

ANILLO INTRAVAGINAL MULTICOMPONENTE

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUD RELACIONADA

[0001] La presente solicitud reivindica la prioridad de la solicitud de patente provisional estadounidense n.º 63/479.848 presentada el 13 de enero de 2023, cuya divulgación se incorpora por referencia en el presente documento.

[0002] Esta invención se realizó con el apoyo del gobierno bajo P50HD106793 otorgado por los Institutos Nacionales de Salud (NIH). El gobierno tiene ciertos derechos sobre la invención.

CAMPO DE LA INVENCION

[0003] La presente divulgación se refiere a un anillo intravaginal (IVR) multicomponente para la liberación mejorada de agentes no hormonales útil como producto de tecnología de prevención polivalente (MPT) que previene simultáneamente los embarazos no deseados, previene y/o trata una o más infecciones de transmisión sexual (ITS), y promueve la salud vaginal.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0004] Las relaciones sexuales sin protección pueden conducir a embarazos no deseados e ITS (incluyendo VIH-1, VHS-2, y otras), que representan importantes problemas de salud reproductiva y sexual para las mujeres de todo el mundo.

[0005] Aunque los métodos hormonales tales como los anticonceptivos hormonales orales, el anillo vaginal hormonal y los dispositivos intrauterinos hormonales (DIU) son muy eficaces para prevenir el embarazo, no protegen contra las ITS. Además, el uso a largo plazo de productos hormonales puede aumentar el riesgo de acontecimientos adversos, tales como coágulos sanguíneos, y puede ser mal tolerado o estar contraindicado en algunas personas.

[0006] Actualmente, las únicas opciones no hormonales para prevenir el embarazo son los DIU de cobre y diversos dispositivos/productos pericoitales (incluyendo los preservativos masculinos y femeninos, los diafragmas/cápsulas cervicales, las esponjas vaginales, las películas vaginales, y el gel Phexxi® de tamponamiento ácido recientemente aprobado). Sin embargo, los DIU de cobre deben ser insertados por un profesional sanitario, y los métodos pericoitales presentan una eficacia de uso típica baja.

[0007] La inmensa mayoría de las mujeres prefiere y es más probable que use un producto de MPT que prevenga simultáneamente el embarazo no deseado y las ITS que los productos que sólo

previenen el embarazo o sólo las ITS. Hasta la fecha, los preservativos siguen siendo las únicas MPT aprobadas, pero su uso no es sistemático y su tasa de fracaso típico es del 13 %.

[0008] Los IVR liberadores de fármacos son dispositivos flexibles en forma de toroide fabricados principalmente con materiales termoestables de calidad médica (tales como elastómeros de silicona) o materiales termoplásticos (tales como copolímero de etileno-acetato de vinilo) y ofrecen una liberación sostenida o controlada de agentes terapéuticos en la vagina para obtener beneficios clínicos. Tradicionalmente, los IVR (i) proporcionan una opción de formulación cómoda para la administración de fármacos que tienen determinadas características fisicoquímicas, (ii) ofrecen una variabilidad relativamente baja en la tasa de liberación del fármaco, (iii) minimizan la absorción sistémica de fármacos, (iv) evitan el metabolismo hepático de primer paso del principio activo (cuando se produce la absorción del fármaco), y (v) ofrecen una adherencia y aceptabilidad/satisfacción mejoradas por parte del usuario en comparación con otras formas de dosificación vaginal.

[0009] La liberación controlada por permeación de sustancias a partir de los IVR comercializados actualmente requiere que la(s) sustancia(s) incorporada(s) se disuelva(n) en primer lugar en el material polimérico usado en la construcción del dispositivo y luego se difunda(n) a través de él. Hasta la fecha, los esfuerzos por avanzar en los IVR para la liberación de agentes no hormonales han sido limitados, debido a la escasa solubilidad y permeabilidad de los agentes no hormonales (que normalmente son hidrosolubles o hidrófilos) en los polímeros hidrófobos usados habitualmente para fabricar los IVR y/o a la relativa falta de potencia de los agentes no hormonales.

[0010] Los esfuerzos para superar estas limitaciones para extender la tecnología de los anillos vaginales a una gama más amplia de activos han incluido: (i) anillos fabricados usando goma arábica biosoluble o excipientes de hidrogel no biodegradables; (ii) anillos fabricados usando polímeros alternativos, tales como poliuretanos hidrófilos/hinchables en agua; (iii) anillos que contienen o están elaborados de componentes que tienen concentraciones relativamente altas de agentes activos hidrófilos y excipientes; y (iv) anillos que contienen una o más varillas o cubiertas discretas cargadas de fármacos que controlan la liberación del/de los activo(s) farmacológico(s).

[0011] Por ejemplo, Ovaprene® es el principal IVR no hormonal actualmente en desarrollo. Diseñado para proporcionar anticoncepción durante múltiples semanas, el dispositivo proporciona su actividad anticonceptiva de dos maneras: contiene una barrera de malla de polímero

semipermeable que bloquea físicamente la entrada de espermatozoides en el canal cervical, y libera gluconato ferroso del cuerpo del anillo principal que actúa localmente para impedir la movilidad de los espermatozoides.

[0012] Brij *et al.* informaron del desarrollo de un IVR compuesto por hidrogel de elastómero de poli(citrato de diol) nanoporoso para una liberación sostenida de anticonceptivos no hormonales y agentes contra el VIH, concretamente, gluconato ferroso, ácido L-ascórbico, y mezclas de ácido poliamino-policarboxílico (Ampholines) o ácido poli-L-glutámico (PLGA):tampón de bicarbonato de sodio (Development of a Nanoporous Elastomere Intra-Vaginal Ring (IVR) for the Sustained Release of Non-Hormonal Contraceptives, *J. Pharm. Drug Deliv. Res.* 2012, 1:1).

[0013] Inevitablemente, muchos de estos nuevos diseños de IVR requieren complejos procedimientos de fabricación de múltiples etapas que son difíciles y costosos de escalar y fabricar. El uso de una alta concentración de un agente activo puede provocar efectos citotóxicos en el tejido epitelial vaginal. La incorporación de múltiples agentes en el mismo compartimento dentro de un anillo puede conducir a interacciones fármaco-fármaco, con posibles implicaciones para la estabilidad y la liberación del fármaco. Además, la combinación de diferentes fármacos en el mismo IVR plantea retos debido a las diferentes solubilidades y tasas de liberación objetivo de los diferentes fármacos.

[0014] Con más de 1 millón de nuevos casos diarios de ITS en todo el mundo, los nuevos métodos de MPT deben proporcionar una cobertura de ITS de amplio espectro, ya que un ámbito limitado de prevención/tratamiento de las ITS podría conducir a una compensación del riesgo conductual en la que la protección frente a un patógeno o el tratamiento del mismo puede aumentar el riesgo de contraer otros.

[0015] Existe la necesidad de desarrollar nuevos IVR que: (i) ofrezcan una liberación sostenida/controlada de agentes no hormonales, (ii) sean prácticos de usar, (iii) sean altamente eficaces en la prevención de embarazos no deseados y en la prevención/tratamiento de una o más ITS, y (iv) puedan fabricarse fácilmente mediante procedimientos convencionales y escalables.

SUMARIO DE LA INVENCION

[0016] En un aspecto, la presente divulgación se refiere a un IVR para administrar por vía intravaginal una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente activo no hormonal o una combinación del mismo a un sujeto de sexo femenino.

[0017] En un aspecto, la presente divulgación se refiere a un método de fabricación de un IVR para administrar por vía intravaginal un principio activo o una combinación del mismo a un sujeto de sexo femenino.

[0018] En un aspecto, la presente divulgación se refiere a un método de prevención de embarazos no deseados, y de prevención o tratamiento de una enfermedad provocada por una infección bacteriana y viral mediante la aplicación intravaginal de un IVR con el propósito de administrar una cantidad farmacéuticamente eficaz de un principio activo o una combinación del mismo a un sujeto de sexo femenino.

[0019] En una realización, el IVR puede comprender una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente activo no hormonal dispersado en un elastómero.

[0020] En una realización, el agente activo no hormonal puede comprender al menos uno seleccionado de un componente de cobre, un componente de zinc o un componente de lactida.

[0021] En una realización, el agente activo no hormonal puede comprender un componente de lactida y al menos uno seleccionado de un componente de cobre, o un componente de zinc.

[0022] En una realización, el agente activo no hormonal puede comprender un componente de lactida, un componente de cobre, y un componente de zinc.

[0023] En una realización, el componente de cobre puede ser cobre metálico, óxido de cobre, una sal de cobre o un complejo ion de cobre-ligando.

[0024] En una realización, el componente de zinc puede ser zinc metálico, óxido de zinc o una sal de zinc.

[0025] En una realización, el componente de lactida puede ser D-lactida, L-lactida, DL-lactida o ácido láctico.

[0026] En una realización, el elastómero puede seleccionarse de silicona, copolímero de acetato de vinilo y polietileno (EVA), copolímero en bloque de estireno-butadieno-estireno, polifosfaceno, poli(isopreno), poli(isobutileno), polibutadieno, poliuretano, caucho de nitrilo, caucho de neopreno, o una combinación de los mismos.

[0027] En una realización, el elastómero puede incluirse en una cantidad de aproximadamente el 50% a aproximadamente el 99 % del peso total del IVR.

[0028] En una realización, el IVR puede estar en forma de matriz, y el elastómero es silicona.

[0029] En una realización, el IVR está en forma de núcleo expuesto, y el elastómero es poli(etileno-acetato de vinilo) o poliuretano.

[0030] En una realización, la sal de cobre puede ser sulfato de cobre anhidro o sulfato de cobre hidratado.

[0031] En una realización, la sal de zinc puede ser acetato de zinc, formiato de zinc, lactato de zinc, cloruro de zinc, sulfato de zinc, yoduro de zinc, citrato de zinc, u orotato de zinc, cada uno de los cuales está en forma anhidra o hidratada.

[0032] En una realización, el agente activo no hormonal puede incluirse en una cantidad de aproximadamente el 5 % en peso a aproximadamente el 50 % en peso, basándose en una cantidad total del IVR.

[0033] En una realización, el IVR puede tener iones de cobre, iones de zinc y ácido láctico liberados a una razón molar de 1:1:1 a 1:6:6 después de un periodo inicial del primer día.

[0034] En una realización, el IVR puede tener una liberación de iones de cobre a una tasa de 2 mg/día a 31 mg/día durante un periodo de uso de 30 días.

[0035] En una realización, el IVR puede liberar iones de zinc a una tasa de 1 mg/día a 17 mg/día durante un periodo de uso de 30 días.

[0036] En una realización, el IVR puede liberar ácido láctico a una tasa de 12 mg/día a 105 mg/día durante un periodo de uso de 30 días.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0037] La figura 1 ilustra la diferencia de sales de zinc para una reducción de la movilidad del 50 % con un intervalo de confianza (IC) del 95 %.

[0038] La figura 2 ilustra la dosis-respuesta de movilidad de los espermatozoides para un API único.

[0039] La figura 3 ilustra los resultados de penetración de los espermatozoides en el moco cervical del API único y de la combinación CS-ZL-LA (CSL).

[0040] La figura 4 ilustra la sinergia trazada frente a la eficacia (expresada como la fracción afectada (Fa)) para las combinaciones 2-API y 3-API.

[0041] La figura 5 ilustra la inhibición de la movilidad para la combinación CS-ZL-LA.

[0042] La figura 6 ilustra el porcentaje de espermatozoides móviles en diferentes etapas experimentales para API (combinación CS-ZL-LA) y control SVF.

[0043] La figura 7 ilustra el porcentaje de espermatozoides sometidos a exocitosis acrosómica después de 3 horas de incubación en condiciones capacitantes.

[0044] La figura 8 ilustra el porcentaje de espermatozoides muertos o dañados en la tinción Sybr14/yoduro de propidio después de la etapa de lavado o después de 3 horas de incubación en condiciones capacitantes.

[0045] La figura 9 ilustra el porcentaje de espermatozoides que muestran patrones de tinción CTB:488 asociados con una fluidez de membrana aumentada cuando se incuban durante 3 horas para el control sin tratar, el control SVF y API (combinación CS-ZL-LA) en condiciones capacitantes (2OHCD 5 mM) y no capacitantes.

[0046] La figura 10 ilustra la actividad anti-VIH-1_{BaL} de los API, solos y en combinación.

[0047] La figura 11 ilustra la actividad anti-VIH-1_{BaL} de los API en ausencia/presencia de líquidos biológicos y a concentraciones que inhiben la movilidad de los espermatozoides.

[0048] La figura 12 ilustra la actividad anti-VHS-2 de los API, solos y en combinación.

[0049] La figura 13 ilustra la actividad anti-VHS-2 de los API en ausencia/presencia de líquidos biológicos solos y a concentraciones que inhiben la movilidad de los espermatozoides.

[0050] La figura 14 ilustra la actividad inhibidora del API contra *N. gonorrhoeae*.

[0051] La figura 15 ilustra la actividad bactericida del API contra *C. trachomatis* en presencia de líquidos biológicos.

[0052] La figura 16 ilustra la liberación diaria y acumulada de lactida a partir de los IVR.

[0053] La figura 17 ilustra la liberación diaria y acumulada de ácido láctico de los IVR.

[0054] La figura 18 ilustra la liberación diaria y acumulada de iones de cobre a partir de los IVR.

[0055] La figura 19 ilustra la liberación diaria y acumulada de iones de zinc a partir de los IVR.

[0056] La figura 20 ilustra el efecto de los API sobre el pH.

[0057] La figura 21 ilustra el pH del medio de liberación de los API durante el estudio de liberación *in vitro* de 30 días.

[0058] La figura 22 ilustra la viabilidad de los explantes ectocervicales tras una única exposición a los API.

[0059] La figura 23 ilustra la evaluación histológica de los explantes ectocervicales tras una única exposición a los API.

[0060] La figura 24 ilustra las concentraciones de citocinas inflamatorias tras una única exposición de los explantes ectocervicales a los API.

[0061] La figura 25 ilustra la viabilidad y la TEER en tejido VEC-100 tras una única exposición a los API.

[0062] La figura 26 ilustra la viabilidad y la TEER en tejido VEC-100 tras la exposición repetida a los API.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

[0063] Antes de describir al menos una realización de la invención en detalle, debe entenderse que la invención no está limitada en su aplicación a los detalles expuestos en la siguiente descripción o ilustrada por los ejemplos. La invención es capaz de otras realizaciones o practicarse o llevarse a cabo de diversas maneras. Por tanto, debe entenderse que pueden hacerse numerosas modificaciones a las realizaciones ilustrativas y que pueden idearse otras disposiciones sin apartarse del espíritu y alcance de la presente divulgación. También debe entenderse que la formulación y la terminología empleadas en el presente documento son con el propósito de descripción y no deben considerarse limitativas.

[0064] Todas las mediciones realizadas en el presente documento se realizan a temperatura ambiente ($25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$) y presión normal, a menos que se indique lo contrario. Todas las temperaturas usadas en el presente documento se expresan en grados centígrados a menos que se especifique lo contrario.

[0065] La presente divulgación puede comprender (de forma abierta) o consistir esencialmente en los componentes, así como en otros componentes, agentes o elementos descritos en el presente documento. A menos que se indique lo contrario, el término “sustancia”, “componente”, “ingrediente”, “activo” o “agente” usado en el presente documento es intercambiable. En el presente documento, el término “que comprende” significa que tiene los elementos citados, o su equivalente en estructura o función, más cualquier otro elemento o elementos no citados. Los términos “tener” e “incluir” usados en el presente documento también deben interpretarse como abiertos, a menos que el contexto sugiera lo contrario. Los términos “que comprende”, “que tiene” y “que incluye” abarcan los términos “que consiste en” y “que consiste esencialmente en”. El término “que consiste esencialmente en” significa que la composición o método puede incluir componentes y/o etapas adicionales, pero sólo si los componentes y/o etapas adicionales no alteran materialmente las características de la composición o método reivindicados.

[0066] Todos los intervalos citados en el presente documento incluyen los puntos finales, y aquellos que se encuentran entre medias. Términos tales como “aproximadamente”, “generalmente”, “sustancialmente” y similares deben interpretarse como una modificación de un término o valor de manera que no sea absoluto, pero no se basa en el estado de la técnica. Tales términos se definen por las circunstancias y los términos que modifican tal como los entiende un experto habitual en la materia. Esto incluye, como mínimo, el grado de error experimental esperado, el error de la técnica y el error del instrumento para una técnica determinada usada para medir un valor. A menos que se indique lo contrario, el término “aproximadamente”, tal como se usa en el presente documento, incluye todos los valores en un intervalo del valor específico indicado $\pm 10\%$.

[0067] A menos que se indique lo contrario, los términos “un/o” y “una” incluyen el plural, de manera que, por ejemplo, “un componente” puede significar al menos un componente, así como una pluralidad de componentes, incluyendo, pero sin limitarse a, componentes de diferentes tipos.

[0068] Cuando se usa en el presente documento, el término “y/o” en una lista de dos o más elementos significa que una cualquiera de las características enumeradas puede estar presente, o cualquier combinación de dos o más de las características enumeradas puede estar presente. Por ejemplo, si una composición se describe como compuesta por los agentes A, B, y/o C, la composición puede comprender A solo; B solo; C solo; A y B en combinación; A y C en combinación; B y C en combinación; o A, B, y C en combinación.

[0069] Tal como se usa en el presente documento, el término “anticonceptivo” se refiere a un agente activo o a una combinación del mismo administrado para prevenir o reducir la probabilidad de concepción o embarazo.

[0070] Tal como se usa en el presente documento, el término “antimicrobiano” se refiere a un agente activo o a una combinación de los mismos capaz de inhibir o destruir el crecimiento de un organismo microbiano. Los agentes antimicrobianos incluyen, pero no se limitan a, agentes antibacterianos, antifúngicos, antiprotozoarios, y antivirales.

[0071] Tal como se usa en el presente documento, el término “anillo intravaginal”, “anillo vaginal”, “anillo” o “IVR” se refiere a un dispositivo de administración polimérico en forma de rodete, que está diseñado para insertarse en la vagina de un sujeto de sexo femenino para proporcionar la administración (por ejemplo, liberación controlada) de un agente activo a la vagina durante un periodo prolongado de tiempo.

[0072] Tal como se usa en el presente documento, el término “anillo de matriz” o “anillo de tipo matriz” se refiere a un IVR en el que un agente activo o una combinación del mismo, opcionalmente con otros excipientes, están distribuidos homogéneamente por todo el anillo elastomérico. Los anillos de matriz se fabrican normalmente mediante moldeo por inyección o extrusión de la mezcla que contiene agente(s) activo(s), lo que conduce a una distribución uniforme del/de los agente(s) activo(s) por todo el anillo elastomérico. Los anillos de matriz también pueden fabricarse mediante impresión 3D avanzada o procedimientos de fabricación aditiva. En algunas realizaciones, este diseño proporciona un decaimiento de liberación exponencial o de primer orden, caracterizado por una alta liberación inicial de agente, seguido de una tasa de liberación más baja de agente. De manera más general, este diseño de matriz proporciona una liberación de fármaco que se caracteriza por una liberación de ráfaga inicial relativamente alta, seguido de tasas de liberación de fármaco decrecientes con el tiempo, aunque se observan otros tipos de cinética en circunstancias particulares.

