	G						
Basado en los valores de las columnas 1 a 6 (lado izquierdo de la placa)	B	0,032	0,090	7%	1,302	100%	0,000
	C	0,1	0,368	30%	1,167	92%	- 002
	D	0,32	0,410	34%	1,764	61%	0,000
	E	1	0,002	0%	1,067	5%	- 006
	F	3,2	- 056	0%	- 010	0%	0,007
	Alta	10	- 063	0%	- 016	0%	0,093
	G						

Ejemplo 49 - 54

*Ensayo de la Actividad de la Transcriptasa Inversa*

Se utilizó una valoración basada en la reacción de la transcriptasa inversa (RT). El trifosfato de timidina tritiada (NEN) (TTP) fue resuspendido en H<sub>2</sub>O destilada a 5 Ci/ml. Se prepararon poli rA y oligo dT como solución de reserva que se mantuvo a -20°C. El tampón de reacción de la RT fue preparado nuevo sobre una base diaria y consistía en 125  $\mu$ l de 1MEGTA, 125  $\mu$ l de dH<sub>2</sub>O, 125  $\mu$ l de Triton X-100, 50  $\mu$ l de 1 M Tris (pH de 7,4), 50  $\mu$ l de 1MDTT y 40  $\mu$ l de 1MMgCl<sub>2</sub>. Estas tres soluciones se mezclaron conjuntamente en una proporción de 1 parte de TTP, 2,5 partes de poli rA:oligo dT, 2,5 partes de reacción, el tampón de reacción y 4 partes de agua destilada. Diez microlitros de esta mezcla de reacción se colocaron en una placa de microvaloración de fondo redondo y 15  $\mu$ l de virus que contenía un agente tensioactivo fueron añadidos y mezclados. Se incubó la placa a 37°C y durante 60 minutos. Después de la reacción, el volumen de reacción fue salpicado sobre felpas filtrantes, fue lavado 6 veces durante 5 minutos cada una en un tampón de fosfato de sodio al 5%, 2 veces durante 1 minuto cada una en agua destilada, 2 veces durante 1 minuto cada una en etanol al 7%, y luego secado. La felpa filtrante seca se colocó en una bolsa de muestra de plástico. Se añadió fluido de escintilación en placa beta y la bolsa fue termosellada. La radioactividad incorporada fue cuantificada mediante un contador de escintilación Wallac Microbeta.

## ES 2 285 765 T3

TABLA 20

*Viracea-2: PBMC/ROJO*

<b>Actividad de la Transcriptasa Inversa</b>										
<b>Conc.</b>	<b>1:0</b>	<b>1:100000</b>	<b>1:32000</b>	<b>1:10000</b>	<b>1:3200</b>	<b>1:1000</b>	<b>1:320</b>	<b>1:100</b>	<b>1:32</b>	<b>1:10</b>
Muestra 1	28139	31734	36488	34880	31240	2287	7436	463	96	38
Muestra 2	24587	27559	33120	23103	33408	20550	9478	265	103	81
Muestra 3	32527	24114	23828	28137	23174	25825	11132	309	77	55
Muestra 4	28418	27802	31145	26677	29274	16221	9349	346	92	58
% VC	100,0	97,8	109,6	100,9	103,0	57,1	32,9	1,2	0,3	0,2

TABLA 21

*Viracea-2: PBMC/ROJO*

<b>Valores de Toxicidad</b>										
<b>Conc.</b>	<b>1:0</b>	<b>1:100000</b>	<b>1:32000</b>	<b>1:10000</b>	<b>1:3200</b>	<b>1:1000</b>	<b>1:320</b>	<b>1:100</b>	<b>1:32</b>	<b>1:10</b>
Muestra 1	2,029	1,547	1,460	1,488	1,345	1,354	0,860	0,546	0,429	0,611
Muestra 2	2,120	1,503	1,548	1,622	1,902	1,489	0,971	0,529	0,434	0,627
Muestra 3	1,879	1,364	1,463	1,720	1,649	1,223	0,772	0,451	0,433	0,633
Muestra 4	2,009	1,471	1,490	1,610	1,632	1,355	0,868	0,509	0,432	0,624
% VC	100,0	73,2	74,2	80,1	81,2	67,5	43,2	25,3	21,5	31,0

### *Elisa*

Se compararon a Coulter unos kits de ELISA. Se realiza el ensayo según las recomendaciones de los fabricantes. Antes del análisis por ELISA, se realizaron de forma rutinaria los ensayos de la actividad de la transcriptasa inversa y se utilizaron los valores para la radioactividad incorporada en el ensayo de actividad de RT para determinar la dilución de las muestras necesarias para el ELISA. Se generaron en cada ensayo curvas de control para cuantificar exactamente la cantidad de proteína de la cápside en cada muestra. Se obtuvieron los datos mediante análisis espectrofotométrico a 450 nm por medio de un lector de placa de Molecular Devices Vmax. Se calcularon las concentraciones de p24 a partir de los valores de densidad óptica por medio del paquete Soft Max de software de Molecular Devices.

### *Partículas Infecciosas*

Se cuantificaron las partículas infecciosas del virus utilizando el ensayo en placa de CEM-SS y el ensayo cuantitativo de infectividad para el VIH-1 y VIH-2. Placas de valoración de 96 pozos de fondo plano se recubrieron de 50 µl de poli-L-lisina a 50 µg/ml durante 2 horas a 37°C. Luego se lavaron los pozos con PBS y se colocaron 2,5 x 10<sup>5</sup> células CEM-SS en el pozo de microvaloración, donde se fijaron al fondo de la placa. Se añadieron suficientes

## ES 2 285 765 T3

células para formar una monocapa de células CEM-SS en cada pozo. Se añadió el agente tensioactivo que contenía el virus procedente de cada pozo de la fase XTT, incluidos el virus y los controles celulares y cada dilución en serie de la sustancia de prueba. El número de sincitios fue cuantificado en la placa de microvaloración de 96 pozos de fondo plano con un microscopio invertido Olympus CK2 a los 4 días después de la infección. Cada sincito resultó de un  
5 único virión infeccioso de VIH.

