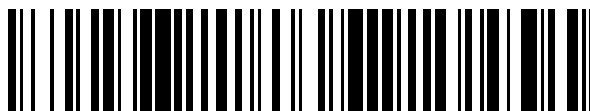


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 938 738**

51 Int. Cl.:

A61K 9/00	(2006.01) A61P 31/10	(2006.01)
A61K 9/51	(2006.01) A61P 33/02	(2006.01)
A61K 9/06	(2006.01) A61P 31/22	(2006.01)
A61K 47/36	(2006.01)	
A61K 31/4706	(2006.01)	
A61P 15/02	(2006.01)	
A61P 31/12	(2006.01)	
A61P 17/12	(2006.01)	
A61P 31/20	(2006.01)	
A61P 31/04	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.11.2019 PCT/CN2019/115216**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **11.06.2020 WO20114166**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.11.2019 E 19892996 (0)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.01.2023 EP 3760192**

54 Título: **Gel de cloroquina y procedimiento de preparación y aplicación del mismo**

30 Prioridad:

04.12.2018 CN 201811474701

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
14.04.2023

73 Titular/es:

**GUANGZHOU HYBRIBIO MEDICINE
TECHNOLOGY LTD. (50.0%)
4th Floor No. 2 Reagent Building No. 71
Fenghuang 3rd Road Sino-Singapore Guangzhou
Knowledge City Nine Dragon Town, Huangpu
District
Guangzhou, Guangdong 510700, CN y
GUANGZHOU HYBRIBIO BIOTECH LTD. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**XIE, LONGXU;
LI, XIANGLING;
YUAN, MANLI;
WANG, TING y
WANG, JIANYU**

74 Agente/Representante:

DEL VALLE VALIENTE, Sonia

ES 2 938 738 T3

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

DESCRIPCIÓN

Gel de cloroquina y procedimiento de preparación y aplicación del mismo

5 **Campo técnico**

La presente invención pertenece al campo de las tecnologías de medicina biológica y, más particularmente, se refiere a un gel de cloroquina para tratar la infección de la genitalia externa y otras verrugas cutáneas y un procedimiento de preparación y aplicación de los mismos.

10 **Antecedentes**

Las infecciones de los genitales, también denominadas enfermedades de transmisión sexual se refieren a un grupo de enfermedades transmitidas principalmente por contacto sexual. Más de 20 enfermedades infecciosas causadas por comportamientos sexuales o comportamientos similares a sexuales se incluyen en la categoría de infecciones genitales internacionalmente. Desde la década de 1980, la población flotante ha estado aumentando día por día. Con el cambio del concepto sexual, han aumentado los comportamientos sexuales inseguros. La infección del tracto reproductivo y la infección transmitida sexualmente están aumentando en China, y se han diseminado desde la costa hasta el interior y se desarrollan desde la ciudad hasta el campo, de modo que la situación es bastante grave. Según las estadísticas, hay aproximadamente 400.000 pacientes con SIDA en China actualmente, la infección por VIH es aproximadamente 1 en 1.000, y aproximadamente cientos de personas se infectan cada día, con características de una gran relación de transmisión sexual y la transmisión por un grupo de alto riesgo a un grupo general. Según las estadísticas, el número de pacientes que padecen infección de los genitales externos de ambos sexos en China aún aumenta año tras año en los últimos años, una tasa de incidencia en muchas áreas las clasifica en el segundo y el tercer lugar en un orden de enfermedades infecciosas, una tasa de incidencia de la infección del tracto genital inferior entre las mujeres casadas es tan alta como el 50 % y al menos el 70 % de las mujeres ha padecido candidiasis vulvovaginal una vez en su vida, del 5 % al 10 % de las cuales padecieron candidiasis vaginal recurrente y el 90 % de las cuales se infectaron con el papilomavirus humano. La tasa de incidencia de la infección de la genitalia externa en ambos sexos está aumentando tan rápidamente que la dificultad en el control se ha convertido en un grave problema de salud social y pública para el mundo. Por lo tanto, la prevención y el tratamiento eficaces de la infección de la genitalia externa de ambos sexos se han convertido en tareas muy graves y urgentes en la actualidad.