[0073] Tal como se usa en el presente documento, el término “anillo de depósito”, “anillo con núcleo expuesto” o “anillo de tipo de núcleo expuesto” se refiere a un IVR que comprende un depósito, al menos un núcleo de longitud total o parcial, rodeado por una cubierta. El núcleo y la cubierta pueden estar elaborados del mismo material o de materiales diferentes. Por ejemplo, el núcleo y la cubierta pueden estar elaborados del mismo elastómero o de elastómeros diferentes. Diversos agentes activos pueden incorporarse y liberarse de la cubierta o del núcleo expuesto. En algunas realizaciones, diversos agentes activos pueden incorporarse y liberarse sólo desde la cubierta, sólo desde el núcleo, o desde ambos. Este diseño puede modular la tasa de liberación del fármaco en comparación con un anillo matriz, proporcionando a menudo una liberación sustancialmente constante (o de orden cero) del agente.

[0074] Tal como se usa en el presente documento, el término “elastómero” se refiere a una red polimérica que se forma cuando un polímero o una mezcla de polímeros experimentan reticulación. Normalmente, los elastómeros se forman por reticulación química, y la reticulación covalente garantiza que el elastómero vuelva a su configuración original cuando se elimina la tensión. Sin embargo, los elastómeros también se extienden a determinados polímeros termoplásticos que presentan reticulaciones físicas. Independientemente del tipo de elastómero, el polímero está comprendido normalmente por unidades monoméricas, que están unidas entre sí para formar la red polimérica. Las unidades monoméricas pueden comprender carbono, hidrógeno,

oxígeno, silicio, halógeno, o una combinación de los mismos. Además, un elastómero es normalmente un material que presente viscoelasticidad (es decir, tanto viscosidad como elasticidad) y con fuerzas intermoleculares débiles, generalmente bajo módulo de Young (E), y alta deformación en rotura en comparación con otros materiales.

[0075] Tal como se usa en el presente documento, el término “prevenir”, “prevención”, “tratar”, “tratamiento” o “terapia” tal como se usa en el presente documento se refiere a la administración intravaginal de un agente activo o una combinación de los mismos, por ejemplo, a través de IVR, con el fin de prevenir o reducir la probabilidad de embarazo o de adquirir ITS, y/o inhibir o destruir el crecimiento de un organismo microbiano, incluyendo los que aumentan el riesgo de ITS y otros resultados reproductivos adversos.

[0076] Tal como se usa en el presente documento, el término “activo”, “farmacológicamente activo”, “terapéuticamente activo”, “farmacéuticamente activo” o “fisiológicamente activo” para describir “agente” tal como se usa en el presente documento significa cualquier material o compuesto químico usado solo o en combinación adecuado para la administración intravaginal, por ejemplo, a través de IVR, que induce un efecto deseado (por ejemplo, efecto sistémico).

[0077] Tal como se usa en el presente documento, el término cantidad “eficaz”, “farmacológicamente eficaz”, “terapéuticamente eficaz”, “farmacéuticamente eficaz” o “fisiológicamente eficaz” de un agente activo significa una cantidad no tóxica pero suficiente de un material o compuesto químico usado solo o en combinación con otro u otros materiales o compuestos, cuando se administra por vía intravaginal, por ejemplo, mediante IVR, para proporcionar el efecto terapéutico deseado.

[0078] Tal como se usa en el presente documento, la actividad de un “anticonceptivo” o su eficacia en la prevención del embarazo puede determinarse mediante la inhibición o reducción de la movilidad de los espermatozoides por los agentes liberados del IVR después de su administración intravaginal a una mujer.

[0079] Tal como se usa en el presente documento, el término “sinergia”, “sinergismo”, “efecto sinérgico” o “acción sinérgica” tal como se usa en el presente documento significa un efecto de la interacción de las acciones de dos o más agentes activos de manera que el resultado de la acción combinada es mayor de lo esperado como una simple combinación aditiva de los dos o más agentes que actúan por separado.

[0080] Tal como comprenderá un experto en la técnica, la cantidad eficaz de un agente, o el porcentaje de cantidad o la concentración de tal agente usado en la IVR, puede variar dependiendo de diversos factores, incluyendo, por ejemplo, la actividad anticonceptiva/antimicrobiana real de cada agente en la IVR hacia la diana que va a tratarse, el efecto sinérgico de la combinación de dos o más de tales agentes, el tipo de IVR y la forma de administración de tal agente (por ejemplo, si la forma de dosificación está destinada a la liberación prolongada). Tal actividad puede determinarse según métodos convencionales y las cantidades de principios activos pueden formularse en consecuencia.

[0081] El término “excipiente farmacéuticamente aceptable” o “excipiente” usado en el presente documento se refiere a portadores o vehículos, tampones, agentes formadores de gel o agentes espesantes, agentes de suspensión, emolientes, humectantes, solubilizantes, estabilizadores, agentes de ajuste del pH (también denominados agentes moduladores del pH), potenciadores de la liberación y conservantes, que no provocan irritación significativa a un organismo y no anulan la actividad biológica y las propiedades del agente activo aplicado.

[0082] El término “portadores” o “vehículos” usado en el presente documento se refiere a materiales portadores adecuados para la administración intravaginal a través de IVR e incluye cualquier material conocido en la técnica, por ejemplo, cualquier líquido, gel, disolvente, diluyente líquido, solubilizante o similar, que no sea tóxico y no interactúe con otros componentes de la composición de manera perjudicial. Los ejemplos de portadores adecuados incluyen agua, alcoholes, aceite mineral, silicona, azúcares líquidos, ceras, vaselina, y una variedad de otros aceites y materiales poliméricos.

[0083] El término “potenciadores de la liberación” usado en el presente documento se refiere a compuestos que potencia la tasa de liberación del/de los agente(s) a partir del IVR. Tales compuestos incluyen, pero no se limitan a, polivinilpirrolidona (PVP o povidona), éteres de celulosa modificados (por ejemplo, hidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa e hidroxipropilmetilcelulosa), celulosa microcristalina, ácido poliacrílico, carbómero, ácido alginico, carragenano, ciclodextrinas, dextrina, goma guar, gelatina, goma xantana y azúcares (por ejemplo, monosacáridos tales como glucosa, fructosa y galactosa, y disacáridos tales como lactosa, maltosa y fructosa).

[0084] Tal como se usa en el presente documento, el término “liberación” o “tasa de liberación” se refiere a la cantidad o concentración del agente activo que abandona el IVR en

cualquier periodo de tiempo definido. “Liberación sostenida” o “tasa de liberación sostenida” se refiere a la liberación suficiente para proporcionar propiedades anticonceptivas y/o propiedades antimicrobianas durante un periodo de tiempo específico (por ejemplo, un periodo prolongado).

[0085] En un aspecto, la presente divulgación se refiere a un IVR para administrar por vía intravaginal una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente activo no hormonal o una combinación de los mismos a un sujeto de sexo femenino.

[0086] El sujeto de sexo femenino puede ser un mamífero de sexo femenino, incluyendo un ser humano de sexo femenino.

[0087] En una realización, la IVR puede ser de tipo matriz y comprender una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un agente no hormonal dispersado en un elastómero.

[0088] En otra realización, el IVR puede ser de tipo núcleo expuesto, y comprender una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un agente no hormonal dispersado en al menos un elastómero de núcleo, y/o elastómero de cubierta.

[0089] Los ejemplos de elastómeros incluyen, pero no se limitan a, siliconas (organopolisiloxanos), copolímero de poli(etileno-acetato de vinilo) (EVA), copolímeros en bloque de estireno-butadieno-estireno, polifosfacenos, poli(isopreno), poli(isobutileno), polibutadienos, poliuretanos, cauchos de nitrilo, cauchos de neopreno y mezclas de los mismos. Se prefieren especialmente los elastómeros de silicona, también conocidos como cauchos de silicona.

[0090] Tal como se usa en el presente documento, el término “silicona” o “polisiloxano” se refiere a cualquiera de los diversos compuestos que contienen átomos alternos de silicio y oxígeno en una disposición lineal o cíclica, normalmente con uno o dos grupos orgánicos unidos a cada átomo de silicio. Por ejemplo, los polisiloxanos incluyen polisiloxanos sustituidos, y diorganopolisiloxanos, tales como diarilpolisiloxanos y dialquilpolisiloxanos, tales como dimetilpolisiloxano.

[0091] En una realización, el elastómero está presente en una concentración de aproximadamente el 50 % a aproximadamente el 99 % en peso total del IVR. En una realización, el elastómero está presente en una concentración de aproximadamente el 70 % a aproximadamente el 99 %, preferiblemente de aproximadamente el 90 % a aproximadamente el 99 % en peso total del IVR. En una realización, el elastómero está presente en una concentración de aproximadamente el 95 % en peso total del anillo, o de aproximadamente el 97 % en peso total del anillo.

[0092] En una realización, el IVR puede ser de tipo matriz, y puede comprender elastómero de silicona (SE) en una concentración de aproximadamente el 50 % a aproximadamente el 99 %, preferiblemente de aproximadamente el 65 % a aproximadamente el 90 %, y más preferiblemente, de aproximadamente el 70 % a aproximadamente el 80 % en peso total del IVR. El agente no hormonal se distribuye en el SE antes del mezclado final.

[0093] En una realización, el IVR puede ser un tipo de núcleo expuesto, y puede comprender termoplásticos tales como poli(etileno-acetato de vinilo) que contiene el 40 % de EVA (EVA40) o poliuretano termoplástico (TPU) en una concentración de aproximadamente el 50 % a aproximadamente el 99 %, preferiblemente de aproximadamente el 55 % a aproximadamente el 90 %, y más preferiblemente, de aproximadamente el 55 % a aproximadamente el 80 % en peso total del IVR, mezclado con el agente no hormonal. Los polímeros termoplásticos se muelen usando métodos de molienda criogénica para producir un polímero en polvo a partir de granulado de reserva. Los polvos de agente no hormonal se pesan en razones adecuadas con el polvo de EVA40 o TPU y se mezclan usando un método apropiado.

[0094] Los ejemplos de un agente no hormonal incluyen, pero no se limitan a, un componente de cobre, un componente de zinc y un componente de lactida. El componente de cobre puede ser cobre metálico, óxido de cobre, una sal de cobre o un complejo ion de cobre-ligando. El cobre metálico puede estar en forma de micropartículas o nanopartículas de cobre. Los ejemplos de sales de cobre incluyen, pero no se limitan a, sulfato de cobre anhidro y sulfato de cobre hidratado (tal como $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$). El componente de cobre puede ser preferiblemente sulfato de cobre anhidro. El componente de zinc puede ser zinc metálico, óxido de zinc o una sal de zinc. El zinc metálico puede estar en forma de micropartículas o nanopartículas de zinc. Los ejemplos de sales de zinc incluyen, pero no se limitan a, formas anhidras e hidratadas, tales como acetato de zinc, acetato de zinc hidratado (incluyendo $\text{Zn}(\text{OAc})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), formiato de zinc, formiato de zinc hidratado, lactato de zinc, lactato de zinc hidratado (incluyendo lactato de zinc dihidratado), cloruro de zinc, cloruro de zinc hidratado, sulfato de zinc anhidro, sulfato de zinc hidratado (tal como $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), yoduro de zinc, yoduro de zinc hidratado, citrato de zinc, citrato de zinc hidratado, orotato de zinc y orotato de zinc hidratado. El componente de zinc puede ser preferiblemente lactato de zinc anhidro, acetato de zinc anhidro, sulfato de zinc anhidro, o hidrato de sulfato de zinc. El componente de zinc puede ser lo más preferiblemente lactato de zinc anhidro. El componente de lactida puede ser una lactona, tal como lactida, ácido láctico, o una forma oligomérica o polimérica de ácido láctico (ácido

lactoiláctico o poli(ácido láctico)). El componente de lactida puede estar en forma de D-lactida (tal como (R,R)-D-lactida o (S,S)-D-lactida), (R,S)-meso-lactida, DL-lactida, o una mezcla de los mismos. El componente de lactida puede ser preferiblemente DL-lactida.

[0095] Tal como se usa en el presente documento, a menos que se defina específicamente lo contrario, el sulfato de cobre también puede denominarse sulfato de cobre (anhidro), CS, o CSA; el acetato de zinc también puede denominarse acetato de zinc (anhidro), ZnA, o ZA; el lactato de zinc también puede denominarse lactato de zinc (anhidro), ZnL, ZL, o ZLA; la lactida también puede denominarse DL-lactida, LT o L; y el ácido láctico también puede denominarse LA.

[0096] La molienda puede realizarse en el agente no hormonal antes de usarse como material en la fabricación de IVR. En una realización, el acetato de zinc y la lactida pueden requerir molienda antes de usarse como materiales para la fabricación de IVR. Generalmente, el agente no hormonal no molido puede tener una distribución de tamaño de partícula en donde el 90 % tiene un tamaño de partícula de más de 100 μm y menos de 1.000 μm , mientras que el agente no hormonal molido puede tener una distribución de tamaño de partícula en donde el 90 % tiene un tamaño de partícula de menos de 50 μm , preferiblemente menos de 30 μm , más preferiblemente menos de 20 μm , tal como 10 μm . En algunas realizaciones, el agente no hormonal no molido puede tener una distribución de tamaño de partícula en donde más del 90 % de las partículas se encuentran dentro del intervalo de tamaño de 100 a 1.000 μm , mientras que el agente no hormonal molido puede tener una distribución de tamaño de partícula en donde más del 90 % de las partículas tienen un tamaño de menos de 100 μm , preferiblemente menos de 50 μm , más preferiblemente menos de 20 μm , tal como 10 μm . El tamaño de partícula del agente no hormonal puede variarse para alterar las características de la tasa de liberación del IVR.

[0097] En una realización, el IVR puede comprender al menos dos agentes no hormonales, cada uno en una cantidad terapéuticamente eficaz y dispersado en un elastómero. Los agentes no hormonales se seleccionan de un componente de cobre, un componente de zinc, o un componente de lactida. En una realización, el IVR puede comprender un componente de lactida y al menos uno de un componente de cobre o un componente de zinc, cada uno en una cantidad terapéuticamente eficaz y dispersado en un elastómero. En una realización, el IVR puede comprender un componente de cobre, un componente de zinc y un componente de lactida dispersados en un elastómero, cada uno en una cantidad terapéuticamente eficaz.

[0098] En una realización, de aproximadamente 100 mg a aproximadamente 1.600 mg, y preferiblemente de aproximadamente 250 mg a aproximadamente 1.600 mg, de un componente de cobre está presente en el IVR. En una realización, de aproximadamente 100 mg a aproximadamente 1.600 mg, y preferiblemente de aproximadamente 250 mg a aproximadamente 1.600 mg, de un componente de zinc está presente en el IVR. En una realización, de aproximadamente 100 mg a aproximadamente 1.600 mg, y preferiblemente de aproximadamente 250 mg a aproximadamente 1.600 mg, de un componente de lactida está presente en el IVR. En una realización, de aproximadamente 100 mg a aproximadamente 1.600 mg, y preferiblemente de aproximadamente 250 mg a aproximadamente 1.600 mg, de un componente de lactida, y en combinación con al menos de 100 mg a aproximadamente 1.600 mg, y preferiblemente de aproximadamente 250 mg a aproximadamente 1.600 mg, de un componente de cobre, o de 100 mg a aproximadamente 1.600 mg, y preferiblemente de aproximadamente 250 mg a aproximadamente 1.600 mg, de un componente de zinc están presentes en el IVR. En una realización, de aproximadamente 100 mg a aproximadamente 1.600 mg, y preferiblemente de aproximadamente 250 mg a aproximadamente 1.600 mg, de un componente de lactida, de 100 mg a aproximadamente 1.600 mg, y preferiblemente de aproximadamente 260 mg a aproximadamente 1.600 mg, de un componente de cobre, y de 100 mg a aproximadamente 1.600 mg, y preferiblemente de aproximadamente 250 mg a aproximadamente 1.600 mg, de un componente de zinc están presentes en el IVR.

[0099] En una realización, de aproximadamente el 5 % en peso a aproximadamente el 50 % en peso, de aproximadamente el 5 % en peso a aproximadamente el 45 % en peso, de aproximadamente el 5 % en peso a aproximadamente el 40 % en peso, o de aproximadamente el 5 % en peso a aproximadamente el 35 % en peso, y preferiblemente de aproximadamente el 5 % en peso a aproximadamente el 30 % en peso, o de aproximadamente el 10 % en peso a aproximadamente el 20 % en peso, de un componente de cobre está presente en el IVR. En una realización, de aproximadamente el 5 % en peso a aproximadamente el 50 % en peso, de aproximadamente el 5 % en peso a aproximadamente el 45 % en peso, de aproximadamente el 5 % en peso a aproximadamente el 40 % en peso, o de aproximadamente el 5 % en peso a aproximadamente el 35 % en peso, y preferiblemente de aproximadamente el 5 % en peso a aproximadamente el 30 % en peso, o de aproximadamente el 10 % en peso a aproximadamente el 20 % en peso, de un componente de zinc, está presente en el IVR. En una realización, de

aproximadamente el 5 % en peso a aproximadamente el 50 % en peso, de aproximadamente el 5 % en peso a aproximadamente el 45 % en peso, de aproximadamente el 5 % en peso a aproximadamente el 40 % en peso, o de aproximadamente el 5 % en peso a aproximadamente el 35 % en peso, y preferiblemente de aproximadamente el 5 % en peso a aproximadamente el 30 % en peso, o de aproximadamente el 10 % en peso a aproximadamente el 20 % en peso, de un componente de lactida está presente en el IVR. En una realización, de aproximadamente el 5 % en peso a aproximadamente el 50 % en peso, de aproximadamente el 5 % en peso a aproximadamente el 45 % en peso, de aproximadamente el 5 % en peso a aproximadamente el 40 % en peso, o de aproximadamente el 5 % en peso a aproximadamente el 35 % en peso, y preferiblemente de aproximadamente el 5 % en peso a aproximadamente el 30 % en peso, o de aproximadamente el 10 % en peso a aproximadamente el 20 % en peso, de un componente de lactida, y en combinación con al menos el 5 % en peso a aproximadamente el 50 % en peso, de aproximadamente el 5 % en peso a aproximadamente el 45 % en peso, de aproximadamente el 5 % en peso a aproximadamente el 40 % en peso, o de aproximadamente el 5 % en peso a aproximadamente el 35 % en peso, y preferiblemente de aproximadamente el 5 % en peso a aproximadamente el 30 % en peso, o de aproximadamente el 10 % en peso a aproximadamente el 20 % en peso, de un componente de cobre, o de aproximadamente el 5 % en peso a aproximadamente el 50 % en peso, de aproximadamente el 5 % en peso a aproximadamente el 45 % en peso, de aproximadamente el 5 % en peso a aproximadamente el 40 % en peso, o de aproximadamente el 5 % en peso a aproximadamente el 35 % en peso, y preferiblemente de aproximadamente el 5 % en peso a aproximadamente el 30 % en peso, o de aproximadamente el 10 % en peso a aproximadamente el 20 % en peso, de un componente de zinc están presentes en el IVR. En una realización, de aproximadamente el 5 % en peso a aproximadamente el 50 % en peso, de aproximadamente el 5 % en peso a aproximadamente el 45 % en peso, de aproximadamente el 5 % en peso a aproximadamente el 40 % en peso, o de aproximadamente el 5 % en peso a aproximadamente el 35 % en peso, y preferiblemente de aproximadamente el 5 % en peso a aproximadamente el 30 % en peso, o de aproximadamente el 10 % en peso a aproximadamente el 20 % en peso, de un componente de lactida, de aproximadamente el 5 % en peso a aproximadamente el 50 % en peso, de aproximadamente el 5 % en peso a aproximadamente el 45 % en peso, de aproximadamente el 5 % en peso a aproximadamente el 40 % en peso, o de aproximadamente el 5 % en peso a aproximadamente el 35 % en peso, y preferiblemente de aproximadamente el 5 % en peso a

aproximadamente el 30 % en peso, o de aproximadamente el 10 % en peso a aproximadamente el 20 % en peso, de un componente de cobre, y de aproximadamente el 5 % en peso a aproximadamente el 50 % en peso, de aproximadamente el 5 % en peso a aproximadamente el 45 % en peso, de aproximadamente el 5 % en peso a aproximadamente el 40 % en peso, o de aproximadamente el 5 % en peso a aproximadamente el 35 % en peso, y preferiblemente de aproximadamente el 5 % en peso a aproximadamente el 30 % en peso, o de aproximadamente el 10 % en peso a aproximadamente el 20 % en peso, de un componente de zinc están presentes en el IVR.