### *Actividad del anti-VIH en Células Humanas Recientes: Ensayo en T-linfocitos Humanos Recientes*

10 Linfocitos recientes de sangre periférica humana (PBL) se aislaron de donantes voluntarios de la Cruz Roja sero-negativos para el VIH y VBH. La sangre sometida a leucófresis se diluye al 1:1 con una solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (PBS), en capas sobre 14 ml de gradiente de densidad Ficoll-Hypaque en un tubo centrífugo de 50 ml. Luego se centrifugaron los tubos durante 30 minutos a 600xg. Los PBL bandeados fueron aspirados suavemente de la superficie de contacto resultante y posteriormente lavados 2 veces con PBS por centrifugación a  
15 a  $1 \times 10^7$ /ml en RPMI 1640 con Suero Fetal Bovino (FBS) al 15%, 2 mM de L-glutamina, 4  $\mu$ g/ml de PHA-P y se dejaron incubar durante 48-72 horas a 37°C. Después de la incubación, se centrifugaron los PBL y se volvieron a colocar en RPMI 1640 con FBS al 15%, 2 mM de L-glutamina, 100 U/ml de penicilina, 100  $\mu$ g/ml de estreptomina, 10  $\mu$ g/ml de gentamicina y 20 U/ml de IL-2 recombinante humano. Se mantuvieron los PBL en este medio a una concentración de  $1-2 \times 10^6$ /ml con cambios de medio dos veces por semana, hasta su uso en el protocolo de  
20 ensayo.

Para el ensayo de PBL, las células estimuladas de PHA-P procedentes de al menos dos donantes normales fueron agrupadas, puestas en medio fresco a  $2 \times 10^6$ /ml y colocadas en placas en los pozos interiores de una microplaca de 96 pozos de fondo redondo a 50  $\mu$ l/pozo. Se prepararon diluciones de medicamento de prueba a una concen-  
25 tración de 2X en tubos de microvaloración y 100  $\mu$ l de cada concentración son colocados en los pozos adecuados en una formato estándar. Se colocaron en cada pozo de prueba 50  $\mu$ l de una dilución predeterminada de stock de virus. Los pozos con células y virus solo se utilizaron para control viral. Se pusieron idénticamente placas individuales sin virus para los estudios de citotoxicidad del medicamento mediante la utilización de un sistema de ensayos XTT.

30 En el ensayo estándar de PBL (MOI: 0,2), el ensayo finalizó el día 7 después de la recogida de muestras de agente tensioactivo libre de células para el ensayo de la actividad de la transcriptasa inversa. En el ensayo inferior de PBL MOI (MOI: 0,02), se recogieron muestras de agente tensioactivo el día 6, día 11, y día 14 después de la infección y se analizó su actividad R1. El trifosfato de timidina tritiada (NEN) (TTP) se resuspendió en H<sub>2</sub>O destilada a 5 Ci/ml. Se prepararon poli rA y oligo dT como solución de reserva que se mantuvo a -20°C. Se preparó tampón de reacción RT fresco sobre una base diaria y consistía en 125  $\mu$ l de 1MEGTA, 125  $\mu$ l de dH<sub>2</sub>O, 110  $\mu$ l de SDS al 10%, 50  $\mu$ l de 1 M Tris (pH de 7,4), 50  $\mu$ l de 1MDTT y 40  $\mu$ l de 1 M MgCl<sub>2</sub>. Estas tres soluciones se mezclaron conjuntamente en una proporción de 2 partes de TTP, 1 parte de poli rA:oligo dT, y 1 parte del tampón de reacción. Diez microlitros de esta mezcla de reacción se colocaron en una placa de microvaloración de fondo redondo y 15  $\mu$ l de virus que contenía un  
40 agente tensioactivo fueron añadidos y mezclados. Se incubó la placa a 37°C en un baño de agua con un soporte sólido para impedir la inmersión de la placa y se incubó durante 60 minutos. Después de la reacción, el volumen de reacción fue salpicado sobre trozos de papel DE81, fue lavado 5 veces durante 5 minutos cada una en un tampón de fosfato de sodio al 5%, 2 veces durante 1 minuto cada una en agua destilada, 2 veces durante 1 minuto cada una en etanol al 7% y luego secado. Se añadió Opti-Fluor O a cada muestra y se cuantificó la radioactividad incorporada mediante un  
45 contador de escintilación líquida Wallac 1450 Microbetaplus.

La incorporación de timidina tritiada fue medida en cultivos paralelos el día 7. Cada pozo fue pulsado con 1  $\mu$ Ci de timidina tritiada y se recogieron las células 18 horas más tarde con un cosechador Skatron de células sobre papeles filtrantes de fibra de vidrio. Los filtros se secaron, se colocaron en un vial de escintilación con 1 ml de cóctel de escintilación y se cuantificó la radioactividad incorporada en un contador de escintilación líquida Packard Tri-Carb  
50 1900 TR.