La infección de la genitalia externa se trata principalmente apuntando hacia un patógeno en la medicina moderna. En términos de prevención y tratamiento, hay muchos tipos de microorganismos patógenos que causan la infección del tracto reproductivo, y la variación y la resistencia al fármaco del patógeno hacen que sea extremadamente difícil seleccionar un medicamento antibiótico para prevenir la infección del tracto reproductivo. Actualmente, en la práctica clínica, el tratamiento de la infección de la genitalia externa se basa principalmente en la administración de antibiótico o desinfectante. Sin embargo, dado que la irritación por un desinfectante a una mucosa local destruye un entorno en una vagina, el uso del desinfectante es limitado y el desinfectante suele ser adecuado para el tratamiento local. Para la infección genital bacteriana, una terapia con antibióticos a menudo proporciona resistencia al fármaco y efectos secundarios. Por lo tanto, es importante desarrollar un medicamento nuevo y altamente eficaz para uso externo con efectos antibacterianos y antivirales para la prevención y el tratamiento eficaces de la infección de la genitalia externa.

La cloroquina siempre se ha usado como un medicamento para prevenir y tratar la infección por plasmodio, y a menudo se usa en experimentos de transfección génica para mejorar la eficiencia de la transfección. Se cree que la cloroquina en alta concentración tiene un efecto de inhibición y eliminación de criptococos in vitro través de estudios in vitro, y los efectos de la cloroquina sobre dos variedades de los criptococos no son diferentes; y mientras tanto, la cloroquina puede mejorar una capacidad anticriptocócica de la anfotericina B y tiene un efecto antibacteriano sinérgico con la anfotericina B. En la actualidad, muchos estudios se centran en una actividad anti-VIH de la cloroquina. Estudios han demostrado que la cloroquina tiene una actividad anti-VIH de amplio espectro, y la cloroquina no solo está dirigida a una cepa de laboratorio B evolucionada por VIH-1, sino que también tiene un gran efecto sobre los aislamientos primarios A, B, C, D y E evolucionados por VIH-1. Parece que un mecanismo principal de un efecto anti-VIH de la cloroquina es inhibir la glucosilación de una proteína de la envoltura del virus gp120, lo que da como resultado que una partícula de virus recién generada tenga una infecciosidad muy reducida. Mientras tanto, se cree en estudios que la cloroquina es un agente de penetración de membrana de aminoquinina, que puede incorporarse en un ADN de doble cadena y cambiar la forma de doble hélice de un ADN al desenrollarse. Se cree en estudios bacteriológicos que la cloroquina se puede usar como una clase de intercaldadores tales como naranja de acridina y bromuro de etidio, que pueden inhibir selectivamente un enlace covalente de un ADN plasmídico pequeño, y cambiar una densidad de superbobinas de ADN, el cierre de la superbobina puede ser cambiado, inhibiendo así la proliferación de bacterias y de células infectadas por virus. Un ADN de un virus del papiloma humano (VPH) que causa un cáncer cervical es dicho plásmido, que es un ADN complejo superenrollado y realiza la replicación del ADN y la transcripción del ARN. A su vez, se ha demostrado que la cloroquina es capaz de inhibir el ADN plasmídico e interferir con una actividad de la ADN polimerasa cambiando una densidad de superhélice del ADN plasmídico. Debido a la alcalescencia, se ha demostrado que la cloroquina causa disfunción mitocondrial, tal como acumulación de endosomas/lisosomas, cambio del valor del pH y posible apoptosis. Además, se ha demostrado que la cloroquina reactiva P53 inactivado (degradación del VPH/inactivación de P53), se conecta a la melanina (la producción de melanina ocurre en la misma capa de piel