[0100] El IVR puede comprender otros agentes farmacéuticamente compatibles en una cantidad adecuada. Tales agentes incluyen agentes farmacológicamente activos, así como agentes farmacológicamente inactivos conocidos en la técnica como excipientes farmacéuticamente aceptables.

[0101] Los ejemplos de agentes farmacológicamente activos incluyen, pero no se limitan a, cualquier agente antimicrobiano adecuado, incluyendo agentes antibacterianos, antifúngicos, antiprotozoarios y antivirales conocidos en la técnica.

[0102] Los agentes antibacterianos adecuados incluyen, pero no se limitan a, acrosoxacina, amifloxacina, amoxicilina, ampicilina, aspoxicilina, azidocilina, azitromicina, aztreonam, balofloxacina, bencilpenicilina, biapenem, brodimoprim, cefaclor, cefadroxil, cefatrizina, cefcapeno, cefdinir, cefetamet, cefmetazol, cefprozil, cefroxadina, ceftibuten, cefuroxima, cefalexina, cefalonio, cefaloridina, cefamandol, cefazolina, cefradina, clorquinaldol, clortetraciclina, ciclacilina, cinoxacina, ciprofloxacina, claritromicina, ácido clavulánico, clindamicina, clofazimina, cloxacilina, danofloxacina, dapsona, demeclociclina, dicloxacilina, difloxacina, doxiciclina, enoxacina, enrofloxacina, eritromicina, fleroxacina, flomoxef, flucloxacilina, flumequina, fosfomicina, isoniazida, levofloxacina, ácido mandélico, mecilinam, metronidazol, minociclina, mupirocina, nadifloxacina, ácido nalidíxico, nifurtoinol, nitrofurantoína, nitroxolina, norfloxacina, ofloxacina, oxitetraciclina, panipenem, pefloxacina, fenoximetilpenicilina, ácido pipemídico, ácido piromídico, pivampicilina, pivmecillinam, prulifloxacina, rufloxacina, esparfloxacina, sulbactam, sulfabenzamida, sulfacitina, sulfametopirazina, sulfacetamida, sulfadiazina, sulfadimidina, sulfametizol, sulfametoxazol, sulfanilamida, sulfasomidina, sulfatiazol, temafloxacina, tetraciclina, tetroxoprim, tinidazol, tosufloxacina, trimetoprim y sales o ésteres de los mismos.

[0103] Los agentes antifúngicos adecuados incluyen, pero no se limitan a, bifonazol, butoconazol, clordantoína, clorfenesina, ciclopirox olamina, clotrimazol, eberconazol, econazol, fluconazol, flutrimazol, isoconazol, itraconazol, ketoconazol, miconazol, nifuroxima, tioconazol, terconazol, ácido undecenoico y sales o ésteres de los mismos.

[0104] Los agentes antiprotozoarios adecuados incluyen, pero no se limitan a, acetarsol, azanidazol, cloroquina, metronidazol, nifuratel, nimorazol, omidazol, propenidazol, secnidazol, sinefungin, tenonitrozol, temidazol, tinidazol y sales o ésteres de los mismos.

[0105] Los agentes antivirales adecuados incluyen, pero no se limitan a, aciclovir, brivudina, cidofovir, curcumina, dapivirina, desciclovir, 1-docosanol, edoxudina, famciclovir, fiacitabina, ibacitabina, imiquimod, lamivudina, penciclovir, valaciclovir, valganciclovir y sales o ésteres de los mismos.

[0106] Cuando se emplean, los otros agentes activos descritos anteriormente pueden estar presentes en una cantidad de aproximadamente el 0,5 a aproximadamente el 40 % p/p y preferiblemente de aproximadamente el 2,5 a aproximadamente el 15 % p/p del IVR.

[0107] Los ejemplos de excipientes farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, portadores o vehículos, tampones, agentes formadores de gel o agentes espesantes, agentes de suspensión, emolientes, humectantes, solubilizantes, estabilizadores, agentes de ajuste del pH (también denominados agentes moduladores del pH), potenciadores de la liberación y conservantes, que no provocan irritación significativa a un organismo y no anulan la actividad biológica y las propiedades del agente activo aplicado.

[0108] Los potenciadores de la liberación adecuados incluyen, pero no se limitan a, polivinilpirrolidona (PVP o povidona), éteres de celulosa modificados (por ejemplo, hidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa e hidroxipropilmetilcelulosa), celulosa microcristalina, ácido poliacrílico, carbómero, ácido alginico, carragenano, ciclodextrinas, dextrina, goma guar, gelatina, goma xantana y azúcares (por ejemplo, monosacáridos tales como glucosa, fructosa y galactosa, y disacáridos tales como lactosa, maltosa y fructosa). Cuando se emplea, el potenciador de la liberación puede estar presente en una cantidad de aproximadamente el 0,5 a aproximadamente el 40 % p/p y preferiblemente de aproximadamente el 2,5 a aproximadamente el 15 % p/p del IVR.

[0109] El IVR puede tener un peso de aproximadamente 2 g a aproximadamente 15 g, preferiblemente de aproximadamente 5 g a aproximadamente 10 g, y más preferiblemente de aproximadamente 8 g.

[0110] El IVR puede tener cualquier forma y cualquier dimensión compatibles con la administración intravaginal a un sujeto de sexo femenino. Un anillo de este tipo puede autoinsertarse en la vagina, donde se mantiene en su lugar debido a su forma y elasticidad inherente. En una realización, el IVR fabricado tiene un diámetro exterior de 50 a 60 mm. En otra realización, el IVR tiene un diámetro exterior de aproximadamente 50 mm, aproximadamente 51 mm, aproximadamente 52 mm, aproximadamente 53 mm, aproximadamente 54 mm, aproximadamente 55 mm, aproximadamente 56 mm, aproximadamente 57 mm, aproximadamente 58 mm, aproximadamente 59 mm o aproximadamente 60 mm. En otra realización, el IVR tiene un diámetro transversal de 4,0 a 10 mm. En aún otra realización, el IVR tiene un diámetro de sección transversal de aproximadamente 4,0 mm, aproximadamente 4,5 mm, aproximadamente 5,0 mm, aproximadamente 5,5 mm, aproximadamente 5,6 mm, aproximadamente 6,0 mm, aproximadamente 6,2 mm, aproximadamente 6,5 mm, aproximadamente 7,0 mm, aproximadamente 7,1 mm, aproximadamente 7,2 mm, aproximadamente 7,3 mm, aproximadamente 7,4 mm, aproximadamente 7,5 mm, aproximadamente 7,6 mm, aproximadamente 7,7 mm, aproximadamente 7,8 mm, aproximadamente 7,9 mm, aproximadamente 8,0 mm, aproximadamente 8,5 mm, aproximadamente 9,0 mm, o aproximadamente 9,5 mm.

[0111] El IVR puede hincharse en medios acuosos, dependiendo del tipo y la carga de los activos.

[0112] El IVR puede analizarse para la liberación *in vitro* usando diversos medios de liberación, como agua, tampones o líquido vaginal simulado. Por ejemplo, la cualificación de los iones de cobre y zinc liberados del IVR puede analizarse mediante espectroscopia de absorción atómica (AAS) o espectroscopia de emisión atómica de plasma acoplado inductivamente (ICP-OES), y la cualificación de la lactida y su producto de hidrólisis ácido láctico liberado del IVR puede analizarse mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) con detección espectroscópica. En realizaciones preferidas, el cobre, el zinc, el ácido láctico o la lactida se determinan cuando el IVR se coloca en agua desionizada (60 rpm, 37 °C) durante 30 días.

[0113] El IVR de la presente divulgación proporciona liberación controlada a largo plazo de cobre o su ion, zinc o su ion, o ácido láctico. Sorprendentemente, un IVR que comprende una combinación de al menos dos de un componente de cobre, un componente de zinc, o un componente de lactida proporciona una mayor liberación de cobre o su ion, zinc o su ion, o ácido láctico, en comparación con el que comprende un solo componente. Particularmente, la cantidad o la tasa de liberación pueden ser mayores cuando el IVR comprende un agente no hormonal en forma de sal, en comparación con el que comprende un agente no hormonal en forma de nanopartículas metálicas, presumiblemente debido a la mayor solubilidad en agua de la sal.

[0114] El IVR de la presente divulgación, cuando está en uso, es capaz de liberar ácido láctico (o el equivalente de lactida) en el espacio vaginal, a una tasa de liberación inicial de 1-30 mg, preferiblemente de 1-25 mg, más preferiblemente de 1-20 mg, tal como se determina *in vitro*, durante el periodo inicial de 24 horas, seguido de una tasa de liberación de “mantenimiento” de 0,15-15 mg, preferiblemente de 0,20-10 mg, más preferiblemente de 0,20-8 mg, tal como se determina *in vitro*, diariamente durante al menos el siguiente periodo de 28 días. Los estudios de pH *in vitro* también han demostrado que el ácido láctico liberado del IVR produce una reducción del pH.

[0115] El IVR de la presente divulgación, cuando está en uso, es capaz de liberar cobre o su ion, o zinc o su ion, en el espacio vaginal, a una tasa de liberación inicial de 1-50 mg, preferiblemente de 1-30 mg, más preferiblemente de 1-25 mg, tal como se determina *in vitro*, durante el periodo inicial de 24 horas, seguido de una tasa de liberación de “mantenimiento” de 0,15-20 mg, preferiblemente de 0,20-15 mg, lo más preferiblemente de 0,20-10 mg, tal como se determina *in vitro*, diariamente durante al menos el siguiente periodo de treinta días, una tasa de liberación de “refuerzo” de 1-40 mg, preferiblemente de 1-20 mg, lo más preferiblemente de 1-10 mg, tal como se determina *in vitro*, diariamente durante al menos el siguiente periodo de diez días, y otra tasa de liberación de “mantenimiento” de 0,15-20 mg, preferiblemente de 0,20-15 mg, lo más preferiblemente de 0,20-10 mg, tal como se determina *in vitro*, diariamente durante al menos el siguiente periodo de ocho días.

[0116] En una realización, opcionalmente en combinación con cualquiera de las características o realizaciones descritas en el presente documento, el IVR de la presente divulgación, cuando está en uso, es capaz de tener una liberación sostenida y continua de ácido láctico (o el equivalente de lactida) en el espacio vaginal, a una tasa de al menos 15 mg/día,

preferiblemente de al menos 20 mg/día, de al menos 25 mg/día, de al menos 30 mg/día, de al menos 35 mg/día, o de al menos 40 mg/día tal como se determina *in vitro*, durante los primeros 15 días de un periodo de 30 días. En una realización, opcionalmente en combinación con cualquiera de las características o realizaciones descritas en el presente documento, el IVR de la presente divulgación, cuando está en uso, es capaz de tener una liberación sostenida y continua de ácido láctico (o el equivalente de lactida) en el espacio vaginal, a una tasa de 15 a 110 mg/día, preferiblemente de 20 a 105 mg/día tal como se determina *in vitro*, durante los primeros 15 días.

[0117] En una realización, el IVR de la presente divulgación, cuando está en uso, es capaz de liberar ácido láctico (o el equivalente de lactida) en el espacio vaginal, a una tasa de liberación de 5-150 mg/día, preferiblemente de 10 a 110 mg/día, más preferiblemente de 12-105 mg/día, o de 20-150 mg/día tal como se determina *in vitro*, durante un periodo de 30 días. En una realización, el IVR de la presente divulgación, cuando está en uso, es capaz de liberar iones de cobre en el espacio vaginal, a una tasa de liberación de 1-50 mg/día, preferiblemente de 2-35 mg/día, o de 5-50 mg/día tal como se determina *in vitro*, durante un periodo de 30 días. En una realización, el IVR de la presente divulgación, cuando está en uso, es capaz de liberar iones de zinc en el espacio vaginal, a una tasa de liberación de 1-40 mg/día, preferiblemente de 1-20 mg/día, o de 2-40 mg/día tal como se determina *in vitro*, durante un periodo de 30 días.

[0118] En una realización, el IVR de la presente divulgación, que comprende 10CSA-10ZLA-10L (una combinación del 10 % en peso de sulfato de cobre (anhidro), el 10 % en peso de lactato de zinc (anhidro), y el 10 % en peso de lactida), cuando está en uso, es capaz de liberar en el espacio vaginal, ácido láctico (o el equivalente en lactida) a una tasa de liberación de 12-60 mg/día, liberar iones de cobre a una tasa de liberación de 2-20 mg/día, y liberar iones de zinc a una tasa de liberación de 1-10 mg/día tal como se determina *in vitro*, durante un periodo de 30 días. En una realización, el IVR de la presente divulgación, que comprende 10CSA-10ZLA-20L (una combinación del 10 % en peso de sulfato de cobre (anhidro), el 10 % en peso de lactato de zinc (anhidro) y el 20 % en peso de lactida), cuando está en uso, es capaz de liberar en el espacio vaginal ácido láctico (o el equivalente en lactida) a una tasa de liberación de 12-105 mg/día, liberar iones de cobre a una tasa de liberación de 2-35 mg/día, y liberar iones de zinc a una tasa de liberación de 1-20 mg/día tal como se determina *in vitro*, durante un periodo de 30 días. En una realización, el IVR de la presente divulgación, que comprende 5CSA-10ZLA-10L (una combinación del 5 % en peso de sulfato de cobre (anhidro), el 10 % en peso de lactato de zinc

(anhidro), y el 10 % en peso de lactida), cuando está en uso, es capaz de liberar en el espacio vaginal ácido láctico (o el equivalente en lactida) a una tasa de liberación de 5-50 mg/día, liberar iones de cobre a una tasa de liberación de 1-20 mg/día, y liberar iones de zinc a una tasa de liberación de 1-8 mg/día tal como se determina *in vitro*, durante un periodo de 30 días. En una realización, el IVR de la presente divulgación, que comprende 5CSA-20ZLA-20L (una combinación del 5 % en peso de sulfato de cobre (anhidro), el 20 % en peso de lactato de zinc (anhidro), y el 20 % en peso de lactida), cuando está en uso, es capaz de liberar en el espacio vaginal ácido láctico (o el equivalente en lactida) a una tasa de liberación de 15-100 mg/día, liberar iones de cobre a una tasa de liberación de 2-20 mg/día, y liberar iones de zinc a una tasa de liberación de 2-40 mg/día tal como se determina *in vitro*, durante un periodo de 30 días. En una realización, el IVR de la presente divulgación, que comprende 10CSA-10ZLA-30L (una combinación del 10 % en peso de sulfato de cobre (anhidro), el 10 % en peso de lactato de zinc (anhidro), y el 30 % en peso de lactida), cuando está en uso, es capaz de liberar en el espacio vaginal ácido láctico (o su equivalente en lactida) a una tasa de liberación de 20-150 mg/día, liberar iones de cobre a una tasa de liberación de 5-50 mg/día, y liberar iones de zinc a una tasa de liberación de 2-30 mg/día, determinada *in vitro*, durante un periodo de 30 días. En el presente documento, % en peso se refiere a un porcentaje en peso basándose en el peso total del IVR.

[0119] En una realización, el IVR de la presente divulgación, cuando está en uso, es capaz de liberar ácido láctico (o el equivalente de lactida) en el espacio vaginal, a una tasa de liberación inicial de 20-60 mg, preferiblemente de 22-55 mg, más preferiblemente de 50-55 mg, tal como se determina *in vitro*, durante el periodo de la primera semana, seguido de una tasa de liberación de 30-105 mg, preferiblemente de 50-90 mg, más preferiblemente de 85-90 mg, tal como se determina *in vitro*, diariamente durante el siguiente periodo de 7 días, una tasa de liberación de 20-30 mg, preferiblemente de 22-30 mg, más preferiblemente de 25-30 mg, y una tasa de liberación de 12-25 mg, tal como se determina *in vitro*, diariamente durante el siguiente periodo de 7 días.

[0120] En una realización, el IVR de la presente divulgación, cuando está en uso, es capaz de liberar iones de cobre en el espacio vaginal, a una tasa de liberación inicial de 2-31 mg, preferiblemente de 4-31 mg, tal como se determina *in vitro*, durante el periodo de la primera semana, seguido de una tasa de liberación de 2-20 mg, preferiblemente de 15-20 mg, tal como se determina *in vitro*, diariamente durante el siguiente periodo de 7 días, una tasa de liberación de

2-10 mg, preferiblemente de 4-10 mg, y una tasa de liberación de 2-5 mg, tal como se determina *in vitro*, diariamente durante el siguiente periodo de 7 días.