### Ejemplos 55 - 78

### *Actividad del Anti-VIH en Células Humanas Recientes: Ensayo en Macrófagos/Monocitos Humanos Recientes*

Para el aislamiento de células adherentes,  $3 \times 10^6$  células de sangre periférica estimuladas no por PHA fueron resuspendidas en una solución salina tamponada con Hanks con calcio y magnesio complementado con suero AB humano al 10%. Se colocaron las células en una placa de microvaloración de 24 pozos a 37°C durante 2 horas. Las células no adherentes fueron eliminadas por fuerte lavado seis veces. Se cultivaron las células adherentes durante 7 días en el medio de cultivo de tejidos RPMI 1640 con suero fetal bovino al 15%. Se comprobaron cuidadosamente los cultivos en cuanto a su confluencia durante este período de incubación. Se realizó la infección de las células con las cepas BaL o ADA monocitotrópicas de VIH-1 y el par coincidente de aislados de virus AZT-sensible y AZT-resistente. Cada uno de estos aislados de virus fue obtenido a partir del NLAID AIDS Research and Reference Reagent Program. Grandes grupos de valoración de cada uno de estos virus han sido cosechados de los cultivos infectados de células adherentes de sangre periférica y han sido congelados en partes alícuotas de 1,0 ml a -80°C. Las monocapas de monocitos-macrófa-  
65 gos fueron infectadas a un MOI de 0,1. Los compuestos que debían ser evaluados en las monocapas

## ES 2 285 765 T3

fueron infectados a un MOI de 0,1. Los compuestos que debían ser evaluados en el ensayo de monocitos-macrófagos fueron añadidos a las monocapas poco tiempo antes de la infección con el fin de maximizar el potencial para la identificación de los compuestos activos.

5 A los dos días después de la infección, el medio fue decantado y los cultivos fueron lavados dos veces con medio completo para eliminar el virus en exceso. Se añadió el medio fresco solo o el medio que contenía la concentración adecuada de medicamentos y la incubación continuó durante 5 días más. Los ensayos de exclusión de azul tripan o XTT-tetrazolio en cuanto a la viabilidad celular y ELISA del p24 del VIH para la producción del antígeno p24 del núcleo fueron realizados el día 7 después de la infección. Se compraron los kits de ELISA a Coulter. Se generaron en cada ensayo curvas de control para cuantificar exactamente la cantidad de proteína de la cápside en cada muestra. Se obtuvieron los datos mediante análisis espectrofotométrico a 450 nm por medio de un lector de placa de Molecular Devices Vmax. Se calcularon las concentraciones de p24 a partir de los valores de densidad óptica por medio del paquete Soft Max de software de Molecular Devices.

15

TABLA 22

*Ensayo de los Macrófagos para Viracea 2 Actividad de p24 (pg/ml)*

20

<b>µM</b>	<b>Control de AZT vs ADA</b>			<b>Dilución</b>	<b>Viracea #2 vs ADA</b>		
<b>4</b>	8,65	8,65	17,45	1:100	42,19	22,95	34,49
<b>1,28</b>	9,20	6,45	25,15	1:312	4,25	15,25	41,09
<b>0,410</b>	13,60	10,00	16,35	1:976	14,70	17,45	39,44
<b>0,131</b>	53,74	13,60	62,54	1:3051	63,64	26,25	48,79
<b>0,042</b>	82,89	72,44	96,63	1:9536	48,79	570,60	180,80
<b>0,013</b>	175,80	168,70	316,00	1:29802	278,60	243,50	450,80
<b>0,004</b>	914,90	891,20	499,20	1:93132	305,60	599,80	435,90
<b>0,0014</b>	821,90	594,80	983,10	1:291038	548,10	947,90	913,20
<b>0,0004</b>	1097,00	1160,00	1098,00	1:909494	814,80	790,60	820,80

40

TABLA 23

*Ensayo de los Macrófagos para Viracea 2 Absorbancia en los Estudios de Toxicidad*

45

<b>µM</b>	<b>Control de AZT vs ADA</b>			<b>Dilución</b>	<b>Viracea #2 vs ADA</b>		
<b>4</b>	1,140	0,981	1,427	1:100	1,271	1,244	1,289
<b>1,28</b>	1,692	1,318	0,985	1:312	1,081	1,154	1,393
<b>0,410</b>	1,505	1,258	1,522	1:976	1,073	1,183	1,536
<b>0,131</b>	1,427	1,347	1,043	1:3051	1,482	1,032	1,518
<b>0,042</b>	1,534	1,725	1,720	1:9536	1,031	1,330	1,053
<b>0,013</b>	1,818	1,526	1,363	1:29802	1,344	1,449	1,497
<b>0,004</b>	1,578	1,112	1,034	1:93132	1,024	1,554	1,446
<b>0,0014</b>	1,386	1,350	1,133	1:291038	1,692	1,112	1,411
<b>0,0004</b>	1,451	1,081	1,342	1:909494	1,182	1,163	1,373

65

## ES 2 285 765 T3

TABLA 24

*Ensayo de la Macrofase del Anti-VIH (p24) Para Viracea #2*

<b>Actividad de p24 (pg/ml)</b>										
<b>Dilución</b>	<b>0</b>	<b>1:</b>	<b>1:</b>	<b>1:</b>	<b>1:</b>	<b>1:</b>	<b>1:</b>	<b>1:</b>	<b>1:</b>	<b>1:</b>
		<b>909494</b>	<b>291038</b>	<b>93132</b>	<b>29802</b>	<b>9536</b>	<b>3051</b>	<b>976</b>	<b>312</b>	<b>100</b>
Muestra 1	1366,8	1347	524,1	634,4	457,5	349,9	193,5	138	120,9	46,96
Muestra 2	1366,8	1151	693,8	782,2	321,5	228	271,4	190,2	4,718	96,46
Muestra 3	1366,8	1000	877,9	642,9	507	382,2	136,1	202,1	171,7	92,5
Promedio	1366,8	1166,0	695,6	686,5	428,7	320,0	200,3	176,8	99,1	78,5
% VC	100,0	85,3	51,1	50,2	31,4	23,4	14,7	12,9	7,3	5,8