como replicación del VPH: una capa basal de epidermis), y evita la liberación de iones de hierro (catalizador de hierro/dependencia de energía de VPH durante la replicación). El hierro es necesario para la replicación del ADN, y el hierro también actúa como un catalizador electrónico en el transporte y almacenamiento de oxígeno. Sin embargo, el hierro también es una sustancia vital para la supervivencia del patógeno y la replicación del virus. La inhibición de las partículas de hierro también es un mecanismo importante para que la cloroquina elimine los virus y las células infectadas por virus. ANBARASAN B Y COL ("*Optimization of the formulation and in-vitro evaluation of chloroquine loaded Chitosan nanoparticles using ionic gelation method*", JOURNAL OF CHEMICAL AND PHARMACEUTICAL SCIENCES, vol. 6, núm. 2, 1 de abril de 2013, páginas 106-112) describe nanopartículas de fosfato de cloroquina basadas en quitosano con una relación fármaco-a-polímero de 1:3 a 1:5.

En la actualidad, no hay ningún medicamento de cloroquina para uso externo, especialmente un medicamento que no tenga preparación externa con menos irritación y efecto curativo más amplio. En la aplicación clínica, la cloroquina se usa principalmente para tratar ataques de malaria aguda y para controlar un síntoma de malaria. La cloroquina también se puede usar para tratar amebiasis hepática, clonorchiasis sinensis, paragonimiasis, enfermedad de tejido conectivo, etc. La cloroquina también se puede usar para tratar enfermedades fotosensibles tales como la enfermedad del eritema solar. Para tratar la malaria se usan un comprimido y una inyección con una dosis grande y un largo periodo de tratamiento, que puede tener efectos secundarios graves sobre el tracto gastrointestinal y la piel. Además, la cloroquina provoca cierta irritación en la piel, causando daños en la piel y diversos tipos de erupciones. Por lo tanto, cómo reducir la irritación por la cloroquina y los efectos secundarios, y mejorar un valor de aplicación de la cloroquina cambiando una forma de dosificación se ha convertido en el problema principal en la actualidad.

Una microesfera de medicamento se refiere a una pequeña entidad esférica formada por dispersión o adsorción de medicamento en una matriz de polímero de alto peso molecular. Una preparación de microesferas tiene un efecto de acción prolongada, de liberación sostenida o dirigida, que puede mejorar en gran medida la comodidad y la conformidad de los pacientes en la medicación, con ventajas sobresalientes en la clínica, de modo que la preparación es una forma de dosificación potencial. Además, un producto con preparación de microesferas tiene un gran valor añadido y una amplia perspectiva de mercado, y se ha convertido en un punto candente en la investigación y el desarrollo de la medicina en los últimos años.

Resumen

Un objetivo de la presente invención es superar los defectos en la técnica anterior antes mencionados, y proporcionar un producto de gel de nanoesferas de cloroquina, que selecciona un compuesto de polímero natural como un portador de nanoesferas, tiene un procedimiento de preparación simple y un pequeño efecto secundario de un producto, desarrolla plenamente el efecto sinérgico de la cloroquina y del portador de nanoesferas, tiene efectos antiinflamatorios, antibacterianos y antivirales obvios, reduce la irritación de la cloroquina a la piel, promueve la cicatrización de heridas, puede controlar la velocidad de liberación de un medicamento, y supera los defectos de un efecto antibacteriano débil del portador de microesferas existente y la gran irritación de la cloroquina.

Otro objetivo de la presente invención es proporcionar un procedimiento de preparación para el producto de gel de nanoesferas de cloroquina aplicado a los genitales externos y otras verrugas cutáneas.

Otro objetivo de la presente invención es proporcionar una nueva aplicación para el producto de gel de nanoesferas de cloroquina anterior.

Otro objetivo más de la presente invención es proporcionar un producto para prevenir y tratar la infección de la genitalia externa y/u otras verrugas cutáneas.

Los objetivos de la presente invención antes mencionados se logran a través de las siguientes soluciones técnicas.