[0121] En una realización, el IVR de la presente divulgación, cuando está en uso, es capaz de liberar iones de zinc en el espacio vaginal, a una tasa de liberación inicial de 1-17 mg, preferiblemente de 12-17 mg, tal como se determina *in vitro*, durante el periodo de la primera semana, seguido de una tasa de liberación de 5-9 mg, preferiblemente de 7-9 mg, tal como se determina *in vitro*, diariamente durante el siguiente periodo de 7 días, una tasa de liberación de 2-5 mg, y una tasa de liberación de 1-3 mg, tal como se determina *in vitro*, diariamente durante el siguiente periodo de 7 días.

[0122] En una realización, la tasa de liberación de iones de cobre a partir de un IVR multicomponente de la presente divulgación (por ejemplo, un anillo que comprende un componente de cobre y al menos uno de un componente de zinc o un componente de lactida) se aumenta en comparación con la tasa de liberación de iones de cobre a partir de un IVR que comprende un componente de cobre sin o bien un componente de zinc o bien un componente de lactida. Por ejemplo, en una realización, la tasa de liberación de iones de cobre a partir de un IVR de la presente divulgación que comprende un componente de cobre y uno o ambos de un componente de zinc o un componente de lactida se aumenta al menos aproximadamente de 1,5 a aproximadamente 2 veces por día en comparación con la tasa de liberación de iones de cobre a partir de un IVR que comprende un componente de cobre sin o bien un componente de zinc o bien un componente de lactida. En otra realización, la tasa de liberación de iones de cobre a partir de un IVR de la presente divulgación que comprende un componente de cobre y o bien un componente de zinc o bien un componente de lactida se aumenta al menos aproximadamente 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45 ó 50 veces al día en comparación con la tasa de liberación de iones de cobre a partir de un IVR que comprende un componente de cobre sin o bien un componente de zinc o bien un componente de lactida.

[0123] En una realización, la tasa de liberación acumulada de iones de cobre a partir de un IVR de la presente divulgación que comprende un componente de cobre y o bien un componente de zinc o bien un componente de lactida se aumenta al menos aproximadamente de 1,5 a aproximadamente 2 veces después de 7 días, después de 14 días, después de 21 días, después de 30 días, después de 60 días, o después de 90 días en comparación con la tasa de liberación

acumulada de iones de cobre a partir de un IVR que comprende un componente de cobre sin o bien un componente de zinc o bien un componente de lactida después de 7 días, después de 14 días, después de 21 días, después de 30 días, después de 60 días, o después de 90 días. En una realización, la tasa de liberación acumulada de iones de cobre a partir de un IVR de la presente divulgación que comprende un componente de cobre y o bien un componente de zinc o bien un componente de lactida se aumenta al menos aproximadamente después de 7 días, después de 14 días, después de 21 días, después de 30 días, después de 60 días, o después de 90 días en comparación con la tasa de liberación acumulada de iones de cobre a partir de un IVR que comprende un componente de cobre sin o bien un componente de zinc o bien un componente de lactida después de 7 días, después de 14 días, después de 21 días, después de 30 días, después de 60 días, o después de 90 días. En otra realización, la tasa de liberación acumulada de iones de cobre a partir de un IVR de la presente divulgación que comprende un componente de cobre y o bien un componente de zinc o bien un componente de lactida se aumenta al menos aproximadamente 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45 ó 50 veces después de 7 días, después de 14 días, después de 21 días, después de 30 días, después de 60 días, o después de 90 días en comparación con la tasa de liberación acumulada de iones de cobre a partir de un IVR que comprende un componente de cobre sin o bien un componente de zinc o bien un componente de lactida después de 7 días, después de 14 días, después de 21 días, después de 30 días, después de 60 días, o después de 90 días. En una realización, la tasa de liberación acumulada de iones de cobre a partir de un IVR de la presente divulgación que comprende un componente de zinc o un componente de lactida se aumenta en aproximadamente de 2 veces a 50 veces, en aproximadamente de 2 veces a aproximadamente 25 veces, en aproximadamente de 2 veces a aproximadamente 20 veces, en aproximadamente de 2 veces a aproximadamente 15 veces, en aproximadamente de 2 veces a aproximadamente 10 veces, en aproximadamente de 2 veces a aproximadamente 5 veces, en aproximadamente de 5 veces a aproximadamente 25 veces, en aproximadamente de 5 veces a aproximadamente 20 veces, en aproximadamente de 5 veces a aproximadamente 15 veces, en aproximadamente de 5 veces a aproximadamente 10 veces, en aproximadamente de 10 veces a aproximadamente 25 veces, o en aproximadamente de 10 veces después de 7 días, después de 14 días, después de 21 días, después de 30 días, después de 60 días, o después de 90 días en comparación con la tasa de liberación acumulada de iones de cobre a partir de un IVR que comprende un componente de cobre sin o bien

un componente de zinc o bien un componente de lactida después de 7 días, después de 14 días, después de 21 días, después de 30 días, después de 60 días, o después de 90 días.

[0124] En una realización, la tasa de liberación de iones de zinc a partir de un IVR multicomponente de la presente divulgación (por ejemplo, un anillo que comprende un componente de zinc y al menos uno de un componente de cobre o un componente de lactida) aumenta en comparación con la tasa de liberación de iones de zinc a partir de un IVR que comprende un componente de zinc sin o bien un componente de cobre o bien un componente de lactida. Por ejemplo, en una realización, la tasa de liberación de iones de zinc a partir de un IVR de la presente divulgación que comprende un componente de zinc y cualquiera o ambos de un componente de cobre o un componente de lactida se aumenta al menos aproximadamente de 1,5 a aproximadamente 2 veces al día en comparación con la tasa de liberación de iones de zinc a partir de un IVR que comprende un componente de zinc sin o bien un componente de cobre o bien un componente de lactida. En otra realización, la tasa de liberación de iones de zinc a partir de un IVR de la presente divulgación que comprende un componente de zinc y o bien un componente de cobre o bien un componente de lactida se aumenta al menos aproximadamente 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45 ó 50 veces al día en comparación con la tasa de liberación de iones de zinc a partir de un IVR que comprende un componente de zinc sin o bien un componente de cobre o bien un componente de lactida.

[0125] En una realización, la tasa de liberación acumulada de iones de zinc a partir de un IVR de la presente divulgación que comprende un componente de zinc y o bien un componente de cobre o bien un componente de lactida se aumenta al menos de aproximadamente 1,5 a aproximadamente 2 veces después de 7 días, después de 14 días, después de 21 días, después de 30 días, después de 60 días, o después de 90 días en comparación con la tasa de liberación acumulada de iones de zinc a partir de un IVR que comprende un componente de zinc sin o bien un componente de cobre o bien un componente de lactida después de 7 días, después de 14 días, después de 21 días, después de 30 días, después de 60 días, o después de 90 días. En una realización, la tasa de liberación acumulada de iones de zinc a partir de un IVR de la presente divulgación que comprende un componente de zinc y cualquiera o ambos de un componente de cobre o un componente de lactida se aumenta al menos aproximadamente 10 veces después de 7 días, después de 14 días, después de 21 días, después de 30 días, después de 60 días, o después de

90 días en comparación con la tasa de liberación acumulada de iones de zinc a partir de un IVR que comprende un componente de zinc sin o bien un componente de cobre o bien un componente de lactida después de 7 días, después de 14 días, después de 21 días, después de 30 días, después de 60 días, o después de 90 días. En otra realización, la tasa de liberación acumulada de iones de cobre a partir de un IVR de la presente divulgación que comprende un componente de zinc y o bien un componente de cobre o bien un componente de lactida se aumenta al menos aproximadamente 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45 ó 50 veces después de 7 días, después de 14 días, después de 21 días, después de 30 días, después de 60 días, o después de 90 días en comparación con la tasa de liberación acumulada de iones de zinc a partir de un IVR que comprende un componente de zinc sin o bien un componente de cobre o bien un componente de lactida después de 7 días, después de 14 días, después de 21 días, después de 30 días, después de 60 días, o después de 90 días. En una realización, la tasa de liberación acumulada de iones de zinc a partir de un IVR de la presente divulgación que comprende un componente de cobre o un componente de lactida se aumenta aproximadamente de 2 veces a 50 veces, aproximadamente de 2 veces a aproximadamente 25 veces, aproximadamente de 2 veces a aproximadamente 20 veces, aproximadamente de 2 veces a aproximadamente 15 veces, aproximadamente de 2 veces a aproximadamente 10 veces, aproximadamente de 2 veces a aproximadamente 5 veces, aproximadamente de 5 veces a aproximadamente 25 veces, aproximadamente de 5 veces a aproximadamente 20 veces, aproximadamente de 5 veces a aproximadamente 15 veces, aproximadamente de 5 veces a aproximadamente 10 veces, aproximadamente de 10 veces a aproximadamente 25 veces, o aproximadamente de 10 veces a aproximadamente 20 veces después de 7 días, después de 14 días, después de 21 días, después de 30 días, después de 60 días, o después de 90 días en comparación con la tasa de liberación acumulada de iones de zinc a partir de un IVR que comprende un componente de zinc sin o bien un componente de cobre o bien un componente de lactida después de 7 días, después de 14 días, después de 21 días, después de 30 días, después de 60 días, o después de 90 días.

[0126] En una realización, las tasas de liberación son estables tras 3 meses de almacenamiento. En una realización, las tasas de liberación son estables tras 6 meses de almacenamiento. En una realización, las tasas de liberación son estables tras 12 meses de almacenamiento. En una realización, las tasas de liberación son estables tras 24 meses de

almacenamiento. En una realización, las tasas de liberación son estables tras 36 meses de almacenamiento.

[0127] En un aspecto, la presente divulgación se refiere a un método de elaboración de un IVR para administrar por vía intravaginal un principio activo o una combinación del mismo a un sujeto de sexo femenino.

[0128] El anillo de tipo matriz puede comprender un agente no hormonal o una combinación del mismo en elastómero de silicona. Alternativamente, los anillos de matriz pueden contener un polímero de poliuretano o EVA, o una mezcla de ambos.

[0129] Los anillos de tipo matriz de silicona pueden fabricarse mezclando los agentes no hormonales, opcionalmente con otros agentes activos y excipientes, en el material de silicona en diferentes calidades médicas junto con un agente reticulante adecuado (tal como ortosilicato de propilo (NPOS)) y un catalizador (tal como platino) si lo hubiera, inyectando la mezcla en moldes de inyección adecuadamente diseñados (tales como máquina de moldeo por inyección Babyplast® equipada con conjuntos de moldes de anillos personalizados), y opcionalmente aplicando calor para hacer que la mezcla de silicona se cure/reticule formando un elastómero. Más generalmente, los anillos de silicona de tipo matriz pueden fabricarse mezclando los agentes no hormonales, opcionalmente con otros agentes activos y excipientes, en un sistema de elastómero de silicona adecuadamente formulado (que puede incluir polímeros de silicona base, agentes de reticulación y catalizadores de curado, y otros adecuados para uso médico) y luego inyectando la mezcla en una máquina de moldeo por inyección.

[0130] Los anillos de tipo matriz termoplásticos pueden prepararse: (i) mezclando los agentes no hormonales, opcionalmente con otros agentes activos y excipientes, en un polímero termoplástico (tal como copolímero de etileno-acetato de vinilo (EVA) o un poliuretano) usando una mezcladora de doble husillo, (ii) granulando la mezcla, y (iii) moldeando por inyección para formar los IVR usando una máquina de moldeo por inyección equipada con moldes de inyección personalizados. En una realización, el enfriamiento del material elaborado puede llevarse a cabo usando aire y/o cintas de transporte refrigeradas. El uso de un baño de agua refrigerante puede no ser posible debido a la naturaleza soluble en agua de los principios activos no hormonales. Una vez enfriada, la varilla que sale de la prensa extrusora puede cortarse en pequeños gránulos y usarse en operaciones posteriores de moldeo por inyección. En otra realización, los anillos de tipo matriz termoplásticos pueden fabricarse por extrusión, cortando el producto extruido a la longitud deseada

y soldando los extremos para formar un dispositivo en forma de anillo, similar al método de fabricación comercial del IVR anticonceptivo NuvaRing®.

[0131] Pueden fabricarse anillos con núcleo expuesto más complejos usando diferentes segmentos de núcleo cargados de fármaco (o bien polímero con activo incrustado o bien tubo de cobre) y una membrana polimérica que tiene orificios/ventanas que exponen parcialmente los segmentos de núcleo cargados de fármaco.

[0132] En una realización, un agente no hormonal o una combinación del mismo puede colocarse en el núcleo con una cubierta vacía. En algunas realizaciones, un agente se coloca en el núcleo y los otros agentes se colocan en la cubierta. En una realización, el componente de lactida puede colocarse en el núcleo y el componente de cobre y el componente de zinc pueden colocarse en la cubierta. En otras realizaciones, el componente de cobre o el componente de zinc pueden colocarse en la cubierta. En otras realizaciones, pueden colocarse dos componentes en el núcleo y un componente en la cubierta.

[0133] Puede usarse un procedimiento de dos etapas para preparar el anillo con núcleo expuesto. En una realización, en primer lugar se produce un anillo con núcleo de la misma manera que el anillo matriz descrito anteriormente. Luego se coloca este núcleo en una segunda cavidad de molde diseñada para mantener el núcleo en el centro de la cavidad y producir además aberturas (ventanas) en la capa de cubierta a medida que se va formando.

[0134] Las temperaturas y tiempos de curado varían dependiendo del/de los elastómero(s) usado(s). Las temperaturas de curado son preferiblemente inferiores al punto de fusión de los agentes no hormonales usados. Por ejemplo, la temperatura de curado puede variar entre temperatura ambiente (15-25 °C) y aproximadamente 150 °C, preferiblemente dentro del intervalo de aproximadamente 60-125 °C, y más preferiblemente dentro del intervalo de aproximadamente 90-115 °C. El tiempo de curado puede variar entre unos pocos segundos y varias horas, dependiendo de factores tales como el/los elastómero(s) usado(s) y la temperatura de curado.

[0135] Los anillos pueden caracterizarse por microscopía, calorimetría diferencial de barrido (DSC), análisis termo gravimétrico (TGA), espectroscopia de absorción atómica (AES), ICP-OES, y HPLC para sondear la naturaleza y el comportamiento de los activos en los dispositivos, evaluar la liberación, y evaluar las interacciones fármaco-fármaco y fármaco-polímero. Las pruebas mecánicas de los IVR pueden llevarse a cabo según métodos establecidos, tales como el uso de un probador EZ Test Universal de Shimadzu equipado con plantillas de prueba

personalizadas. Por ejemplo, pueden optimizarse diferentes pruebas mecánicas para las geometrías de los IVR y usarse para caracterizar mecánicamente el rendimiento de los IVR: dureza Shore M, compresión estática de 28 días, compresión de 5-20 mm, compresión de 1000 ciclos y alargamiento a la rotura.

[0136] En un aspecto, la presente divulgación se refiere a un método de prevención de embarazos no deseados, y de prevención y tratamiento de una enfermedad provocada por una infección bacteriana, fúngica, y viral mediante la aplicación de un IVR para administrar por vía intravaginal una cantidad farmacéuticamente eficaz de un agente activo o una combinación del mismo a un sujeto de sexo femenino.

[0137] En una realización, la enfermedad puede estar provocada por una infección de transmisión sexual.

[0138] El IVR se describe anteriormente. En una realización, el IVR de la presente divulgación puede ser útil para inhibir la movilidad de los espermatozoides, y/o prevenir o inhibir una infección provocada por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) tal como VIH-1, virus del herpes simple (VHS) tal como VHS-2, *N. gonorrhoeae*, *G. vaginalis* (asociado con vaginosis bacteriana (BV)), clamidia, etc.

[0139] En una realización, los efectos terapéuticos, incluyendo la inhibición de la enfermedad y el efecto anticonceptivo, se logran cuando al menos dos de los iones de cobre, iones de zinc o ácido láctico se liberan a partir del IVR en uso en el espacio vaginal.

[0140] En una realización, el efecto terapéutico se consigue cuando el ion de cobre y el ion de zinc se liberan a partir del IVR en uso en el espacio vaginal, tal como se determina *in vitro*, a una razón molar de 5:1 a 1:5, preferiblemente de 1:1 a 1:3, y más preferiblemente de 1:2 en un líquido vaginal cada día durante 24 días después de un periodo inicial de primer día de uso. En una realización, el efecto terapéutico se consigue cuando el ion de cobre y el ácido láctico se liberan a partir del IVR en uso en el espacio vaginal, tal como se determina *in vitro*, a una relación molar de 5:1 a 1:5, preferiblemente de 1:1 a 1:3, y más preferiblemente de 1:2 en un líquido vaginal cada día durante 24 días después de un periodo inicial de primer día de uso. En una realización, el efecto terapéutico se consigue cuando el ion de zinc y el ácido láctico se liberan a partir del IVR en uso en el espacio vaginal, tal como se determina *in vitro*, a una razón molar de 5:1 a 1:5, preferiblemente de 2:1 a 1:2, y más preferiblemente de 1:1 en un líquido vaginal cada día durante 24 días después de un periodo inicial de primer día de uso. En una realización, el efecto terapéutico

se consigue cuando el ion de cobre, el ion de zinc y el ácido láctico se liberan a partir del IVR en uso, tal como se determina *in vitro*, a una razón molar de 1:0,5:2 a 1:4:8, preferiblemente de 1:0,8:3, 1:1:2, 1:1:3, 1:1,25:5, 1:1,5:5, 1:3:7, y más preferiblemente de 1:1,5:5,25, en un líquido vaginal cada día durante 24 días después de un periodo inicial de primer día de uso.

[0141] En una realización, opcionalmente en combinación con cualquiera de las características o realizaciones descritas en el presente documento, preferiblemente cuando el IVR comprende una combinación de CSA-ZLA-L, el efecto terapéutico se consigue cuando el ion de cobre y el ion de zinc se liberan a partir del IVR en uso en el espacio vaginal, tal como se determina *in vitro*, a una razón molar de 1:1 a 1:6, preferiblemente de 1:3 a 1:6, y más preferiblemente de 1:3,5 a 1:5,5 en un líquido vaginal cada día durante 24 días después de un periodo inicial de primer día de uso. En una realización, opcionalmente en combinación con cualquiera de las características o realizaciones descritas en el presente documento, preferiblemente cuando el IVR comprende una combinación de CSA-ZLA-L, el efecto terapéutico se consigue cuando el ion de cobre y el ácido láctico se liberan a partir del IVR en uso en el espacio vaginal, tal como se determina *in vitro*, a una razón molar de 1:1 a 1:6, preferiblemente de 1:3 a 1:6, y más preferiblemente de 1:1,66 a 1:5,25 en un líquido vaginal cada día durante 24 días después de un periodo inicial del primer día de uso. En una realización, opcionalmente en combinación con cualquiera de las características o realizaciones descritas en el presente documento, preferiblemente cuando el IVR comprende una combinación de CSA-ZLA-L, el efecto terapéutico se consigue cuando el ion de zinc y el ácido láctico se liberan a partir del IVR en uso en el espacio vaginal, tal como se determina *in vitro*, a una razón molar de 3:1 a 1:1, preferiblemente de 2,5:1 a 1,1:1, y más preferiblemente de 2,2:1 a 1,05:1 en un líquido vaginal cada día durante 24 días después de un periodo inicial de primer día de uso. En una realización, opcionalmente en combinación con cualquiera de las características o realizaciones descritas en el presente documento, preferiblemente cuando el IVR comprende una combinación de CSA-ZLA-L, el efecto terapéutico se consigue cuando el ion de cobre, el ion de zinc y el ácido láctico se liberan a partir del IVR en uso, tal como se determina *in vitro*, a una razón molar de 1:1:1 a 1:6:6, preferiblemente de 1:3:3 a 1:6:6, y más preferiblemente de 1:35:1,66 a 1:5,5:5,25, incluso más preferiblemente a 1:5,5:5,25, en un líquido vaginal cada día durante 24 días después de un periodo inicial de primer día de uso.