TABLA 25

*Viracea #2*

<b>Valor de Toxicidad XTT (Absorbancia)</b>										
<b>Dilución</b>	<b>0</b>	<b>1:</b>	<b>1:</b>	<b>1:</b>	<b>1:</b>	<b>1:</b>	<b>1:</b>	<b>1:</b>	<b>1:</b>	<b>1:</b>
		<b>909494</b>	<b>291038</b>	<b>93132</b>	<b>29802</b>	<b>9536</b>	<b>3051</b>	<b>976</b>	<b>312</b>	<b>100</b>
Muestra 1	3,293	3,85	3,606	3,787	3,693	3,657	2,927	3,134	3,131	3,393
Muestra 2	3,293	3,005	3,662	3,542	3,685	3,828	3,408	2,833	3,074	3,263
Muestra 3	3,293	3,457	3,648	2,59	2,808	2,558	2,735	2,932	2,892	3,345
Promedio	3,293	3,437	3,639	3,306	3,395	3,348	3,023	2,966	3,032	3,334
% VC	100,0	104,4	110,5	100,4	103,1	101,7	91,8	90,1	92,1	101,2

TABLA 26

*Ensayo de la Macrofase del Anti-VIH (p24) Para Viracea #2*

<b>Actividad de p24 (pg/ml)</b>										
<b>Dilución</b>	<b>0</b>	<b>1:</b>	<b>1:</b>	<b>1:</b>	<b>1:</b>	<b>1:</b>	<b>1:</b>	<b>1:</b>	<b>1:</b>	<b>1:</b>
		<b>909494</b>	<b>291038</b>	<b>93132</b>	<b>29802</b>	<b>9536</b>	<b>3051</b>	<b>976</b>	<b>312</b>	<b>100</b>
Muestra 1	1298,2	1350	793,9	1001	515,9	274	196,3	65,8	16,28	3,904
Muestra 2	1298,2	1350	858,6	851	780,4	393,3	102,9	110,2	38,79	16,28
Muestra 3	1298,2	1454	1262	801,2	837,8	396,1	222,2	113,1	42,73	15,72
Promedio	1298,2	1384,7	971,5	884,4	711,4	354,5	173,8	96,4	32,6	12,0
% VC	100,0	106,7	74,8	68,1	54,8	27,3	13,4	7,4	2,5	0,9



ES 2 285 765 T3

TABLA 27

*Viracea #2*

Valor de Toxicidad XTT (Absorbancia)										
Dilución	0	1: 909494	1: 291038	1: 93132	1: 29802	1: 9536	1: 3051	1: 976	1: 312	1: 100
Muestra 1	3,139	3,459	3,568	3,567	3,634	3,562	3,134	3,311	3,171	2,974
Muestra 2	3,139	3,018	3,295	3,505	3,533	3,359	2,833	3,313	3,133	2,909
Muestra 3	3,139	3,21	3,261	3,263	2,297	3,051	2,932	2,829	3,151	3,35
Promedio	3,139	3,228	3,375	3,445	3,488	3,312	2,966	3,151	3,152	3,078
% VC	100,0	102,9	107,5	109,7	111,1	105,5	91,8	100,4	100,4	98,0

TABLA 28

*Ensayo In Vitro de la Macrofase del Anti-VIH Para Viracea #2*

p24 (pg/ml)										
Dilución	0	1: 909494	1: 291038	1: 93132	1: 29802	1: 9536	1: 3051	1: 976	1: 312	1: 100
Muestra 1	1045,9	820,80	913,20	435,90	450,80	180,80	48,78	39,44	41,09	34,49
Muestra 2	1046,8	790,60	947,90	599,80	243,50	570,60	26,25	17,45	15,25	22,95
Muestra 3	1045,8	814,80	548,10	305,60	276,60	48,79	63,64	14,70	4,25	42,19
Promedio	1045,8	808,7	803,1	447,1	324,3	266,7	46,2	23,9	20,2	33,2
% VC	100,0	77,3	76,8	42,8	31,0	26,6	4,4	2,3	1,9	3,2

TABLA 29

*Viracea #2*

Valor de Toxicidad XTT (Absorbancia)										
Dilución	0	1: 909494	1: 291038	1: 93132	1: 29802	1: 9536	1: 3051	1: 976	1: 312	1: 100
Muestra 1	1,439	1,373	1,411	1,446	1,497	1,053	1,518	1,536	1,393	1,289
Muestra 2	1,439	1,163	1,112	1,554	1,494	1,330	1,032	1,183	1,154	1,244
Muestra 3	1,439	1,182	1,692	1,024	1,334	1,031	1,482	1,073	1,081	1,271
Promedio	1,439	1,239	1,405	1,341	1,442	1,138	1,344	1,264	1,209	1,268
% VC	100,0	86,1	97,6	93,2	100,2	78,1	93,4	87,8	84,0	88,1

Ejemplos 79 - 90

*Ensayos de Inhibición de Unión y Fusión*

Estos ensayos utilizaron células HeLa-CD4-LTR- $\beta$ -galactosidasa que emplean una transactivación inducida por la proteína Tat del gen para  $\beta$ -galactosidasa dirigido por el promotor de repetición terminal larga (LTR) del VIH-1. Se utilizó el ensayo para cuantificar tanto la unión de los virones infecciosos a las células como los eventos de