Una nanoesfera de cloroquina incluye un portador de nanoesferas soluble en agua, y cloroquina o un derivado de cloroquina, por lo que la relación másica de la cloroquina o del derivado de cloroquina al portador de nanoesferas soluble en agua durante la preparación varía de 1:3 a 1:5; una tasa de carga de la cloroquina o del derivado de cloroquina en la nanoesfera de cloroquina preparada varía de 3,0 % a 21,6 %; el portador de nanoesferas soluble en agua es quitosano soluble en agua; el grado de desacetilación del quitosano soluble en agua varía del 80 % al 95 %, y el peso molecular promedio en viscosidad del mismo varía de 3000 a 5000; y el derivado de cloroquina se selecciona de uno o más de hidroxiclороquina, fosfato de cloroquina o sulfato de cloroquina; y por lo que la nanoesfera de cloroquina se prepara en gel para uso.

El inventor descubre inesperadamente que la nanoesfera que se prepara combinando el portador de nanoesferas soluble en agua con la cloroquina o el derivado de cloroquina, tiene un tiempo de acción largo, una adhesividad de la mucosa, una retención local y una autodegradabilidad, reduce la irritación de la cloroquina, no tiene irritación en los genitales externos, supera los defectos de un gran efecto secundario y un uso inconveniente en un procedimiento de tratamiento de infección de la genitalia externa existente al mismo tiempo, y puede resolver con efectividad un efecto secundario y una resistencia al medicamento de la cloroquina. la nanoesfera de la presente invención puede prevenir o tratar eficazmente la infección de la genitalia externa y otras enfermedades cutáneas, tales como vaginitis, verrugas

planas y similares, e incluso tiene un notable efecto sinérgico y no solo se expande la gama de aplicación de la cloroquina, sino que también se reduce un fenómeno de resistencia al medicamento causada por el abuso de los medicamentos antibacterianos existentes.

- 5 La presente invención se refiere además a un procedimiento de preparación para la nanoesfera de cloroquina antes mencionada, que incluye las siguientes etapas:

S1: después de disolver el portador de nanoesferas soluble en agua, añadir la cloroquina o el derivado de cloroquina, y mezclar y agitar uniformemente para formar una fase acuosa.

- 10 S2: añadir un emulsionante en una matriz de fase oleosa para formar una fase oleosa; añadir la fase acuosa a la fase oleosa, en donde la relación de volumen de la fase acuosa a la fase oleosa es de 1: 1 a 1 6; y emulsionar a 10000-20000 r/min durante 10-30 minutos para obtener una emulsión de nanoesferas y

- 15 S3: añadir un precipitante a la emulsión de nanoesferas, después de mezclar uniformemente, dejar reposar durante 2-8 minutos, después deshidratar, realizar centrifugación de alta velocidad y limpieza y secar para obtener la nanoesfera de cloroquina.

- 20 La relación másica de la cloroquina o del derivado de cloroquina al portador de nanoesferas soluble en agua varía de 1:3 a 1:5.

Más preferentemente, la relación másica de la cloroquina o del derivado de cloroquina al portador de nanoesferas soluble en agua es 1:3.

- 25 Además, el derivado de cloroquina se selecciona de uno o más de hidroxiclороquina, fosfato de cloroquina y sulfato de cloroquina.

Una tasa de carga de la cloroquina o del derivado de cloroquina varía del 3,0 % al 21,6 %.

- 30 La tasa de carga de la cloroquina o del derivado de cloroquina es del 12,5 %.

El portador de nanoesferas soluble en agua es quitosano soluble en agua.

- 35 Además, el grado de desacetilación del quitosano soluble en agua varía del 80 % al 95 %, y el peso molecular promedio en viscosidad del mismo varía de 3000 a 5000.

Preferiblemente, la relación de volumen de la fase acuosa a la fase oleosa en la etapa S2 es 1:3.

Preferiblemente, la centrifugación a alta velocidad en la etapa S3 se realiza a 1500-2000 r/min durante 5-10 minutos.