[0142] En una realización, opcionalmente en combinación con cualquiera de las características o realizaciones descritas en el presente documento, preferiblemente cuando el IVR

comprende una combinación de CSA-ZLA-L, el ion de cobre y el ion de zinc están comprendidos en el IVR a una razón molar de 1:1 a 1:6, preferiblemente de 1:3 a 1:6, y más preferiblemente de 1:3,5 a 1:5. En una realización, opcionalmente en combinación con cualquiera de las características o realizaciones descritas en el presente documento, preferiblemente cuando el IVR comprende una combinación de CSA-ZLA-L, el ion de cobre y el ácido láctico están comprendidos en el IVR a una razón molar de 1:1 a 1:6, preferiblemente de 1:3 a 1:6, y más preferiblemente de 1:1,66 a 1:5,25. En una realización, opcionalmente en combinación con cualquiera de las características o realizaciones descritas en el presente documento, preferiblemente cuando el IVR comprende una combinación de CSA-ZLA-L, el ion de zinc y el ácido láctico están comprendidos en el IVR a una razón molar de 3:1 a 1:1, preferiblemente de 2,5:1 a 1,1:1, y más preferiblemente de 2,2:1 a 1,05:1 en un líquido vaginal cada día durante 24 días después de un periodo inicial de primer día de uso. En una realización, opcionalmente en combinación con cualquiera de las características o realizaciones descritas en el presente documento, preferiblemente cuando el IVR comprende una combinación de CSA-ZLA-L, el ion de cobre, el ion de zinc y el ácido láctico están comprendidos en el IVR a una razón molar de 1:1:1 a 1:6:6, preferiblemente de 1:3:3 a 1:6:6, y más preferiblemente de 1:3.5:1,66 a 1:5.5:5,25, incluso más preferiblemente a 1:5,5:5,25.

[0143] En una realización, el IVR de la presente divulgación puede ser útil para mantener la salud vaginal.

[0144] El IVR de la presente divulgación puede administrarse en la vagina de un sujeto de sexo femenino de aproximadamente 1 a aproximadamente 6 semanas antes de la relación sexual. En una realización, el IVR puede administrarse en la vagina de un sujeto de sexo femenino de aproximadamente 1 a aproximadamente 15 días antes de la relación sexual.

EJEMPLOS

[0145] Métodos para preparar los IVR

[0146] Los IVR de la presente divulgación pueden fabricarse mediante cualquier método conocido por los expertos en la técnica, pero preferiblemente usando tecnologías de moldeo por inyección o extrusión, y más preferiblemente mediante moldeo por inyección de reacción de sistemas de elastómeros de silicona. El término “moldeo por inyección” se refiere a los procedimientos de fabricación para producir piezas/dispositivos a partir de materiales termoplásticos o termoestables usando moldes de inyección adecuadamente diseñados. Los

ejemplos de materiales termoplásticos incluyen polietileno, poli(etileno-acetato de vinilo) (PEVA) y determinados poliuretanos; los ejemplos de materiales termoestables incluyen cauchos/elastómeros de silicona. Sin limitación, los anillos de elastómero de silicona de tipo matriz que contienen los agentes activos pueden prepararse (i) añadiendo y mezclando los agentes activos en uno o más componentes del sistema de silicona (por ejemplo, base, agente de reticulación, catalizador, excipiente, dispersante, etc.) (ii) inyectando la mezcla en moldes de inyección adecuadamente diseñados, y (iii) opcionalmente, aplicando calor para hacer que la mezcla de silicona se cure/reticule formando un elastómero.

[0147] Estos métodos comprenden generalmente la dispersión de los agentes activos y un elastómero, por ejemplo, polisiloxano, en un disolvente o agente dispersante apropiado, por ejemplo, líquido de silicona, y el curado de los anillos con un catalizador de platino, por ejemplo, un complejo platino-siloxano, preparando así un anillo catalizado por platino. Cualquiera de los elastómeros bien conocidos, por ejemplo, polisiloxanos, descritos anteriormente, puede usarse para preparar los IVR de la presente divulgación. En una realización, un elastómero, por ejemplo, polisiloxano, para su uso en los métodos de la presente divulgación, es un elastómero de silicona de dimetilsiloxano curado por adición, que comprende mezclas de moléculas de polidimetilsiloxano terminadas en hidruro-vinilo. En otra realización, un elastómero, por ejemplo, polisiloxano, para su uso en los métodos de la presente divulgación, es un elastómero de silicona de curado por condensación, que comprende moléculas de dimetilpolisiloxano terminadas en hidroxilo y un agente reticulante de tetraalcoxilsilano. En otra realización, el elastómero, por ejemplo, polidimetilsiloxano, para su uso en los métodos de la presente divulgación, es MED-8470. En determinadas realizaciones, los métodos comprenden además el uso de un reticulante, por ejemplo, reticulante de polisiloxano de dimetilmethylhidrógeno o polidimetilsiloxano funcional de hidruro. En otra realización, el elastómero de silicona puede comprender grupos orgánicos distintos de los grupos metilo, por ejemplo, flúor, fenilo, etc.

[0148] En una realización, el método comprende además catalizar los anillos en un molde anular. Luego puede abrirse el molde, tras lo cual se retira y recorta el IVR. Los moldes anulares, están preferiblemente recubiertos con, por ejemplo, Teflon™ o un recubrimiento metalizado aplicado electrolíticamente. Los moldes anulares pueden construirse de acero al carbono endurecido, acero inoxidable, aluminio, o cualquier otro material que se considere apropiado. Se aprecia que las dimensiones y diseños del molde imparten la forma física del IVR, por ejemplo,

un anillo parcial o completo, o cualquier otra forma deseada. Preferiblemente, el dispositivo tiene una forma de toroide parcial o completa, más preferiblemente una forma de rodete parcial o completa, o una forma sustancialmente cilíndrica. Por toroide se entiende un cuerpo en forma de anillo generado mediante la rotación de cualquier bucle cerrado (incluyendo una elipse, un círculo o cualquier curva irregular) alrededor de una línea fija externa a ese bucle. La forma de toroide puede ser un toroide completo o parcial. Por rodete se entiende un cuerpo en forma de anillo generado por la rotación de un círculo alrededor de una línea fija externa al círculo. La forma de rodete puede ser una forma de tipo anillo completo o parcial. Las características geométricas del molde y de los IVR pueden variar según lo requiera el uso.

[0149] Alternativamente, el dispositivo de IVR, o los componentes del mismo, pueden prepararse mediante procedimientos de extrusión, por ejemplo, coextrusión o extrusión de mezcla, bien conocidos por los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 5.059.363, cuyo contenido completo se incorpora en el presente documento como referencia). En realizaciones preferidas, los dispositivos de IVR pueden elaborarse mediante un elastómero de silicona LSR4350 de tipo matriz fabricado a 115 °C durante 3 minutos usado en los ejemplos descritos a continuación en el presente documento.

[0150] Estudios *in vitro* de reducción de la movilidad de los espermatozoides para CS-ZA-LA

[0151] Principio activo(API): CS-CuSO₄, ZA-Zn(OAC)₂, LA-ácido láctico

[0152] *Ensayo de movilidad de los espermatozoides*

[0153] Se obtuvieron muestras de espermatozoides humanos recién obtenidos el día del experimento. Se prepararon por adelantado disoluciones madre de 100 mM de cada API en solución salina. Inmediatamente antes del experimento, se prepararon disoluciones de cada concentración de API que iba a someterse a prueba mediante dilución con solución salina. Estas incluyen disoluciones de múltiples API añadidos juntos.

[0154] El efecto de cada API sobre la movilidad y viabilidad de los espermatozoides se determinó usando donantes humanos, añadiendo 200 µl de API diluidos en solución salina estéril a 50 µl de semen recién obtenido. Para evaluar la movilidad, se incubó la mezcla de incubación durante 5 minutos y luego dos investigadores formados en andrología contaron 100 espermatozoides al microscopio y los clasificaron como no móviles o móviles. Si eran móviles,

los espermatozoides se clasificaban además según la naturaleza de su movilidad: desde apenas movimiento sin progresión hacia delante hasta progresivamente móviles. Para tener en cuenta las variaciones naturales de las propiedades de los espermatozoides, cada experimento se repitió al menos tres veces en días distintos usando donantes diferentes.

[0155] *Análisis de los datos*

[0156] El % de movilidad para cada condición experimental se calculó normalizando la fracción de espermatozoides móviles en los grupos experimentales con la fracción de espermatozoides móviles en el grupo de control tratado con solución salina, estableciendo el 100 % en la fracción promedio de espermatozoides móviles de los experimentos de control. Por ejemplo, el % de movilidad a la concentración c sería:

$$\% \text{ de movilidad}_c = \frac{n.^{\circ} \text{ de espermatozoides móviles}_c}{n.^{\circ} \text{ de espermatozoides móviles}_{\text{solución salina}}}$$

[0157] Una vez obtenidos los datos de % de movilidad, se midió la sinergia con el software Compusyn. Véase Chou *et al.*, CompuSyn para combinaciones de fármacos: PC software and user's guide: a computer program for quantitation of synergism and antagonism in drug combinations, and the determination of IC₅₀, ED₅₀ and LD₅₀ values, que se incorpora en el presente documento como referencia en su totalidad. Los datos de movilidad para la concentración individual de API, así como para todas las disoluciones dobles y triples de API, se introdujeron en el programa y se analizaron según el principio del efecto mediano de Chou-Talalay. La tabla 1 muestra los valores de CE calculados.

[0158] Tabla 1: Valores de CE₅₀ y CE₉₀ de los API

Compuesto	CE ₅₀ (mM)	CE ₉₀ (mM)
CS	11,81	18,66
ZA	19,02	33,16
LA	20,54	28,68

[0159] La tabla 1 muestra que CS es el más eficaz entre los API, seguido de ZA y luego LA. Sin embargo, LA tiene el % más pequeño de diferencia entre sus concentraciones CE₅₀ y CE₉₀, lo que indica que pasado un determinado umbral su eficacia inhibidora de la movilidad empieza a aumentar rápidamente.

[0160] Además, indicó que todos los API funcionaban rápidamente para inmovilizar los espermatozoides, y su actividad se observó a los 30 segundos.

[0161] A continuación, se sometió a prueba la sinergia entre cada uno de los API para determinar si había algún efecto sinérgico entre los compuestos que permitiera unas dosificaciones reducidas. Se sometió a prueba cada una de las tres posibles combinaciones de dos compuestos, seguido de la combinación de los tres API. Las combinaciones de dos compuestos se sometieron a prueba usando diluciones en serie de una razón fija de API correspondiente a la razón aproximada de sus valores CE_{50} (2:1 para ZA:CS y LA:CS y 1:1 para ZA:LA). La sinergia se calculó con Compusyn usando el enfoque del efecto mediano de Chou-Talalay y se representó como un valor de CI (Índice de Combinación). Los valores de $CI < 1$ indican sinergia, mientras que los valores de $CI > 1$ indican antagonismo. Cuanto menor sea el valor de CI de una combinación, mayor será el grado de sinergia. La tabla 2 muestra los valores de CE de las combinaciones de dos compuestos, así como sus correspondientes valores de CI a esas concentraciones. Es importante señalar que las concentraciones de CE se refieren a la suma de las concentraciones de dos componentes (por ejemplo, la CE_{50} de 13,97 mM de 1:1 ZA:LA se refiere a 6,985 mM de LA + 6,985 mM de Zn). La tabla 2 muestra los valores calculados de CE y CI para cada combinación de 2 API.

[0162] Tabla 2: Valores de CE_{50} , CE_{90} y CI para las combinaciones de 2 API

Razón	Combinación	CE_{50} (mM)	CE_{90} (mM)	CI a CE_{50}	CI a CE_{90}
2:1	ZA:CS	11,89	20,73	0,78	0,80
2:1	LA:CS	10,50	17,98	0,64	0,55
1:1	LA:ZA	13,97	24,36	0,73	0,42

[0163] La tabla 2 muestra que las tres combinaciones presentaron una sinergia significativa, reduciendo las concentraciones de cada API individual necesarias para alcanzar el mismo nivel de efecto. LA también parece ser el API más significativo para aumentar la sinergia, produciendo valores de CI significativamente más bajos en sus dos combinaciones que la combinación ZA:CS. La tabla 2 también ilustra que los valores de CI de las combinaciones de LA aumentan con el aumento de la concentración de API y el nivel de efecto.

[0164] Después de completar las combinaciones de dos API, se sometió a prueba la sinergia completa de tres vías usando un ensayo de estilo tablero de ajedrez de 3x3x3 para someter a prueba las 27 permutaciones de tres concentraciones elegidas para cada uno de los tres API. Basándose en los resultados de los ensayos anteriores con 2 compuestos y en consideraciones prácticas sobre las tasas de liberación del anillo de API, se decidió usar concentraciones más altas

de ácido láctico que de CS y ZA con la esperanza de maximizar el efecto del ácido láctico sobre la sinergia y disminuir los niveles de liberación requeridos de CS y ZA. Para CS y ZA, las tres concentraciones elegidas fueron equivalentes a $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{3}$ y $\frac{1}{2}$ del valor de CE_{50} del API respectivo. Para LA, estas fracciones se duplicaron, dando como resultado concentraciones $\frac{1}{2}$, $\frac{2}{3}$ 1x del valor de CE_{50} . Las concentraciones reales usadas se enumeran en la tabla 3.

[0165] Tabla 3: Concentraciones usadas en los ensayos de sinergia de tipo tablero de ajedrez de 3 API

	[CS] (mM)	[ZA] (mM)	[LA] (mM)
Dosis 1	2,95	4,75	10,26
Dosis 2	3,94	6,34	13,70
Dosis 3	5,90	9,51	20,54

[0166] A partir de los datos resultantes, se aislaron los efectos estimados de cada uno de los API individuales promediando el % de reducción de la movilidad y los valores de CI para cada una de las concentraciones de API sometidas a prueba. Con este ensayo de tipo tablero de ajedrez de 3x3x3, cada concentración individual se sometió a prueba contra nueve permutaciones de los otros dos API, lo que significa que cada celda en la tabla 4 representa el promedio de las nueve combinaciones que involucran la concentración de API especificada.

[0167] Tabla 4: Efectos aislados de los API individuales de los ensayos de combinación de 3 API

	CS Reducción de movilidad promedio	ZA Reducción de movilidad promedio	LA Reducción de movilidad promedio	CS CI promedio	ZA CI promedio	LA CI promedio
Dosis 1	55,71%	63,47 %	54,75 %	0,59	0,48	0,69
Dosis 2	74,95 %	73,77 %	70,74%	0,44	0,47	0,51
Dosis 3	86,68%	80,09 %	91,84%	0,37	0,45	0,22

[0168] La tabla 4 muestra que, de los tres API, el CS parece ser el más eficaz y sinérgico a concentraciones relativamente bajas, mostrando un aumento constante del efecto y de CI en un intervalo de concentración muy estrecho. ZA muestra una capacidad similar, aunque menos pronunciada, para reducir la movilidad de los espermatozoides, pero no muestra prácticamente ningún efecto dosis-respuesta sobre el valor de CI. LA muestra efectos similares a los de CS y ZA a las dosis 1 y 2, pero experimenta un salto significativo en la reducción de la movilidad y,

especialmente, en el CI a la concentración más alta: su CE_{50} fue de 20,54 mM. En conjunto, estos datos indican que CS y ZA son mucho más eficaces para inducir sinergia y reducir la movilidad de los espermatozoides a porcentajes más bajos de sus valores de CE_{50} , mientras que LA requiere concentraciones relativas más altas para lograr los mismos efectos. Sin embargo, a estas altas concentraciones de ácido láctico, este se vuelve increíblemente potente a la hora de aumentar la sinergia entre los tres API.

[0169] Se seleccionaron las combinaciones de tres API que produjeron una reducción de la movilidad de >90 % y, junto con los conocimientos anteriores sobre la naturaleza de la sinergia, se usaron para seleccionar una combinación final de concentraciones con la que seguir adelante. La tabla 5 muestra todas estas combinaciones.

[0170] Tabla 5: Combinaciones de 3 API que provocaron una reducción de la movilidad >90 %

[CS] (mM)	[ZA] (mM)	[LA] (mM)	Reducción de la movilidad	CI
3	10	21	93,35	0,26
4	5	21	93,55	0,21
4	6	21	99,91	0,12
4	10	21	100	0,14
6	5	21	100	0,14
6	6	14	92,82	0,32
6	6	21	100	0,15

[0171] Basándose en los datos, se determinó que una concentración intravaginal objetivo de 4 mM de CS, 6 mM de ZA y 21 mM de LA sería la mezcla ideal a la que aspirar en futuras formulaciones de anillos. Los 4 mM de CS muestran capacidades significativas para inhibir la movilidad de los espermatozoides mientras están presentes a menos de la mitad de su CE_{50} original, reduciendo en gran medida su toxicidad potencial y reduciendo la tasa de liberación de anillo requerida. Se demostró que ZA es el API menos importante en cuanto a reducción de la movilidad e inducción de sinergia, por lo que se eligió el nivel bajo de 6 mM de ZA para minimizar los desafíos de la liberación de anillo y, al mismo tiempo, permitir que suficiente ZA actúe sinérgicamente con los otros API para mantener sus concentraciones al mínimo. Por último, se seleccionó LA en el nivel relativamente alto de 21 mM, ya que mostró un notable aumento en el

efecto y la sinergia a altas concentraciones, mostró la menor cantidad de toxicidad, y demostró ser mucho más capaz de liberarse a altas tasas a partir de anillos en estudios preliminares.

[0172] Estudios de diferentes sales de zinc

[0173] Se sometieron a prueba varias sales de zinc para determinar la reducción de la movilidad de los espermatozoides usando el ensayo de movilidad de los espermatozoides descrito anteriormente, y las actividades se mostraron en la figura 1. Se observó que el acetato de zinc, al liberarse de los anillos, desprendía un olor desagradable, y que el formiato de zinc presentaba problemas de solubilidad. Se seleccionó el lactato de zinc (ZL) basándose en su perfil general sobre la reducción de la movilidad de los espermatozoides, el olor, la solubilidad y el pH.