## ES 2 285 765 T3

fusión célula-célula. Las células infectadas forman sincitios que pueden ser contados fácilmente con microscopio después de la incubación con X-gal. El ensayo de inhibición de la unión del VIH implicaba la colocación en placas de  $1 \times 10^4$  células HeLa-CD4-LTR- $\beta$ -galactosidasa en 200  $\mu$ l en placas de microvaloración de 96 pozos de fondo plano. Las células fueron incubadas durante toda la noche, el medio fue eliminado y sustituido por 100  $\mu$ l de varias concentraciones de ISIS 5320 o compuesto de control. Una hora más tarde, se añadieron a cada pozo 100  $\mu$ l de medio que contenía virus. Se incubaron las células durante una hora más y la monocapa se lavó mucho para eliminar el virus no unido y el compuesto extracelular. A las 48 horas, las células fueron fijadas y coloreadas con X-gal. Entonces se contaron las células multinucleares azules bajo un microscopio invertido. El ensayo de inhibición de fusión célula-célula se realizó también en placas de microvaloración de 96 pozos de fondo plano. Se añadieron a cada pozo células HeLa-CD4-LTR- $\beta$ -galactosidasa ( $5 \times 10^3$ ) y se incubaron con el compuesto de prueba durante 1 hora antes de añadir  $5 \times 10^3$  células HL2/3 (28). Se incubaron las células durante 48 horas más y se fijaron y colorearon con X-gal. Se contaron microscópicamente los sincitios azules. La coloración de las células se realizó mediante la fijación de las células con una solución de 1% de formaldehído y 0,2% de glutaraldehído y la coloración de las células fijadas con 4  $\mu$ M de ferrocianuro de potasio, 4  $\mu$ M de ferricianuro de potasio, 2  $\mu$ M de  $MgCl_2$  y X-gal al 0,4% en PBS. La transactivación de la expresión de  $\beta$ -galactosidasa fue controlada también por ELISA. Se prepararon unos extractos celulares mediante congelación-descongelación y la actividad de la  $\beta$ -galactosidasa fue sometida a ensayo de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Los resultados del ELISA fueron cuantificados espectrofotométricamente a 405 nm mediante la utilización de un lector de placa de valoración de Molecular Devices Vmax.

TABLA 30

*Ensayo de Fusión con  $\beta$ -gal: Viracea #2/SK1*

<b>Número de Células Azules por Pozo</b>							
<b>Dilución</b>	<b>0</b>	<b>1:3200</b>	<b>1:1000</b>	<b>1:320</b>	<b>1:100</b>	<b>1:32</b>	<b>1:10</b>
Muestra 1	49,0	26,0	16,0	17,0	10,0	2,0	1,0
Muestra 2	32,0	18,0	16,0	11,0	3,0	2,0	0,0
Muestra 3	59,0	19,0	20,0	14,0	5,0	3,0	1,0
Promedio	46,7	21,0	17,3	14,0	6,0	2,3	0,7
% VC	100,0	45,0	37,1	30,0	12,8	5,0	1,4
STD DEV	29,3	9,3	4,9	6,4	7,7	1,2	1,2

TABLA 31

*Ensayo de Fusión con  $\beta$ -gal: Viracea #2/SK2*

<b>Porcentaje de Toxicidad</b>							
<b>Dilución</b>	<b>0</b>	<b>1:3200</b>	<b>1:1000</b>	<b>1:320</b>	<b>1:100</b>	<b>1:32</b>	<b>1:10</b>
Muestra 1	1,441	1,59	1,965	1,972	1,799	1,932	0,829
Muestra 2	1,5	1,543	1,83	1,835	1,897	1,386	0,882
Muestra 3	1,425	1,536	1,839	1,867	2,036	1,615	0,758
Promedio	1,455	1,558	1,875	1,891	1,911	1,644	0,823
% Viabilidad	100,0	106,9	129,0	130,0	131,3	113,0	56,6

## ES 2 285 765 T3

TABLA 32

*Ensayo de Fusión con  $\beta$ -gal: Viracea #2*

<b>Número de Células Azules por Pozo</b>							
<b>Conc.</b>	<b>0</b>	<b>1:3200</b>	<b>1:1000</b>	<b>1:320</b>	<b>1:100</b>	<b>1:32</b>	<b>1:10</b>
Muestra 1	38,0	64,0	50,0	56,0	40,0	50,0	0,0
Muestra 2	48,0	56,0	77,0	54,0	53,0	54,0	0,0
Muestra 3	32,0	44,0	46,0	42,0	48,0	47,0	0,0
Promedio	39,3	54,7	57,7	50,7	47,0	50,3	0,0
% VC	100,0	139,0	146,6	128,8	119,5	128,0	0,0
STD DEV	20,5	25,6	42,9	19,3	16,7	8,9	0,0

TABLA 33

*Viracea #2*

<b>Porcentaje de Toxicidad</b>							
<b>Conc.</b>	<b>0</b>	<b>1:3200</b>	<b>1:1000</b>	<b>1:320</b>	<b>1:100</b>	<b>1:32</b>	<b>1:10</b>
Muestra 1	1,425	1,998	1,87	1,85	1,592	0,956	0,174
Muestra 2	1,5	1,911	1,959	1,904	1,645	0,988	0,174
Muestra 3	1,441	1,976	1,902	1,939	1,623	0,965	0,182
Promedio	1,456	1,962	1,914	1,898	1,620	0,970	0,177
% Viabilidad	100,0	134,8	131,5	130,4	111,3	56,6	12,1