- 40 Más preferiblemente, la centrifugación a alta velocidad en la etapa S3 se realiza a 1500 r/min durante 10 minutos.

Preferiblemente, en la etapa S3, el precipitante se añade a la emulsión de nanoesferas a una velocidad de 1 a 5 gotas por segundo.

- 45 Preferiblemente, la relación de volumen del emulsionante al precipitante es (1 - 1,5) : (30 - 50).

Más preferiblemente, la relación de volumen del emulsionante al precipitante es 1:50.

- 50 Preferiblemente, la matriz de fase oleosa es aceite vegetal; y el precipitante es una fase orgánica alcalina.

Más preferiblemente, la fase orgánica alcalina es una solución mezclada de hidróxido de sodio-n-propanol.

Más preferiblemente, el valor del pH de la fase orgánica alcalina varía de 8,5 a 10,0.

- 55 Más preferiblemente, el valor del pH de la fase orgánica alcalina es 9,0.

Preferiblemente, el aceite vegetal se selecciona de uno o más de aceite de maíz, aceite de oliva, aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite de colza y otros aceites vegetales.

- 60 Preferiblemente, el emulsionante se selecciona de uno o más de Tween-20, Tween-80 y Span 80.

- 65 La aplicación de la nanoesfera de cloroquina antes mencionada en la preparación de un producto antibacteriano y/o antiviral, y la aplicación de la nanoesfera de cloroquina anterior en la preparación de un producto para prevenir y tratar la infección de la genitalia externa y/u otras verrugas cutáneas también se incluyen en el alcance de la protección de la presente invención.

El producto que incluye la nanoesfera de cloroquina anterior puede reducir obviamente la irritación de la piel de la cloroquina, promover la cicatrización de heridas, desempeñar un efecto de liberación lenta y mejorar una actividad biológica al mismo tiempo, y se aplica para tratar la infección de la genitalia externa y/u otras verrugas cutáneas.

Preferiblemente, la infección de la genitalia externa incluye vaginitis viral, condiloma acuminado, vaginosis bacteriana, vaginitis infecciosa por hongos o vaginitis tricomoniasis.

Preferiblemente, las otras verrugas cutáneas incluyen verrugas planas y verrugas en partes no genitales causadas por infección por VPH.

La nanoesfera de cloroquina tiene buenos efectos terapéuticos sobre la infección de los genitales externos; incluyendo vaginitis viral, condiloma acuminado, vaginosis bacteriana, vaginitis infecciosa por hongos o vaginitis tricomoniasis, y las otras verrugas cutáneas, incluyendo verrugas planas y verrugas en partes no genitales provocadas por infección por VPH.

La presente invención proporciona además un producto para prevenir y tratar la infección de la genitalia externa y/u otras verrugas cutáneas, que incluye cloroquina o un derivado de cloroquina, e incluye además uno o más de quitosano soluble en agua, carragenina soluble en agua y almidón soluble en agua.

La relación másica de la cloroquina o del derivado de cloroquina al quitosano soluble en agua, la carragenina soluble en agua o el almidón soluble en agua varía de 1:3 a 1:5.

Más preferiblemente, la relación másica de la cloroquina o del derivado de cloroquina al quitosano soluble en agua, el carragenina soluble en agua o el almidón soluble en agua es 1:3.

Además, según la presente invención, el producto para prevenir y tratar la infección de la genitalia externa y/u otras verrugas cutáneas incluye la nanoesfera de cloroquina anterior.

Más preferiblemente, la nanoesfera de cloroquina representa del 1 % al 6 % del peso total del producto.

Además, según la presente invención, el producto es gel.

El producto de la presente invención es un gel; y el producto de la presente invención puede mejorar obviamente el sabor amargo y la irritación de la piel de la cloroquina, promover la cicatrización de heridas, desempeñar un efecto de liberación lenta y mejorar la actividad biológica al mismo tiempo.