[0174] Estudios *in vitro* de reducción de la movilidad de los espermatozoides y penetración de los espermatozoides en el moco cervical para CS-ZL-LA

[0175] API: CS-CuSO₄, ZL-lactato de zinc, LA-ácido láctico

[0176] El efecto de cada API sobre la movilidad y viabilidad de los espermatozoides se determinó según el método descrito anteriormente. La figura 2 muestra los resultados de cada API de CS, ZL y LA para la prueba de movilidad de los espermatozoides, todos los cuales inhiben la movilidad de los espermatozoides a concentraciones de mM. La tabla 6 muestra los valores de CE calculados para cada API de CS, ZL y LA.

[0177] Tabla 6: Valores de CE₅₀ y CE₉₀ para los API

Compuesto	CE ₅₀ (mM)	CE ₉₀ (mM)
CS	12	19
ZL	45	94
LA	21	29

[0178] Después de determinarse las curvas dosis-respuesta y los valores de CE₅₀ de API individual, se investigó la sinergia de las combinaciones de dos API y tres API usando ensayos de tipo tablero de ajedrez en los que se sometieron a prueba todas las permutaciones de 3-4 concentraciones de cada API. La sinergia se calculó usando el principio del efecto mediano de Chou-Talalay y el software Compusyn que cuantifica la sinergia como un índice de combinación (CI) para cada combinación. Un CI < 1 significa sinergia, un CI > 1 significa antagonismo y un CI = 1 significa un efecto puramente aditivo.

[0179] Se realizaron experimentos de prueba de penetración de los espermatozoides en el moco cervical (SMPT) (Ivic *et al.*, Critical evaluation of methylcellulose as an alternative medium in sperm migration tests. Human Reproduction, volumen 17, número 1, enero de 2002, páginas 143- 149) colocando disoluciones de semen + API en un tubo capilar lleno de metilcelulosa al 1% (el sustituto validado, metilcelulosa, usado actualmente en los laboratorios de diagnóstico) y midiendo la migración de los espermatozoides después de 30 minutos. La prueba de SMPT usando eyaculados humanos recién obtenidos (espermatozoides) después del tratamiento con el API de prueba o el tratamiento sólo con vehículo (control) se usa para determinar el grado en que los espermatozoides tratados migran a través del moco cervical o algún medio sustituto (tal como metilcelulosa que permite un alto grado de precisión y exactitud, así como reproducibilidad porque la concentración y las características no varían, a diferencia del moco cervical de diferentes mujeres o diferentes momentos del ciclo) llenado en los tubos capilares de vidrio en comparación con los espermatozoides sin tratar.

[0180] La figura 3 muestra los resultados de los resultados de SMPT para el API único y la combinación CS-ZL-LA. Los datos calculados de la reducción de la movilidad de los espermatozoides y la inhibición de la penetración de los espermatozoides en el moco cervical se mostraron en la tabla 7. Las concentraciones más bajas de API fueron capaces de inhibir la penetración de los espermatozoides a través del moco cervical (metilcelulosa) en comparación con las concentraciones requeridas para inhibir la movilidad de los espermatozoides.

[0181] Tabla 7: Movilidad de los espermatozoides y penetración de los espermatozoides en el moco cervical

	Reducción de la movilidad de los espermatozoides		Inhibición de la penetración de los espermatozoides en el moco cervical
API	CE90 [IC del 95 %***] - mM (concentración para inhibir la movilidad de los espermatozoides total)	*MIC - mM (concentración para inhibir la movilidad de los espermatozoides progresiva)	**EC90 [IC del 95 %***] - mM (Migración de espermatozoides de vanguardia en metilcelulosa con adiciones conocidas de API)
CS	19 [de 17 a 20]	10	5 [de 3 a 8]
ZL	94 [de 81 a 110]	30	13 [de 9 a 18]
LA	29 [de 27 a 30]	20	5 [de 3 a 7]

CS + ZL + LA *	4 + 22 + 21	3 + 22 + 10	0.15 + 5 + 1,5
-----------------------	--------------------	--------------------	-----------------------

*La concentración inhibitoria mínima (CIM) se define como la concentración necesaria para inhibir la movilidad de los espermatozoides progresiva.

**En el caso de las combinaciones de tres API, la CE90 no pudo calcularse empíricamente y, en su lugar, se seleccionó la combinación sometida a prueba más pequeña que logró una inhibición del 90 %.

***IC: intervalo de confianza

[0182] Todas las combinaciones de CS/ZL/LA sometidas a prueba mostraron cierto grado de sinergia en la reducción de la movilidad de los espermatozoides y la inhibición de la penetración de los espermatozoides en el moco cervical. Véase la figura 4, que muestra la sinergia trazada frente a la eficacia (expresada como la fracción afectada; Fa), donde Cu se refiere a CS y Zn se refiere a ZL; la figura 5, que muestra la inhibición de la movilidad para la combinación CS-ZL-LA, donde cada barra representa una combinación CS-ZL-LA, mostrando barras sólidas movilidad progresiva, y mostrando barras sombreadas la ausencia de movilidad progresiva basadas en un promedio de cuatro repeticiones experimentales; y la tabla 8, que muestra la reducción de movilidad calculada y los valores de CI, donde los valores de CI <1 muestran sinergia, y cuanto menor es el CI, mayor es la magnitud de la sinergia.

[0183] Tabla 8: Combinaciones de 3 API que provocaron >90 % de reducción de la movilidad usando CS-ZL-LA:

[CS] (mM)	[LA] (mM)	[ZL] (mM)	Reducción de la movilidad (%)	CI
4	14	22	93	0,51
4	21	15	90	0,60
4	21	22	99	0,24
6	10	22	100	0,23
6	14	15	98	0,28
6	14	22	100	0,24
6	21	11	98	0,30
6	21	15	100	0,24
6	6	22	100	0,27

[0184] Tal como se muestra en la figura 4, CS+LA y ZL+LA tuvieron los niveles más altos de sinergia, con un CI promedio < 0,2. CS+LA y ZL+LA también mostraron curvas CI/Fa casi idénticas, lo que sugiere un mecanismo de acción similar. CS+ZL mostró poca sinergia, especialmente a bajas concentraciones. CS+ZL+LA mostró una sinergia significativa a niveles altos de Fa, pero ligeramente menos sinergia que CS+LA o ZL+LA a concentraciones más bajas.

[0185] Tal como se muestra en la tabla 8, hubo una correlación significativa entre el aumento de la dosis de LA y el aumento de la sinergia ($p < 0,0001$), mientras que ZL y CS no mostraron tal correlación. Las combinaciones CS-ZL-LA redujeron las concentraciones de API necesarias para una inhibición de la movilidad del 90 % en 1/5 para CS y ZL. La capacidad de inhibir la movilidad progresiva comenzó a concentraciones incluso más bajas para API individuales y combinaciones. A partir de la figura 3 y la tabla 7, los resultados de SMPT mostraron reducciones similares en las concentraciones de API necesarias en las combinaciones CS-ZL-LA y sugirieron que concentraciones incluso más bajas pueden ser suficientes para la eficacia anticonceptiva de lo que se requiere para inhibir la movilidad.

[0186] Estudios de capacitación de los espermatozoides para CS-ZL-LA

[0187] API: CS-CuSO₄, ZL-lactato de zinc, LA-ácido láctico

[0188] La capacitación, el procedimiento de maduración de los espermatozoides en el aparato reproductor femenino, es fundamental para la exocitosis acrosomal y la fecundación. Por tanto, la capacitación es un candidato convincente para el desarrollo de anticonceptivos.

[0189] *Procesamiento de los espermatozoides y tratamiento con API*

[0190] Se obtuvieron muestras de semen recién obtenido mediante masturbación de hombres sanos de 21-40 años que dieron su consentimiento. Las muestras se dejaron licuar a 37 °C durante al menos 30 minutos. A continuación, se combinaron 200 µl de semen con o bien 50 µl de API (combinación CS-ZL-LA: CS 3,2 mM, ZL 9,6 mM, LA 16,8 mM), o bien 50 µl de líquido vaginal simulado (SVF) (control del vehículo) (Owen *et al.*, A Vaginal Fluid Simulant. *Contraception* **1999**, 59, 91–95, doi:10.1016/S0010-7824(99)00010-4), y se mezclaron mediante trituración suave con una pipeta de orificio grande. También se mantuvo un grupo de control negativo sin tratar. Las muestras se incubaron durante 5 minutos a 37 °C.

[0191] Para retirar el plasma seminal y el API, en primer lugar, se centrifugaron los espermatozoides a través de un medio de aislamiento celular S-Plus potenciado (Vitrolife) a 300 g durante 10 minutos, y se retiró el sobrenadante dejando un sedimento suelto de espermatozoides. Los sedimentos de espermatozoides se resuspendieron por trituración suave en los 100 µl restantes de medio, se transfirieron entonces a un tubo nuevo, se resuspendieron con 4 ml de líquido tubárico humano modificado (mHTF, Fujifilm) y se centrifugaron a 600 g durante 10 minutos. El sedimento resultante se resuspendió en 150 µl de mHTF y se calculó la concentración de espermatozoides usando un hemocitómetro. Dependiendo del experimento, los espermatozoides se incubaron

posteriormente a una concentración de 10 millones/ml durante 3 horas en condiciones capacitantes (2-hidroxipropil- β -ciclodextrina, 2-OHCD 5 mM) o no capacitantes (sin ciclodextrina). Se ha demostrado previamente que estas condiciones de capacitación eran eficaces en espermatozoides humanos (Cardona *et al.*, Localization Patterns of the Ganglioside GM1 in Human Sperm Are Indicative of Male Fertility and Independent of Traditional Semen Measures. *Mol Reprod Dev* **2017**, 84, 423–435, doi:10.1002/mrd.22803).

[0192] *Evaluación de la movilidad*

[0193] La movilidad de los espermatozoides se evaluó en el eyaculado en bruto, después de 5 minutos de incubación con cada uno de los tratamientos (API, SVF, y control sin tratar), después de la etapa de lavado y después de 3 horas de incubación en condiciones capacitantes. Para evaluar la movilidad, se examinaron 15 μ l de espermatozoides a 40x en un portaobjetos calentado a 37 °C. Se evaluó visualmente y se documentó el número de espermatozoides progresivamente móviles.

[0194] *Evaluación de la fluidez de la membrana espermática*

[0195] La evaluación de los cambios en la fluidez de la membrana se realizó usando una forma modificada de la prueba Cap-Score (Androvia Lifesciences, Mountainside, NJ). Para someter a prueba la fertilidad de un hombre, la prueba Cap-Score implicaba la incubación de espermatozoides con 2-OHCD, un mediador del eflujo de esteroides y estímulo de la capacitación, y luego se establecía un porcentaje de espermatozoides que respondían a esas condiciones cuantificando los espermatozoides que tenían diferentes patrones de localización del gangliósido de membrana G_{M1} (Moody *et al.*, Validation of a Laboratory-Developed Test of Human Sperm Capacitation. *Mol Reprod Dev* **2017**, 84, 408–422, doi:10.1002/mrd.22801). La prueba usó toxina colérica B (CTB), y condiciones de fijación propias para inducir el reordenamiento del G_{M1} en esos patrones. En membranas más rígidas que no han experimentado eflujo de esteroides, CTB:488 se une a G_{M1} y desencadena el reordenamiento de G_{M1} con respecto a la membrana plasmática posacrosomal y el segmento ecuatorial inferior de la cabeza del espermatozoide. En membranas más fluidas, lo que significa una respuesta al 2-OHCD a través del eflujo de esteroides, CTB:488 marca G_{M1} sobre el acrosoma y no desencadena el reordenamiento de G_{M1} con respecto a la membrana plasmática posacrosomal o la región ecuatorial inferior; más bien, el G_{M1} permanece en toda la membrana plasmática sobre el acrosoma o incluso se concentra en el acrosoma apical.

[0196] Después de 3 horas de incubación en condiciones o bien capacitantes o bien no capacitantes, los espermatozoides se fijaron en mHTF durante toda la noche a temperatura ambiente. Inmediatamente antes de la obtención de imágenes, se añadió 1 µl de CTB:488 (Invitrogen) a los espermatozoides. Luego, se colocaron 5 µl de espermatozoides teñidos con CTB:488 en un portaobjetos y se obtuvieron imágenes con un microscopio fluorescente Nikon Eclipse TE2000-U. Para cada tratamiento experimental, se contó el número de espermatozoides que presentaban patrones de tinción de CTB:488 coherentes con membranas fluidas o rígidas. Luego se calculó el porcentaje de espermatozoides con patrones de tinción de CTB:488 indicativos de una alta fluidez de la membrana.

[0197] *Tinción de Coomassie para la exocitosis acrosomal*

[0198] La tinción de Coomassie es un método comúnmente usado para evaluar el estado acrosomal en espermatozoides fijados. Después de 3 horas de incubación en condiciones capacitantes, los espermatozoides se fijaron durante 10 minutos en paraformaldehído al 2 %. Luego se centrifugaron los espermatozoides a 500 g durante 10 minutos. Se retiró el sobrenadante y se resuspendieron los espermatozoides en 500 µl de acetato de amonio 100 mM (pH 9,0) y se centrifugaron de nuevo a 500 g durante 10 minutos. Se retiró el sobrenadante y el sedimento de espermatozoides se resuspendió en otros 500 µl de acetato de amonio 100 mM (pH 9,0). Para montar los espermatozoides en portaobjetos, se trazó una región circular en un portaobjetos de vidrio limpio usando un bolígrafo PAP. Se añadieron 40 µl de espermatozoides en la zona demarcada y se dejaron secar al aire en un calentador de portaobjetos a 37 °C. Para teñir los espermatozoides, se añadieron 150 µl de disolución de trabajo Coomassie (0,22% de Coomassie R-250, 50 % de metanol, 10 % de ácido acético) a los espermatozoides secos durante 6 minutos. Se retiró el exceso de tinción y se lavaron los portaobjetos sumergiéndolos en ddH₂O. Los portaobjetos lavados se secaron al aire en un calentador de portaobjetos. Inmediatamente antes de la puntuación, se colocaron en el portaobjetos una gota de medio de montaje acuoso y un cubreobjetos. El número de espermatozoides con acrosomas intactos o reaccionados se contó a 40x usando un microscopio óptico Nikon Eclipse E200.

[0199] *Tinción de vivos/muertos*

[0200] La viabilidad de los espermatozoides se evaluó mediante tinción con Sybr-14/yoduro de propidio (kit de viabilidad de espermatozoides VIVOS/MUERTOS, Invitrogen). En este ensayo, SYBR-14 marcó los espermatozoides vivos con fluorescencia verde, mientras que el

yoduro de propidio marcó los espermatozoides con membrana comprometida con fluorescencia roja. En primer lugar, la disolución madre de SYBR-14 se diluyó 50 veces en mHTF. Luego, se añadieron 1,6 µl de SYBR-14 diluido a los espermatozoides y se incubaron durante 10 minutos a 37 °C. Posteriormente, los espermatozoides se trataron con 1,6 µl de yoduro de propidio y se incubaron durante 10 minutos adicionales a 37 °C. Luego se colocaron los espermatozoides en una placa de fondo de cristal (Mattek) frotada con poli-D-lisina para inmovilizar los espermatozoides. Se obtuvieron imágenes con un microscopio confocal Olympus IX3-FP con platina calentada. Se evaluó en ImageJ el número de espermatozoides que mostraban patrones de tinción vivos o muertos/dañados, y se calculó el porcentaje de espermatozoides con un patrón de tinción muerto/dañado para cada grupo.

[0201] Para entender cómo cambiaba la movilidad a lo largo del experimento, se evaluó el porcentaje de espermatozoides que mostraban movilidad progresiva en diversas etapas: en eyaculado en bruto, después de una incubación de 5 minutos con API (combinación CS-ZL-LA: CS 3,2 mM, ZL 9,6 mM, LA 16,8 mM en SVF) o SVF, después del lavado, y después de 3 horas de incubación en condiciones capacitantes. La figura 6 muestra el porcentaje de espermatozoides móviles en diferentes etapas experimentales para cuatro experimentos. Los espermatozoides tratados con API presentaron una recuperación variable de la movilidad después del lavado. Sin embargo, incluso después de la recuperación inicial de la movilidad, los espermatozoides tratados con API mostraron un cese casi completo de la movilidad progresiva después de 3 horas de incubación en condiciones capacitantes. Esta reducción en la movilidad después de la capacitación fue el resultado de la exposición al API, ya que no se observó una disminución drástica similar en la movilidad en los controles de vehículo de SVF. Los espermatozoides tratados con API presentaron una pérdida casi completa de la movilidad después de 3 horas de incubación en condiciones capacitantes, tal como se demuestra en la figura 6. Estos datos mostraron que incluso la exposición a corto plazo al API tiene efectos a largo plazo en la movilidad de los espermatozoides.

[0202] La figura 7 muestra que la incubación a corto plazo con API (combinación CS-ZL-LA: CS 3,2 mM, ZL 9,6 mM, LA 16,8 mM en SVF) di como resultado un aumento de la exocitosis acrosomal espontánea después de 3 horas de incubación en condiciones capacitantes, en comparación con el control de vehículo de SVF y el control sin tratar.

[0203] La viabilidad de los espermatozoides se examinó usando la tinción SYBR-14/yoduro de propidio después de la etapa de lavado y después de 3 horas de incubación en condiciones capacitantes. La figura 8 mostró que los espermatozoides tratados con API tenían una viabilidad disminuida después de 3 horas de incubación en condiciones capacitantes, en comparación con aquellos con control de vehículo de SVF y control sin tratar. Después del lavado, no se observó ningún efecto del tratamiento con API sobre la viabilidad de los espermatozoides. Sin embargo, después de 3 horas de incubación en condiciones capacitantes, se observó un aumento en el porcentaje de espermatozoides muertos/dañados en el grupo tratado con API en comparación con los controles sin tratar y de vehículo (SVF). Esto demuestra que la exposición a corto plazo a los API tuvo efectos a largo plazo sobre la viabilidad de los espermatozoides.