### *Ensayo Microbicida Tópico*

Las células epiteliales cervicales MEI 180 fueron colocadas en placa en las paredes interiores de una placa de microvaloración de fondo plano de 96 pozos a una densidad de  $5 \times 10^4$  células por pozo e incubadas durante toda la noche. Las células H9 crónicamente infectadas fueron tratadas con  $200 \mu\text{g/ml}$  de mitomicina C en un medio completo durante una hora, se lavaron bien y se resuspendieron a  $4 \times 10^5$  por ml. La concentración de la mitomicina C utilizada resultó en la muerte de las células crónicamente infectadas en las 48 horas del tratamiento, dejando suficiente tiempo para la transmisión célula-célula del virus a las células ME-180 mientras se aseguraba que la cuantificación del punto final del virus no incluiría una contribución de las células crónicamente infectadas. Los compuestos antivíricos y las células crónicamente infectadas ( $2 \times 10^4$ ) fueron añadidos a cada pozo que contenía las células ME 180 y se incubaron durante 6 horas. Después del cultivo, se lavó mucho la monocapa y se añadió medio fresco. Se eliminó el medio y se añadió medio fresco a las 24 y 48 horas después de la infección para quitar los linfocitos muertos. El día 6 después de la infección, se eliminaron las muestras de agente tensioactivo y su contenido en virus se analizó por ELISA p24.

### *Ensayos sobre la Expresión de CD4*

La cuantificación del efecto de Viracea sobre la expresión de CD4 se llevó a cabo utilizando técnicas citométricas estándar de flujo. Se trataron células con Viracea durante una hora a  $37^\circ\text{C}$  en un medio de cultivo de tejidos. Brevemente,  $10^6$  células CEM-SS fueron incubadas con o sin compuesto durante 60 minutos a temperatura ambiente. Se añadió el anticuerpo monoclonal anti-CD4 ( $20 \mu\text{l}$ ,  $3 \mu\text{g/ml}$ ) (Becton-Dickinson, San José, CA), y se incubaron las células a  $4^\circ\text{C}$  durante 40 minutos. Luego se lavaron dos veces las células con PBS, se resuspendieron en paraformaldehído a  $1^\circ\text{C}$ , y se analizaron por medio de un citómetro de flujo de Becton-Dickinson FACSsort.

### *Síntesis Macromolecular*

Las células CEM-SS se cultivaron por triplicado en presencia o ausencia del compuesto durante 24 horas a  $37^\circ\text{C}$  en un incubador de  $\text{CO}_2$  humidificado. A las 24 horas,  $1 \mu\text{Ci}$  de [metil- $^3\text{H}$ ]-timidina, [5- $^3\text{H}$ ]-uridina, ó [3,4,5- $^3\text{H}$ ]-leucina

## ES 2 285 765 T3

fue añadida al cultivo y la incubación continuó durante 8 horas más. Se trasladaron las células a papeles filtrantes de fibra de vidrio por medio del cosechador de células Skatron. Se lavaron las fibras de vidrio con agua destilada, se colocaron en un vial de escintilación y se cuantificó la cantidad de radioactividad incorporada con un contador de escintilación Packard Tri-Carb.

### 5 *Resultados de las Pruebas del VIH*

Se evaluó el Viracea-2 en el ensayo de microvaloración de anti-VIH que cuantifica la capacidad de un compuesto de prueba para inhibir la replicación del VIH y la destrucción celular inducida por el VIH. Se determinó que el compuesto era activo contra la cepa RF del VIH-1 en las células CEM-SS. El Viracea-2 mostró un  $IC_{25}$  a una dilución de 1:900 y no alcanzó un valor inhibitorio del 50%. El Viracea-2 mostró toxicidad ( $TC_{30}$ ) a las células CEM-SS respectivamente a las diluciones de aproximadamente 1:20 y 1:250. El compuesto de control positivo, ddC, mostró el nivel esperado de actividad contra el virus RF.

Se evaluó la actividad del Viracea-2 en PBMCs humanos recientes infectados por el aislado ROJO clínico del VIH. Este aislado de bajo pasaje ha sido definido como aislado del virus inductor de sincitio sensible al medicamento (AZT, ddC, nevirapina). El Viracea-2 no inhibió la replicación de este aislado a concentraciones no-tóxicas. Otra evaluación del compuesto en PBMCs infectados con ROJO se realizó por medio de la estimulación por IL2 de los PBMCs más que mediante la blastogénesis de PHA. De nuevo, no se detectó actividad por debajo de concentraciones que inhiben el crecimiento de los PBMCs. AZT mostró el nivel de actividad esperado en estos ensayos.

Se evaluó el Viracea-2 en monocitos-macrófagos humanos frescos infectados por el aislado ADA clínico de bajo pasaje. En estos ensayos, el compuesto mostró altos niveles de actividad. La concentración eficaz al 50% del Viracea-2 fue de 1:10000. No se detectó toxicidad a la monocapa de monocitos-macrófagos por examen morfológico o por coloración con XTT-Tetrazolio. AZT mostró el nivel de actividad esperado en estos ensayos.

Se descubrió que el Viracea-2 inhibía la unión del virus infeccioso a las células HeLa-CD4-LTR- $\beta$ -galactosidasa que expresan CD4. La inhibición de la unión del virus a las células diana fue detectada a diluciones de aproximadamente 1:1000 a 1:3200 del compuesto. El compuesto no tenía efecto antivírico alguno sobre la fusión de las células HL2/3 de expresión de la envuelta con las células HeLa-CD4-LTR- $\beta$ -galactosidasa. Se observó toxicidad para el compuesto en el ensayo de fusión donde el compuesto estaba presente durante todo el tiempo del ensayo y en el ensayo de unión donde el compuesto estuvo presente solamente durante 2 horas. El Chicago Sky Blue, un tinte sulfonado, mostró el nivel de actividad esperado en cada uno de los ensayos.