En comparación con la técnica anterior, la presente invención tiene los siguientes efectos beneficiosos:

(1) Según la presente invención, el portador de nanoesferas soluble en agua se combina con la cloroquina para elaborar una preparación externa con funciones de esterilización y antiviral al mismo tiempo, que desempeña un efecto sinérgico obvio, tiene ciertos efectos de limpieza y eliminación en diversas bacterias y virus, y los efectos de limpieza y atención en órganos genitales externos para machos y hembras, reduce las reacciones inflamatorias de los genitales externos, puede mejorar la irritación de la piel causada por la cloroquina, no tiene irritación en la mucosa vaginal y el pene, y tiene adhesividad de la mucosa, retención local y auto-degradabilidad, y la preparación no solo puede prevenir infecciones bacterianas y virales, sino que también puede promover la cicatrización de microheridas, y puede usarse para el tratamiento efectivo de infecciones y verrugas de los genitales externos, especialmente para el cuidado de la salud de los genitales externos antes y después de la vida sexual, con un efecto evidente, y un efecto fresco y confortable.

(2) La presente invención usa principalmente el portador de nanoesferas soluble en agua combinado con la cloroquina sinérgica como componente principal. La prescripción es estable, y existe un medicamento en forma de nanoesfera para que pueda prolongarse el tiempo de permanencia del medicamento en una parte tratada, lo que permite que el tiempo de acción sea más largo y mejore la biodisponibilidad y el efecto terapéutico del medicamento. El medicamento es simple y conveniente en el procedimiento de preparación, fácil de sintetizar sin efectos tóxicos y secundarios, y tiene alta seguridad; Además, se puede realizar una aplicación industrial de un nuevo medicamento, proporcionando así una nueva dirección para el desarrollo y la aplicación de un medicamento antibacteriano activo y antiviral.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra una nanoesfera de cloroquina-quitosano.

La Figura 2 es una curva estándar para la detección de cloroquina en fase líquida de alto rendimiento.

La Figura 3 muestra un contenido de cloroquina en la nanoesfera de cloroquina-quitosano en detección de fase líquida de alto rendimiento.

La Figura 4 muestra la liberación del fármaco de la nanoesfera de cloroquina-quitosano y la microesfera de cloroquina.

La Figura 5 muestra productos de gel con diferentes relaciones observadas en un plano de vidrio liso (la relación másica de fosfato de cloroquina a quitosano es, respectivamente, 1:5, 1:3, 1:1, 1:0,5, de productos de gel del núm. 1 al núm. 4, en donde el núm. 5 es un producto de gel de quitosano puro).

La Figura 6 muestra el flujo de los productos de gel con diferentes relaciones en el plano de vidrio liso en 1 minuto (la relación másica del fosfato de cloroquina al quitosano es, respectivamente, 1:5, 1:3, 1:1, 1:0, 5 de productos de gel del núm. 1 al núm. 4, en donde el núm. 5 es el producto de gel de quitosano puro).

La Figura 7 muestra resultados de tinción con H-E de una prueba de irritación en la piel dañada, en la que el Grupo A es un grupo de control con una matriz de gel en blanco, incluyendo la Figura A1 (lado de la sustancia ensayada) y la Figura A2 (lado de control negativo); El grupo B es un grupo 1 de gel de nanoesferas de cloroquina-quitosano con la relación másica de fosfato de cloroquina a quitosano siendo 1: 3, incluyendo la Figura B1 (lado de la sustancia ensayada) y la Figura B2 (lado de control negativo); El grupo C es un grupo 2 de gel de nanoesferas de cloroquina-quitosano con la relación másica de fosfato de cloroquina a quitosano siendo 1: 5, incluyendo la Figura C1 (lado de la sustancia ensayada) y la Figura C2 (lado de control negativo); El grupo D es un grupo 3 de gel de nanoesferas de cloroquina-quitosano con la relación másica de fosfato de cloroquina a quitosano siendo 1: 0,5, incluyendo la Figura D1 (lado de la sustancia ensayada) y la Figura D2 (lado de control negativo); y el Grupo E es un grupo de gel de fosfato de cloroquina, incluyendo la Figura E1 (lado de la sustancia ensayada) y la Figura E2 (lado de control negativo).