[0204] La toxina colérica B (CTB) puede unirse hasta a cinco moléculas del gangliósido de membrana G_{M1} . En los espermatozoides que no han experimentado eflujo de esteroides y, por tanto, tienen membranas plasmáticas más rígidas, la unión de CTB a G_{M1} provoca el reordenamiento de G_{M1} con respecto a la membrana plasmática posacrosomal y el segmento ecuatorial inferior. En espermatozoides capacitados que han experimentado un eflujo de esteroides, CTB marca G_{M1} sobre el acrosoma y no provoca el reordenamiento de G_{M1} . Después de 5 minutos de incubación con API y 3 horas de incubación en condiciones capacitantes, un porcentaje muy alto de espermatozoides presentaron patrones de tinción de CTB:488 asociados a un aumento de la fluidez de la membrana. Estos porcentajes fueron muy superiores a los publicados para un grupo de 76 hombres con fertilidad reciente demostrada (media = $35,3 \pm 7,7$ %). De hecho, este porcentaje promedio era superior a cualquiera registrado en >7000 muestras de pacientes en Androvia (Travis, com. pers.). Los grupos de control de vehículo (SVF) y sin tratar mostraron porcentajes coherentes con lo que cabría esperar de una población de hombres fértiles. Estos resultados también mostraron que la exposición a corto plazo a los API tuvo efectos a largo plazo en la fisiología del espermatozoide más allá de la movilidad.

[0205] Este aumento en la fluidez de la membrana no fue el resultado de un eflujo de esteroides mediado por 2-OHCD o de una capacitación fisiológicamente relevante, ya que los espermatozoides tratados con API incubados en condiciones de no capacitación también mostraron un porcentaje extremadamente alto de espermatozoides que presentaban una alta fluidez de la membrana. Por tanto, los espermatozoides tratados con API no estaban capacitados fisiológicamente (nunca habían experimentado eflujo de esteroides, que es estrictamente necesario

para la exocitosis del acrosoma y la fecundación), pero en su lugar presentaban un aumento de la fluidez de la membrana como resultado de un procedimiento patológico inducido por API. La figura 9 muestra que el aumento de la fluidez de la membrana fue independiente del eflujo de esteroides inducido por 2-OHCD. Puede esperarse que un aumento patológico de la fluidez de la membrana conduzca a un aumento de la exocitosis acrosomal espontánea, lo que también contribuiría a una reducción de la movilidad a nivel poblacional. La tinción de Coomassie reveló un aumento del porcentaje de espermatozoides que habían experimentado exocitosis en el grupo tratado con API. Tal como se observó con los cambios en la fluidez de la membrana, este aumento de la exocitosis reflejaba un procedimiento no fisiológico, dado que estos espermatozoides no estaban expuestos a ningún desencadenante relevante de la exocitosis.

[0206] La presente divulgación descubrió nuevos mecanismos de acción del IVR de CS-ZL-LA. La exposición a corto plazo al API del IVR de CS-ZL-LA (CS 3,2 mM, ZL 9,6 mM, y LA 16,8 mM) tuvo múltiples efectos a largo plazo sobre la capacidad fecundante de los espermatozoides, incluyendo disminución de la movilidad, disminución de la viabilidad, aumento de la fluidez de la membrana, y aumento de la exocitosis espontánea del acrosoma. Estos efectos son probablemente el resultado de una desregulación de la fluidez de la membrana que conduce a un aumento de la exocitosis del acrosoma y a la muerte celular.

[0207] Estudios de actividades antivirales/antibacterianas

[0208] Los experimentos que analizan las interacciones de los API en ensayos antiinfecciosos se realizaron usando razones fijas de API.

[0209] Ensayo *in vitro* de actividad anti-VIH

[0210] API: CS-CuSO₄, ZA-acetato de zinc, LA-DL-ácido láctico, solos o en combinación (CZL que se denomina en este caso CS-ZA-LA).

[0211] Se realizó el ensayo MAGI para someter a prueba la actividad anti-VIH-1_{BaL}. Se prepararon diferentes concentraciones de cada API (CS, ZA, y DL-LA (LA)), solo o en combinación, en solución salina (NaCl al 0,9 %) y se incubaron con VIH-1_{BaL} durante 30 minutos a 37 °C, el 5 % de CO₂ y el 98% de humedad. Los controles de virus que contenían VIH-1_{BaL} en solución salina se incubaron en las mismas condiciones. Tras la incubación, la mezcla API - VIH-1_{BaL} se diluyó 10 veces y se añadió a las células TZMbl. Tras 72 horas de incubación, las células se lavaron, se tiñeron con X-gal y se fijaron. Los pocillos de control con sólo virus tenían

~200 células infectadas. Las células infectadas se contaron usando el instrumento CTL. Los API demostraron una potente actividad anti-VIH-1_{BaL} a concentraciones sub mM-mM bajas, siendo CSL (CS-ZA-LA) el más potente (figura 10, tabla 9).

[0212] Tabla 9: Concentraciones eficaces mitad de la máxima de los API.

API	CE50 (intervalo de confianza del 95 %) mM
CS	0,183 (de 0,1548 a 0,2171)
ZA	1,963 (de 1,628 a 2,735)
LA	2,498 (NA a 2,821)
CS-ZA-LA relación molar: 1:2:6	0,111 (de 0,0987 a 0,1253)

[0213] Se incubó VIH-1_{BaL} con los activos $\pm$ 2% de VF y 20 de % SF. Luego las mezclas se diluyeron en serie, se aplicaron sobre células TZM-bl y se determinó el título viral basándose en FFU. El gráfico representó 3 experimentos (MEDIA $\pm$ EEM) (figura 11).

[0214] Los tres activos (solos y combinaciones) inhibieron significativamente la infección en ausencia de los líquidos. La actividad de los activos individuales disminuyó en presencia de los líquidos. Sin embargo, las combinaciones siguieron siendo activas, siendo la combinación triple la que demostró la actividad más potente.

[0215] Actividad anti-VHS *in vitro*

[0216] Actividad virucida de los API frente al ensayo con VHS-2.

[0217] API: CS-CuSO₄, ZA-acetato de zinc, LA-ácido láctico, solos o en combinación (CZL que se denomina en este caso CS-ZA-LA).

[0218] Se realizó el ensayo de reducción de placa de VHS-2 para someter a prueba la actividad anti-VHS-2 de ZA, CS y LA. Se prepararon diferentes concentraciones de cada API, solo o en combinación, en solución salina (NaCl al 0,9 %) y se preincubaron con 10³ partículas infecciosas de VHS-2 G durante 30 minutos a 37 °C, el 5 % de CO₂ y el 98% de humedad. Los controles de virus que contenían VHS-2 en solución salina se incubaron en las mismas condiciones. Después de la incubación, todas las diluciones y controles se diluyeron 1/10 en DMEM y se valoraron mediante el ensayo de placa. La figura 12 y la tabla 10 muestran los resultados. La figura 12 muestra el porcentaje de unidades formadoras de placas (UFP) $\pm$ EE en cada concentración de API frente al control de virus. Tal como se muestra en la figura 12, ZA, CS

y LA, solos y en combinación, mostraron una inhibición de VHS-2 dependiente de la dosis en el ensayo de reducción de placa. Los datos representan la media de dos experimentos independientes. En la tabla 10, la razón molar de CS:LA:ZA en ZS-CA-LA es de 1:20:100. Todos los API solos y en combinación tuvieron una potente actividad virucida contra el VHS-2, siendo CS-ZA-LA el API más potente.

[0219] Tabla 10: Concentraciones eficaces mitad de la máxima de los API.

API	CE ₅₀ (intervalo de confianza del 95 %) mM
ZA	0,78 (de 0,30 a 1,92)
CS	0,009 (de 0,006 a 0,016)
LA	0,16 (de 0,10 a 0,26)
CS-ZA-LA razón molar: 1:20:100	0,002 (de 0,001 a 0,006)

[0220] Se incubó VHS-2 G con CS 1,25 mM, ZA 12,5 mM, LA 16,6 mM $\pm$ el 2% de VF y el 20 % SF durante 30 minutos a 37 °C, el 5 % de CO₂ y el 98 % de humedad. Luego las mezclas se diluyeron en serie 1/10, se aplicaron sobre células Vero y se determinó el título viral (UFP/ml). Las condiciones de control incluyeron células Vero expuestas a VHS-2 G en ausencia de los activos. La figura 13 representa tres experimentos (logaritmo de las unidades formadoras de placas por mililitro (UFP/ml); MEDIA $\pm$ EEM).

[0221] Ensayo *in vitro* de la actividad antivaginal y antigonorrrea

[0222] API: CS-CuSO₄, ZA-acetato de zinc, ZL-lactato de zinc, LA-ácido láctico, solos o en combinación (CZL que se denomina CS-ZL-LA)

[0223] Se determinaron las concentraciones mínimas bactericidas (CMB) contra *G. vaginalis* y *N. gonorrhoeae*. Las bacterias se resuspendieron hasta formar $\sim 3 \times 10^8$ unidades formadoras de colonias (UFC)/ml (1 McFarland). Se prepararon diluciones en serie de API (concentraciones 2x) en caldo. Se expusieron $\sim 5 \times 10^5$ UFC/ml a los API durante 30 minutos a 37°C, el 5 % de CO₂ (tubo bien tapado) y luego se sembraron sin diluir por duplicado o triplicado en placas de agar. Las placas se cultivaron en aerobiosis (*N. gonorrhoeae*) o anaerobiosis (*G. vaginalis*). Las bacterias diluidas sin tratar se sembraron en placas para confirmar el inóculo inicial. Las concentraciones de API en las muestras que produjeron una disminución >3 log (99,9 %) en las unidades formadoras de colonias (UFC) se consideraron bactericidas (<500 UFC/ml; <12 colonias en la placa).

[0224] Para *N. gonorrhoeae*, la CMB de CS fue de 10 mM, la CMB de ZA fue de 100 mM, y para LA la CMB fue de 111 mM. Para *G. vaginalis*, la CMB de CS fue de 5 mM, la CMB de ZA fue >100 mM, y para LA la CMB fue de 111 mM. No se observaron cambios en las CMB tras las pruebas en presencia de suero AB humano.

[0225] Para determinar las interacciones API, se empleó el ensayo de tipo tablero de ajedrez tridimensional usando el método de microdilución en caldo. Se prepararon disoluciones madre de API 4x en caldo y se añadieron a placas de 96 pocillos que contenían 10^5 UFC/pocillo. *N. gonorrhoeae* se cultivó aeróbicamente durante 24 horas y *G. vaginalis* se cultivó anaeróbicamente en un frasco anaeróbico durante 48 horas. Al final de la incubación, las bacterias se mezclaron suavemente y se fijaron con PFA. Se adquirió la densidad óptica (DO) a 650 nm. La DO de los pocillos de control que contenían sólo caldo y caldo con API se restó de las DO de los pocillos que contenían bacterias y API. Se calculó el índice de combinación inhibitoria fraccional (FICI). $FICI = \frac{CIM \text{ del fármaco A en combinación}}{CIM \text{ del fármaco A solo} + CIM \text{ del fármaco B en combinación}} / \frac{CIM \text{ del fármaco B solo} + CIM \text{ del fármaco C en combinación}}{CIM \text{ del fármaco C solo}}$. $FICI \leq 0,5$ - sinergia, $0,5 < FICI < 4$ - sin interacción, ≥ 4 - antagonismo. No se observó interacción/se observó sinergia débil para ambos patógenos.

[0226] Se incubaron 5×10^5 UFC/ml de *N. gonorrhea* con CS 2,5 mM, ZA 25 mM, ZL 50 mM y LA 27,75 mM en combinaciones simples, dobles y triples de estos activos ± 30 % de suero AB durante 30 minutos a 37 °C, el 5 % de CO₂ y el 98% de humedad. Las concentraciones seleccionadas fueron 3-4 veces inferiores a la CMB determinada para cada API individual. Las bacterias sin tratar y las expuestas a polimixina B (64 ug/ml) fueron controles positivos y negativos, respectivamente. Después de la incubación, las bacterias se sembraron por duplicado en placas de agar GC complementadas con Isovitalax (25 µl/placa). El control sin tratar se diluyó 1:100 antes de la siembra. Después de 24 horas de incubación a 37 °C con el 5 % de CO₂, se contaron las colonias usando el programa Image J. Las diluciones que produjeron una reducción de más de 3 log (99,9 %) en la viabilidad de las bacterias se consideraron bactericidas. Las cifras representan cuatro experimentos (log de recuento de UFC; MEDIA $\pm$ DE).

[0227] La figura 14 y la tabla 11 mostraron los resultados para *N. gonorrhoeae*. Tal como se muestra en la figura 14, las combinaciones CS/ZA, CS/LA, y CS-ZA-LA a concentraciones subbactericidas dieron como resultado un efecto bactericida. CS 10 mM y DL-LA 111 mM fueron CMB contra *N. gonorrhoeae* $\pm$ suero humano; sin embargo, ZL no fue inhibitorio. Las

combinaciones de activos duales y triples con CMB inferiores a CMB produjeron actividad bactericida. La tabla 11 muestra las CMB de los activos individuales $\pm 10\%$ y 30% de suero AB.

[0228] Tabla 11: CMB de los activos individuales $\pm 10\%$ y 30% de suero AB

CMB	Sin suero (mM)	10 % de suero AB (mM)	30 % de suero AB (mM)
CS	10	10	10
ZA	100	100	>100
ZL	>100	>100	>100
LA	111	111	111

[0229] Ensayo de actividad bactericida *in vitro* frente a *Chlamydia trachomatis* (*C. trachomatis*)

[0230] API: CS-CuSO₄, ZA-acetato de zinc, ZL-lactato de zinc, LA-DL-ácido láctico, solos o en combinación (CZL que se denomina en este caso CS-ZL-LA).

[0231] *C. trachomatis* se incubó con los activos $\pm 2\%$ de VF y 20% de SF durante 2 horas a temperatura ambiente. Las mezclas se diluyeron en serie 1/10 en disolución SPG y se aplicaron sobre células HeLa por triplicado. Las imágenes se adquirieron usando el instrumento Cytation-5 y el recuento de inclusión se analizó usando el software Gen5 del Cytation-5. Las condiciones de control incluyeron células HeLa desafiadas con *C. trachomatis* en ausencia de los activos. (Figura 15).

[0232] La triple combinación de concentraciones seleccionadas de CS (~ 1 -3 mM) y sales de zinc (~ 3 -13 mM) y DL-LA (~ 16 -80 mM) proporcionó la mayor actividad antiviral y anti-*C. trachomatis* en presencia de líquido vaginal (VF) y seminal (SF).

[0233] La concentración de LA fue superior a la de otros modelos, ya que no se observó actividad a concentraciones inferiores. La concentración sometida a prueba (80 mM) estaba dentro del intervalo fisiológico y la liberación objetivo. CS y LA inhibieron significativamente la infección en ausencia o presencia de los líquidos con excepción de ZL. Los líquidos no tuvieron ningún efecto significativo sobre la actividad.

[0234] Estudios de formulación en anillo

[0235] API: CSA-CuSO₄ (anhidro), ZLA-lactato de zinc (anhidro), L-DL-lactida, solos o en combinación (CZL que se denomina en este caso CSA-ZLA-L)

[0236] La presente divulgación proporciona el desarrollo de la formulación y el ensayo de una nueva tecnología IVR multipropósito no hormonal para la liberación sostenida de tres activos: sulfato de cobre anhidro (CSA), lactato de zinc (anhidro) (ZLA), y DL-lactida (L; se hidroliza a ácido láctico, LA) (también conocido como anillo “CZL”).

[0237] *Métodos para preparar los IVR LSR-4350 de tipo matriz*

[0238] Los anillos vaginales de silicona tipo matriz (Silbione® LSR-4350) (tabla 12) se fabricaron usando moldes de anillos a medida (diámetro exterior 57,6 mm, diámetro de la sección transversal 7,9 mm) instalados en una máquina de moldeo por inyección a escala de laboratorio calentada eléctricamente.

[0239] Tabla 12: Composiciones de las formulaciones de IVR LSR-4350

Formulación del anillo vaginal (todas las cargas en % p/p)	Silicona parte A y B y API requeridos por tamaño de lote
Anillo placebo - Anillo blanco	LSR-4350: 240 g. Tamaño total del lote: 240 g
30CSA	LSR-4350: 105 g, CSA: 90 g. Tamaño total del lote: 300 g
30L	LSR-4350: 105 g, L: 90 g. Tamaño total del lote: 300 g
10CSA-20L	LSR-4350: 105 g, CSA: 30 g, L: 60 g. Tamaño total del lote: 300 g
10CSA-10ZLA-10L	LSR-4350: 105 g, CSA: 30 g, L: 30 g, ZLA: 30 g. Tamaño total del lote: 300 g
10CSA-10ZLA-20L	LSR-4350: 90 g, CSA: 30 g, L: 60 g, ZLA: 30 g. Tamaño total del lote: 300 g

[0240] Todas las formulaciones de anillos se curaron a 115 °C durante 3 minutos.

[0241] Cada anillo se envasó en una bolsa de aluminio y se selló en el plazo de los 2 minutos posteriores al desmoldeo del anillo.

[0242] *Pruebas de liberación in vitro (IVRT)*

[0243] Se realizaron pruebas de liberación *in vitro* de (tres anillos por formulación) durante 30 días. Cada anillo se colocó en un recipiente de plástico de 100 ml etiquetado individualmente. Se añadieron 20 ml de agua ultrapura MilliQ a cada recipiente. Se taparon los recipientes y se

colocaron en una incubadora SciQuip Incu-Shake FL16-2 de agitación orbital (37 °C, 60 rpm, 25 mm de tiro orbital). Las muestras de IVR se analizaron para determinar lactida y ácido láctico mediante cromatografía de líquidos de alto rendimiento (HPLC) e iones de cobre y zinc mediante espectrómetro de emisión óptica con plasma acoplado inductivamente (ICP-OES). Después de 24 h $\pm$ 15 min, se retiran los recipientes de la incubadora y se agitan durante $\sim$ 10 segundos antes de recoger 1-2 ml del medio de liberación para el análisis por HPLC y $\sim$ 10 ml para el análisis por ICP-OES (o según sea necesario). Luego, el medio de liberación se sustituyó completamente por 20 ml de agua MilliQ recién obtenida (excepto los fines de semana, cuando se añadieron 60 ml para mantener las tasas de liberación), y los recipientes tapados se devolvieron a la incubadora.

[0244] Análisis por HPLC

[0245] Las muestras de IVR se analizaron para determinar DL-lactida y ácido láctico usando un sistema HPLC de Waters (Waters Limited, Irlanda). Brevemente, se inyectaron 50 μ l de cada muestra de liberación *in vitro* en una columna Thermo Scientific BDS Hypersil™ C18 (150 x 4,46 mm, tamaño de partícula de 3 μ m) mantenida a 35 °C y equipada con una columna de guarda. La elución isocrática se realizó a 1,3 ml/min usando una fase móvil de acetonitrilo al 4 % v/v y tampón fosfato de potasio al 96 % v/v (7,7 mM; pH 3,0) con un tiempo de ejecución de 5 min. Se detectaron ácido láctico y DL-lactida a una longitud de onda de 210 nm después de 1,8 min y 3,7 min, respectivamente.