El Viracea-2 impidió la transmisión del virus desde los linfocitos crónicamente infectados a la línea celular epitelial cervical ME180 a una dilución de aproximadamente 1:500 ( $IC_{30}$ ). No se detectó toxicidad a las células ME180 en este ensayo. En este ensayo, el medicamento estaba presente durante el tiempo de infección solamente (4 horas). El sulfato de dextran (control positivo, polisacárido sulfatado) y dextran (control negativo) mostraron el nivel de actividad esperado en estos ensayos.

El Viracea-2 no tuvo ningún efecto sobre la expresión de CD4 en la superficie celular.

La inhibición de la incorporación de timidina (ADN), uridina (ARN) o leucina (proteína) dentro de las macromoléculas de alto peso molecular se observó a diluciones superiores a 1:320. La inhibición de la síntesis de las macromoléculas iba paralelamente a la toxicidad del compuesto en las células CEM-SS.

### *Sumario de los Resultados de las Pruebas de VIH*

El Viracea-2 inhibe la infección por VIH en las células T establecidas con un índice terapéutico estrecho. El Viracea-2 inhibe potencialmente la replicación del VIH en los monocitos-macrófagos. El Viracea-2 inhibe la unión del virus a las células diana pero no impide la fusión de las células infectadas y no-infectadas. El Viracea-2 inhibe la transmisión del virus en un ensayo microbiciida típico y puede resultar útil en la prevención de la transmisión sexual del VIH. El Viracea-2 no tiene ningún efecto sobre la expresión de CD4 en la superficie celular.

### 55 *Prevención y Tratamiento*

El compuesto antimicrobiano proporciona un antimicrobiciida y medicamento que puede (1) ayudar a prevenir la transmisión sexual del VIH; (2) controlar la carga vírica del VIH y demás virus; (3) erradicar el VIH; (4) ampliar los períodos de latencia del síndrome de autoinmunodeficiencia (SIDA) en pacientes que han contraído el VIH; (5) reducir el dolor y sufrimiento de los pacientes con VIH; (6) disminuir la propagación infecciosa del VIH; (7) proporcionar un tratamiento mejor y con más éxito de los pacientes con VIH. El tratamiento médico puede resolver también los síntomas físicos de un brote infeccioso del VIH, virus 1 ó 2 del herpes simplex (HSV-1 ó HSV-2) u otras enfermedades microbianas infecciosas. El procedimiento puede ser realizado mediante la inyección o aplicación sistémica del compuesto antimicrobiano preferente anteriormente descrito (medicamento) con una jeringuilla en el canal rectal (recto, tejido rectal, ano o tejido anal) o en la vagina (tejido vaginal) de un paciente infectado por el VIH o por otra enfermedad microbiana infecciosa 8-12 veces al día, preferentemente 10 veces al día a intervalos de cada dos horas, durante un período de 10-18 días consecutivos, preferentemente 14 días consecutivos (dos semanas) para unos resultados mejores. La dosificación, concentración y cantidad de compuesto antimicrobiano (medicamento) pueden

## ES 2 285 765 T3

5 variar dependiendo de la gravedad y magnitud de la enfermedad, así como de la edad, sexo, peso, raza y salud del paciente. Es deseable enjuagar (lavar) y secar la zona infectada para eliminar todo jabón o residuo en la zona infectada antes de aplicar el compuesto antimicrobiano (medicamento). Para el tratamiento del virus 1 ó 2 del herpes simplex, el compuesto antimicrobiano puede ser aplicado en la zona infectada, durante 19-24 horas. Preferentemente, la erupción vesicular del virus del herpes se resuelve en 19-24 horas y las lesiones por herpes en consecuencia se curan.

Entre las numerosas ventajas del tratamiento médico y medicamento (composiciones) de la invención, se encuentran:

- 10 1. Magnífico tratamiento y prevención del VIH y demás enfermedades infecciosas.
2. Resultados superiores en el final del dolor por infecciones víricas por VIH, herpes simplex y demás infecciones microbianas sin toxicidad.
- 15 3. Notable ejecución en la resolución rápida de brotes del VIH, virus del herpes simplex y demás enfermedades microbianas.
4. Salva la vida de los recién nacidos, niños, adultos y animales.
- 20 5. Reduce la pérdida económica mundial procedente del VIH, herpes y demás enfermedades microbianas.
6. Resuelve muchas de las angustias emocionales y mentales serias de los enfermos de VIH y herpes.
7. Fácil disponibilidad de los materiales (ingredientes).
- 25 8. Económico.
9. Seguro.
- 30 10. Fácil de utilizar.
11. Fiable.
- 35 12. Eficaz.