La Figura 8 muestra resultados de tinción con H-E de una prueba animal en vaginitis por virus del herpes, en donde la Figura A es un grupo de control en blanco; La Figura B es un grupo de control modelo; La Figura C es un grupo 1 de gel de nanoesferas de cloroquina-quitosano con la relación másica de fosfato de cloroquina a quitosano siendo 1: 3; y la Figura D es un grupo 2 de gel de nanoesferas de cloroquina-quitosano con la relación másica de fosfato de cloroquina a quitosano siendo 1:0,5; y la Figura E es un grupo de gel de fosfato de cloroquina.

La Figura 9 muestra los resultados de la tinción con H-E de una prueba animal en el condiloma acuminado por VPH, en donde la Figura A es un grupo de control modelo; La Figura B es un grupo 1 de gel de nanoesferas de cloroquina-quitosano con la relación másica de fosfato de cloroquina a quitosano siendo 1: 3; La Figura C es un grupo 2 de gel de nanoesferas de cloroquina-quitosano con la relación másica de fosfato de cloroquina a quitosano siendo 1:0,5; y la Figura D es un grupo de gel de fosfato de cloroquina.

Descripción detallada

La invención se define por las reivindicaciones.

Los reactivos y materiales utilizados en las siguientes realizaciones están disponibles comercialmente a menos que se indique lo contrario.

Realización 1 - Preparación de nanoesfera de cloroquina-quitosano

1. Procedimiento de preparación

En S1, se disolvieron 3g de quitosano soluble en agua en 100 mL de agua, se añadieron 1,0 g de fosfato de cloroquina y se mezclaron y agitaron uniformemente para formar una fase acuosa, en donde el grado de desacetilación del quitosano soluble en agua era del 80 %, y el peso molecular promedio en viscosidad del mismo fue de 5000.

En S2, se usaron 300 mL de aceite de maíz como matriz de fase oleosa, y se añadió 1 mL de un emulsionante de monolaurato de sorbitán de polietilenglicol a la matriz de fase oleosa para formar una fase oleosa; y la fase acuosa se añadió a la fase oleosa, en donde la relación de volumen de la fase acuosa a la fase oleosa fue 1:3, y después se realizó emulsificación a 15000 r/min durante 30 minutos para obtener una emulsión de nanoesferas.

En S3, se usó una solución mixta de hidróxido de sodio-n-propanol como precipitante, se añadieron en primer lugar 10 mL de n-propanol con varias gotas de solución saturada de hidróxido de sodio para ajustar el valor del pH a 9, a continuación, la solución mixta se mezcló uniformemente y se añadió a la emulsión de nanoesferas a una velocidad de 1 a 5 gotas por segundo, la relación de volumen del emulsionante al precipitante fue 1:50, después la mezcla obtenida se mantuvo en reposo durante 5 minutos, y se añadió una cantidad adecuada de n-propanol para deshidratación; y después la mezcla se centrifugó a 1500 r/min durante 10 minutos, se limpió y se secó, obteniendo así la nanoesfera de cloroquina-quitosano.

2. Caracterización del producto

(1) La nanoesfera de cloroquina-quitosano preparada se muestra en la Figura 1, en donde un diámetro de partícula de la nanoesfera de cloroquina-quitosano preparada varía de 100 nm a 800 nm.

(2) Como se muestra en la Figura 2 y la Figura 3, la tasa de carga de la cloroquina en la nanoesfera de cloroquina-quitosano es del 12,5 % mediante la determinación por cromatografía líquida de alto rendimiento.