[0246] Análisis por ICP-OES

[0247] Las muestras de liberación *in vitro* se analizaron para determinar iones de cobre y zinc usando un ICP-OES (PerkinElmer Avio® 220 Max ICP-OES, RU) equipado con un nebulizador MEINHARD® Type K1 de vidrio y una cámara de nebulización ciclónica con deflectores (convencional).

[0248] Resultados

[0249] Propiedades del anillo

[0250] La dimensión de cada IVR era de $\sim$ 57,4 x $\sim$ 7,3 mm, y el peso estaba dentro de 7,8-9,3 g. Las propiedades mecánicas eran similares a las de los productos de VR comercializados (fuerza de compresión de 20 mm, valores de dureza Shore M y porcentaje de alargamiento a la rotura oscilaban de 0,8-4,3 N, 41-67, 248 %-564 % respectivamente).

[0251] Liberación *in vitro* de lactida (LT) y ácido láctico (LA)

[0252] La figura 16 muestra la liberación diaria y acumulada de lactida (LT) y la figura 17 muestra la liberación diaria y acumulada de ácido láctico (LA) de los IVR en agua desionizada durante 30 días.

[0253] Todos los IVR cargados con lactida en agua desionizada liberaban LT y LT en forma de LA. Dado que la lactida se hidroliza fácilmente a ácido láctico (tanto *in vitro* como *in vivo*) y, por tanto, resulta más informativo evaluar y medir la liberación de ácido láctico.

[0254] Se observa una liberación explosiva de lactida durante los cinco primeros días, seguida de una liberación escasa o nula a partir de entonces. La liberación media de ráfagas de LT en 20 ml de agua desionizada a 37 °C fue superior a 122 mg. Los anillos 10CSA-10ZLA-20L liberaron 248,5 mg de LT y 48,4 mg de LA en el primer día, lo que es casi dos veces superior a la liberación de LT y LA de los anillos 10CSA-10ZLA-10L en ese día.

[0255] Hacia el final de la segunda semana, la liberación diaria de LA de los anillos 10CSA-10ZLA-20L IVR (86,4 mg/día) fue casi dos veces superior a la de LA liberada (48,9 mg/día) por los anillos 10CSA-10ZLA-10L, mientras que fue de 27,7 mg/día para los anillos 30L y de 34,3 mg/día para los anillos 10CSA-20L.

[0256] En la semana 4, la liberación media diaria de LA de los anillos 30L y 10CSA-20L oscilaba desde 22,5 hasta 23,5 mg/día, pero la liberación diaria de LA se redujo al intervalo de 11,0 mg/día para los anillos 10CSA-10ZLA-10L y 10CSA-10ZLA-20L. Esto demuestra que estas tres formulaciones de anillos cargados con activos liberaban LT y LA a una tasa relativamente mayor que otras formulaciones durante las dos primeras semanas del estudio de 30 días.

[0257] Se observó una liberación sostenida y continua de ácido láctico (12-105 mg/día) en los IVR de tres activos (10CSA-10ZLA-20L) durante 30 días.

[0258] Tabla 13: Resumen de los datos de liberación diaria de LT y LA (3 anillos por formulación, cada anillo 20 ml de en agua desionizada a 37 °C/60 RPM) durante 30 días. Cada valor representa la media $\pm$ desviación estándar (de)

Formulaciones de anillo LSR-4350	API	Día 1	Semana 1		Semana 2		Semana 3		Semana 4	
		Media (mg/día)	Media (mg/día)	DE	Media (mg/día)	DE	Media (mg/día)	DE	Media (mg/día)	DE
30L	LT	220,1	111,7	73,5	3,8	0,8	1,1	0,3	0,4	0,1
	LA	23,8	16,3	4,8	27,7	2,5	26,6	2,5	22,5	2,4
10CSA-20L	LT	198,4	81,2	77,5	0,1	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0

	LA	25,4	34,0	11,1	34,3	4,8	27,1	4,0	23,5	3,9
10CSA-10ZLA-10L	LT	122,8	54,0	43,6	3,0	1,5	0,3	0,1	0,0	0,0
	LA	22,1	21,6	2,7	48,9	3,2	23,6	3,7	10,9	1,4
10CSA-10ZLA-20L	LT	248,5	133,1	72,5	7,9	6,1	0,4	0,1	0,0	0,0
	LA	48,4	53,4	10,8	86,4	16,5	28,5	5,7	11,7	1,8

[0259] A lo largo del estudio de 30 días, el porcentaje total de liberación acumulada de LT fue superior (casi el 100 % de L liberado) a partir de las formulaciones de anillos lideradas por tres activos (independientemente de la carga de LT; 10 % o 20 % p/p) que el de los anillos 10CSA-20LT (62,9 %), que seguía siendo superior al de los anillos 30L (44,7 %).

[0260] Liberación *in vitro* de iones de zinc y cobre

[0261] La figura 19 muestra la liberación diaria y acumulada de ion de zinc de los IVR en agua desionizada durante 30 días.

[0262] Para la liberación de iones de zinc, no se observó una liberación de estallido característica controlada por permeación en el día 1 en las formulaciones 10CSA-10ZLA-10L (3,7 mg) y 10CSA-10ZLA-20L (12,5 mg). La formulación 10CSA-10ZLA-20L (el anillo cargado de activos al 40 % p/p) mostró una liberación de iones de zinc en el día 1 tres veces mayor que la 10CSA-10ZLA-10L (el anillo cargado de activos al 30 % p/p), que se vio reforzada por la presencia adicional de DL-lactida al 10 % p/p en el anillo. La liberación media de iones de zinc en la semana 1 (días 2-4) de la formulación 10CSA-10ZLA-20L (16,6 mg) fue superior a la de la formulación 10CSA-10ZLA-10L (2,3 mg). La siguiente liberación diaria de iones de zinc después de la semana 1 tanto de la formulación 10CSA-10ZLA-20L como de la formulación 10CSA-10ZLA-10L disminuyó con el tiempo. La enorme diferencia en la liberación acumulada de iones de zinc de las dos formulaciones se debe principalmente a la liberación de la primera semana (semana 1). En comparación, la mayor tasa de liberación apareció en la semana 1 para la formulación 10CSA-10ZLA-20L, y en la semana 2 para la formulación 10CSA-10ZLA-10L. Hubo un efecto de retraso en la liberación de la semana 1 de la formulación 10CSA-10ZLA-10L.

[0263] La figura 18 muestra la liberación diaria y acumulada de iones de cobre de los IVR en agua desionizada durante 30 días.

[0264] Para la liberación de iones de cobre, se observaron perfiles similares de liberación diaria y acumulada con ion de zinc en las formulaciones 10CSA-10ZLA-10L y 10CSA-10ZLA-20L. Tal como se muestra en la tabla 15, en general, la liberación diaria de iones de cobre fue siempre superior a la liberación de iones de zinc para cada formulación. El 56 % de iones de zinc y el 78 % de iones de cobre se liberaron del anillo 10CSA-10ZLA-10L; el 78 % de iones de zinc y el 99 % de iones de cobre se liberaron del anillo 10CSA-10ZLA-20L. La misma carga de fármaco de CSA y ZLA presenta teóricamente la misma y homogénea distribución en el anillo de elastómero de silicona. Es probable que la mayor liberación de iones de cobre se deba a una velocidad de disolución más rápida en el medio de liberación (agua desionizada), ya que las solubilidades en agua notificadas de CSA y ZLA son 201 y 48,2 g/l (20 °C) en agua, respectivamente.

[0265] Para las formulaciones 30CSA y 10CSA-20L, ambas son anillos cargados con el 30 % p/p de activos. Ambos mostraron una liberación de iones de cobre en el día 1 en la semana 1 - 14,7 y 8,5 mg, respectivamente. La tasa de liberación de iones de cobre de 30CSA disminuyó en la semana 2 y luego aumentó en las semanas 3 y 4; mientras que 10CSA-20L mostró una tasa de liberación de iones de cobre relativamente constante en la semana 2 y luego un aumento en las semanas 3 y 4. Para ambas formulaciones, la tasa de liberación más alta apareció en la semana 4. Parece que el tiempo de retardo de 30CSA y 10CSA-20L es mayor que el del anillo 10CSA-10ZLA-10L y después que el de 10CSA-10ZLA-20L en cuanto al orden de aparición de la tasa de liberación más alta en 30 días. En comparación con el anillo 10CSA-10ZLA-10L, sólo el 10 % y el 30 % de iones de cobre se liberan de los anillos 30CSA y 10CSA-20L, respectivamente.

[0266] Se observó una liberación sostenida y continua de iones de cobre y zinc (2-31 y 1-17 mg/día, respectivamente) en los IVR de triple actividad (10CSA-10ZLA-20L) durante 30 días.

[0267] Tabla 14: Liberación media de iones de cobre e iones de zinc el día 1, la semana 1 (día 2-4), la semana 2 (día 8-11), la semana 3 (día 15-18), la semana 4 (día 22-25), la liberación acumulada media durante 30 días y el porcentaje medio de liberación de las formulaciones de anillos vaginales en el estudio X01

Formulación de anillo	Día 1 (mg)	Semana 1 (mg/día)	Semana 2 (mg/día)	Semana 3 (mg/día)	Semana 4 (mg/día)	Liberación acumulada a los 30 días (mg)	% de liberación acumulada
Valores medios de liberación de iones de zinc							

10CSA-10ZLA-10L	3,7	2,3	7,7	4,4	2,4	126	56
10CSA-10ZLA-20L	12,5	16,6	8,7	2,8	1,4	182	78
Valores medios de liberación de iones de cobre							
30CSA	14,7	4,9	1,6	2,9	4,8	97	10
10CSA-20L	8,5	2,3	2,3	3,1	3,8	116	30
10CSA-10ZLA-10L	9,3	4,4	17,8	8,5	4,0	262	78
10CSA-10ZLA-20L	26,1	30,8	17,3	4,5	2,0	343	99

[0268] Perfil de pH de liberación *in vitro*

[0269] Como se anticipa que el pH bajo *in vivo* es un contribuyente importante a la inmovilización de los espermatozoides, se estudió el efecto del API en el pH del medio.

[0270] La figura 20 muestra el pH de una disolución de 1 mg/ml de diversas sales, incluyendo sulfato de cobre anhidro, sulfato de zinc monohidratado, lactato de zinc dihidratado, y acetato de zinc anhidro.

[0271] La figura 21 muestra el pH del medio de liberación durante el estudio de liberación *in vitro* de 30 días para cinco IVR (30CSA, 10CSA-10ZLA-10L, 10CSA-10ZLA-20L, 30L, y 10CSA-20L). El pH de todo el medio de liberación durante los 30 días para 10CSA-10ZLA-10L, 10CSA-10ZLA-20L, 30L, y 10CSA-20L se mantuvo por debajo de 4,6. Se cree que la reducción del pH para estos anillos es coherente con la liberación de lactida y su rápida hidrólisis para formar ácido láctico. Las sales de cobre y zinc modulan adicionalmente el pH del medio, según las características ácidas de Lewis bien establecidas de estos iones metálicos y el comportamiento ácido-base de los contraiones.

[0272] Durante 30 días de liberación en agua desionizada, el intervalo de pH osciló entre 2,1 y 3,3 para los IVR cargados con lactida, lo que es coherente con que la lactida puede hidrolizarse en presencia de agua en ácido láctico, mientras que el valor medio de pH para el IVR 30CSA fue de $4,5 \pm 0,1$ (tabla 15). Se observó que el pH vaginal saludable debería estar entre 3,8 y 4,5. El pH del agua desionizada debería estar entre 5,5 - 6,0.

[0273] Tabla 15: Resumen de los datos de pH durante los anillos LSR-4350 cargados con API (3 anillos por formulación, cada anillo 20 ml de en agua desionizada a 37 °C/60 RPM) durante 30 días. Cada valor representa la media $\pm$ desviación estándar (de)

Formulación de anillo	pH - Día 1	pH - Día 30	pH medio durante 30 días
-----------------------	------------	-------------	--------------------------

30CSA	4,3 (0,1)	4,4 (0,1)	4,5 (0,1)
30L	2,1 (0,1)	2,7 (0,1)	2,5 (0,2)
10CSA-20L	2,1 (0,1)	2,5 (0,1)	2,4 (0,1)
10CSA-10ZLA-10L	2,2 (0,1)	3,3 (0,1)	2,7 (0,3)
10CSA-10ZLA-20L	2,2 (0,1)	3,2 (0,1)	2,6 (0,3)

[0274] Ensayos de toxicidad

[0275] API: sulfato de cobre (CS); ácido DL-láctico (LA); acetato de zinc (ZA) o lactato de zinc (ZnLA o ZL); o en combinación

[0276] *Exposición única a los API*

[0277] Los explantes ectocervicales se expusieron a los API [sulfato de cobre (CS); ácido DL-láctico (LA); acetato de zinc (ZA) o lactato de zinc (ZnLA o ZL); o en combinación] durante 24 horas (h) frente al control (solución salina $\pm$ 5 % de VF) y la condición Gynol. Se muestra la viabilidad tisular (%) en relación con el control salino en ausencia (n=3-11 experimentos) o presencia (n=3 experimentos) del 5 % de VF (media $\pm$ EEM). Los valores de p representan comparaciones entre el tratamiento indicado y solución salina (* <0,05; *** <0,0005). Prueba de Kruskal-Wallis con comparación múltiple de Dunn) (figura 22). La tabla 16 muestra la cantidad de API usada en un único tratamiento.

[0278] Tabla 16: Toxicidad - Tratamiento único

API	Concentraciones no tóxicas en ectocérnix MTT e histología a las 24 h	Concentraciones no tóxicas en modelo VEC-100 * TEER y LDH a las 24 h	Concentraciones no bactericidas en lactobacilos CMB 30 min	Concentraciones antiespermáticas	
				Movilidad total (CE ₉₀)	Penetración de los espermatozoides en el moco cervical (CE ₉₀)
CS (mM)	22	10	10	4	0,15
ZL (mM)	100	100	100	22	5
LA (mM)	222	222	222	21	1,5

[0279] En la figura 23, los explantes ectocervicales se incubaron con las concentraciones seleccionadas de API durante 24 horas en presencia o ausencia del 5 % de VF. Los explantes se fijaron, se incrustaron en parafina, se seccionaron y se tiñeron con H&E.

[0280] *Concentraciones de citocinas inflamatorias tras la exposición única de explantes ectocervicales a los API*

[0281] Los explantes ectocervicales se expusieron a los API durante 24 h en presencia o ausencia del 5 % de VF. Se recogieron los sobrenadantes y se analizaron para determinar las citocinas proinflamatorias. Se muestra la media $\pm$ EEM (n=3-6 experimentos) de IL-1 α e IL-1 β (figura 24).

[0282] *Viabilidad y TEER en tejido VEC-100 tras una única exposición a los API*

[0283] Los tejidos VEC-100 se incubaron con los API durante 24 h. La viabilidad de los tejidos se analizó mediante los ensayos MTT y LDH y se registraron las mediciones de TEER. Se incluyeron como controles las condiciones sin tratar, Gynol y Triton. Se presentan los datos de 4 experimentos individuales (figura 25).

[0284] La tabla 17 muestra el resumen de los resultados para las concentraciones indicadas de los API después de una única exposición.

[0285] Tabla 17: Seguridad del único API en ectocérnix y VEC-100 tras una única exposición

Activos	Ectocérnix: única exposición (MTT, histología, CC) durante 24 h		VEC-100: única exposición (MTT, TEER y LDH) durante 24 h Sin VF
	Sin VF	5 % de VF	
Gynol	Tox.	Tox.	Tox.
CS 22,2 mM	Sin tox.	Sin tox.	Tox.
CS 9,87 mM	Sin tox.	Sin tox.	Sin tox.
CS 4,93 mM	Sin tox.	Sin tox.	Sin tox.
ZA 100 mM	Sin tox.	Sin tox.	Sin tox.
ZL 100 mM	Sin tox.	Sin tox.	Sin tox.
ZL 50 mM	Sin tox.	Sin tox.	Sin tox.
ZL 25 mM	Sin tox.	Sin tox.	Sin tox.
LA 222 mM	Sin tox.	Sin tox.	Sin tox.
LA 111 mM	Sin tox.	Sin tox.	Sin tox.

[0286] La exposición a CS (hasta 10mM), sales de zinc (hasta 100mM) y LA (hasta 222mM) solos no indujo toxicidad. No se observaron cambios histopatológicos, disminución de la viabilidad tisular (MTT, LDH), disminución de la TEER ni aumento de las concentraciones de citocinas después de 24 h de exposición a los únicos activos. Las combinaciones de activos de triples CS 10 mM, ZA 25 mM y LA 222 mM en solución salina da como resultado daño epitelial en los explantes ectocervicales. Sin embargo, no se detectó ningún daño en presencia del 5 % de VF.

[0287] *Exposición múltiple a los API*

[0288] Los tejidos VEC-100 se incubaron con concentraciones seleccionadas (que mostraron sinergia en los ensayos antiespermáticos: CS 4 mM, ZL 21 mM, LA: 22 mM) de los API (únicos y combinados) durante 1 hora diariamente durante 5 días, se aclararon en PBS y se incubaron de nuevo durante 23 horas. Se muestra un único experimento. La viabilidad del tejido y la TEER se analizaron en los días indicados (media± EEM de réplicas) tal como se muestra en la figura 26. La tabla 18 ilustra que las concentraciones indicadas son seguras y tienen actividad antiespermática.

[0289] Tabla 18: Toxicidad - Tratamientos múltiples

API (mM)	Concentraciones no tóxicas en el modelo VEC-100 * TEER y LDH 5 exposiciones diarias	Concentraciones no tóxicas basadas en el estudio de irritación vaginal en ratas 10 días de exposición	Concentraciones antiespermáticas	
			Movilidad total (CE ₉₀)	Penetración de los espermatozoides en el moco vaginal (CE ₉₀)
CS (mM)	4	22	4	0,15
ZL (mM)	21	50	22	5
LA (mM)	22	200	21	1,5

[0290] La tabla 19 muestra el resumen de los resultados para las concentraciones indicadas de los API después de la exposición múltiple.

[0291] Tabla 19: Seguridad de los API en ectocérnix y VEC-100 tras exposición repetida

Activos	VEC-100: única exposición (MTT, TEER y LDH) día 1-5 24 h Sin VF		
Gymol	Tox.	Tox.	Tox.

Triton	Tox.	Tox.	Tox.
CS 4 mM	Sin tox.	Sin tox.	Sin tox.
ZnLA 21 mM	Sin tox.	Sin tox.	Sin tox.
ZnLA 10 mM	Sin tox.	Sin tox.	Sin tox.
LA 22 mM	Sin tox.	Sin tox.	Sin tox.
CS 4 mM ZnLA 21 mM LA 22 mM	Sin tox.	Sin tox.	Sin tox.

[0292] Las actividades individuales y sus combinaciones (CS 4 mM, ZL 21 mM, LA 22 mM) no disminuyeron la viabilidad tisular (MTT, LDH) ni la TEER.