40

45

50

55

60

65

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Composición que contiene un nutriente y una planta, **caracterizada** porque el nutriente es ácido fólico, la planta comprende un extracto botánico del género *Echinacea*, y la *Echinacea* comprende *Echinacea purpurea*.
2. Composición según la reivindicación 1, **caracterizada** porque la composición incluye además una segunda planta que comprende un extracto botánico del género *Commiphora*.
- 10 3. Composición según la reivindicación 2, **caracterizada** porque la *Commiphora* comprende una especie que se compone de *Commiphora myrrha*, *Commiphora molmol* o *Commiphora erythraea*.
4. Composición según la reivindicación 2 ó 3, **caracterizada** porque la *Commiphora* comprende *Commiphora myrrha*.
- 15 5. Composición según la reivindicación 3 ó 4, **caracterizada** porque la proporción de *Commiphora myrrha* con respecto a la *Echinacea* oscila entre 1:2 y 1:4.
- 20 6. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 2-5, **caracterizada** porque la composición contiene aislados antimicrobianos seleccionados de entre el grupo consistente en: sesquiterpenos, ácido acético, alfa-amirona, arabinosa, alfa-bisaboleno, gamma-bisaboleno, cadineno, campesterol, colesterol, cinamaldehído, commiferina, ácido alfa-comifórico, ácido beta-comifórico, ácido gamma-comifórico, ácido comiforínico, m-cresol, alcohol cúmico, cuminaldehído, dipenteno, elemol, 3-epi-alfa-amirina, eugenol, furanodieno, furanodienona, galactosa, goma, heeraboleno, alfa-heerabomirrol, beta-heerabomirrol, heeraborasena, limoneno, ácido 4-O-metilglucurónico, n-nonacosano, beta-sitosterol, xilosa, resina de goma mirra, curcenona, dihidrofuranodien-6-ona, 2-metoxifurandieno, linderestireno, equinacena, equinacina B, equinaceína, equinacosido, éster de ácido cafeico, equinolona, enzimas, ácido glucurónico, inulina, inuloide, pentadecadieno, compuestos poliacetileno; polisacáridos, arabinogalactano; ramnosa, taninos, PSI (un 4-O-metilglucuronarabinosilano, Mr3 5Kd), PSII (un ramnoarabinogalactano, Mr 40 kD), cinarina, ácido 1,5-di-O-cafeoilquinico, ácido chicórico, ácido 2,3-O-dicafeoiltartárico, borneol, acetato de bornilo; pentadeca-8 (z)-en-2-ona, germacreno D; cariofileno; epóxido de cariofileno; antocianina, alcaloide de pirrolizidina; amida lipofílica, isobutilamida, poliacetileno, antocianina, 3-O-B-D-glicopiranosido, 3-O-(6-O-mabonil)-B-D-glicopiranosido, tusilagina, isotusilagina, dodecaisobutilamida isomérica, ácido tetraenoico, alquilamidas, apigenina, arabinogalacta, ácido ascórbico, ácido-behénico-ácido etanoico, betaína, borneol, acetato de bornilo, ácido cafeico, 2-O-cafeoil-3-(5-alfa-carboxibeta)-3,4-dihidroxifenilo, ácido 2-O-cafeoil-3-0-cumaroiltartárico, 6-O-cafeoilquinacósido, ácido 2-O-cafeoil-3-0-feruloiltartárico, ácido 2-O-cafeoiltartárico, beta-caroteno, carofileno, carofileno-epóxido, ácido clorogénico, ácido cicórico, metil éster de ácido cicórico, cianadin-3-O-(beta-d-glicopiranosido), cianadin-3-(6-O-malonil-beta-d-glicopiranosido), cinarina, isobutil amida de ácido deca-(2e,4e,6e)trienoico, desramnosilverbascosido, ácido 3,5-dicafeoilquinico, ácido 4,5-O-dicafeoilquinico, ácido 2,3-O-diferuloiltartárico, isobutil amida de ácido dodeca-(2e,4e)-dienoico, isovalerato de dodeca-2,4-dien-1-ilo, isobutil amida de ácido dodeca(2e,6z,8e,10e)-tetraenoico, beta-farneseno, ácido 2-O-feruloiltartárico, germacreno, heptadeca-(8z,11z)-dien-2-ona, heteroxilano, humuleno 8-12, (e)-10-hidroxi-4,10-dimetil-4,11-dodecadien-2-ona, ácido 13-hidroxi-octadeca-(9z,11c,15z)-trienoico, ácido isoclorogénico, isorhamnetina-3-rutinósido, isotusilagina, caempferol, caempferol-3-glucósido, caempferol-3-nutinósido, limoneno, luteolina, luteolina-7-glucósido, 2-metiltetradeca-5,12-dieno, 2-metiltetradeca-6,12-dieno, metil-p-hidroxicinamato, marcina, niacina, ácido palmítico, pentadeca-(8z,11z)-dien-2-ona, pentadeca-(8z,13z)-dien-11-lin-2-ona, pentadeca-8-en-2-ona, pentadeca-(8z)-en-2-ona, pentadeca-(8z)-en-11,13-dien-2-ona, 1-pentadeceno, penta-(1,8z)-dieno, fósforo, alfa-pineno, beta-pineno, poliacetilenos, pontica epóxido, quercetagina-7-glucósido, quercetina, quercetina-3-galactósido, quercetina-3-glucósido, quercetina-3-robinósido, quercetina-3-xilósido, quercetina-3-xilosilgalactósido, ramnoarabinogalactano, riboflavina, rutina, rutósido, beta-sitosterol, sitosterol-3-beta-O-glucósido, estigmasterol, ácido tartárico, tetradeca-(8z)-en-11,13-dien-2-ona, tiamina, n-triacontanol, trideca-1-en-3,5,7,9,10-pentaína, tusilagina, vanilina, verbascósido y carofilenos.
- 30 7. Composición según la reivindicación 6, **caracterizada** porque los aislados antimicrobianos comprenden resina de goma mirra.
- 35 8. Composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizada** porque el peso seco de la composición comprende:
- 40 del 0,01% al 12% de ácido fólico; y
- 45 del 2% al 90% de *Echinacea purpurea* y *Commiphora myrrha*.
- 50 9. Composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizada** porque la composición incluye además un diluyente y un agente tensioactivo.
- 55 10. Composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores para su utilización como medicamento.
- 60 11. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento del virus de inmunodeficiencia humana (VIH), virus 1 del herpes simplex, virus 2 del herpes simplex, virus

## ES 2 285 765 T3

de la varicela zoster (herpes zoster), citomegalovirus, Epstein-Barr, virus del papiloma, influenza vírica, parainfluenza vírica, adenovirus, encefalitis vírica, meningitis vírica, arbovirus, arenavirus, picornavirus, coronavirus, sineitialvirus, celulitis, estafilococos, estreptococos, micobacterias, encefalitis bacteriana, meningitis bacteriana o bacilos anaeróbicos.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65