5 Realización 2 - Preparación de nanoesfera de cloroquina-quitosano

1. Procedimiento de preparación

En S1, el quitosano soluble en agua se disolvió en agua, luego se añadió hidroxiclороquina, y se mezcló uniformemente y se agitó para formar una fase acuosa, y se controló la relación en masa de la hidroxiclороquina al quitosano soluble en agua para ser 1:5, en donde el grado de desacetilación del quitosano soluble en agua era del 90 %, y el peso molecular promedio en viscosidad del mismo fue 3000.

En S2, se usaron 300 mL de aceite de maíz como matriz de fase oleosa, y se añadió 1 mL de un emulsionante de monolaurato de sorbitán de polietilenglicol a la matriz de fase oleosa para formar una fase oleosa; y la fase acuosa se añadió a la fase oleosa, en donde la relación de volumen de la fase acuosa a la fase oleosa fue 1:1, y después se realizó emulsificación a 10000 r/min durante 30 minutos para obtener una emulsión de nanoesferas.

En S3, se usó una solución mixta de hidróxido de sodio-n-propanol como precipitante, se añadieron 10 mL de n-propanol con varias gotas de solución saturada de hidróxido de sodio para ajustar el valor del pH a 8,5, a continuación, la solución mixta se mezcló uniformemente y se añadió a la emulsión de nanoesferas lentamente, se controló la relación de volumen del emulsionante al precipitante para ser de 1,5:50, después la mezcla obtenida se mantuvo durante 2 minutos, y se añadió una cantidad adecuada de n-propanol para deshidratación; y después la mezcla se centrifugó a 2000 r/min durante 5 minutos, se limpió y se secó, obteniendo así la nanoesfera de cloroquina-quitosano, con un diámetro de partícula que varía de 200 nm a 800 nm, y una tasa de carga de cloroquina de 10,3 %.

Realización 3 - Preparación de nanoesfera de cloroquina-quitosano

1. Procedimiento de preparación

En S1, se disolvió quitosano soluble en agua en agua, luego se añadió sulfato de cloroquina, y se mezcló uniformemente y se agitó para formar una fase acuosa, y se controló la relación másica del sulfato de cloroquina al quitosano soluble en agua que era 1:7, en donde el grado de desacetilación del quitosano soluble en agua era del 90 %, y el peso molecular promedio en viscosidad del mismo fue de 4000.

En S2, se usó aceite de oliva como matriz de fase oleosa, y se añadió un emulsionante de monooleato de polioxietileno sorbitán a la matriz de fase oleosa para formar una fase oleosa; y la fase acuosa se añadió a la fase oleosa, en donde la relación de volumen de la fase acuosa a la fase oleosa fue 1:6, y después se realizó emulsificación a 20000 r/min durante 10 minutos para obtener una emulsión de nanoesferas.

En S3, se usó una solución mixta de hidróxido de sodio-n-propanol como precipitante, en primer lugar se añadió n-propanol con varias gotas de solución saturada de hidróxido de sodio para ajustar el valor del pH a 10, después la solución mezclada se mezcló uniformemente y se añadió a la emulsión de nanoesferas lentamente, la relación de volumen del emulsionante al precipitante se controló para que sea de 1,5:30, después la mezcla obtenida se mantuvo en reposo durante 8 minutos, y se añadió una cantidad adecuada de n-propanol para deshidratación; y después la mezcla se centrifugó a 1500 r/min durante 10 minutos, se limpió y se secó, obteniendo así la nanoesfera de cloroquina-quitosano, con un diámetro medio de partícula de 400 nm, y una tasa de carga de cloroquina del 8,6 %.

Realización 4 - Preparación de gel de nanoesferas de cloroquina-quitosano

1. Prescripción de gel:

Nanoesfera de cloroquina-quitosano	1 %
Carboximetilcelulosa	2 %
Etilparabeno	0,2 %
Glicerol	30 %
Aceite de menta	0,1 %
Agua purificada	Complementado a 100 %

2. El procedimiento incluye las siguientes etapas.

(1) Preparación de nanoesfera: la nanoesfera se preparó según las etapas de preparación de la nanoesfera de cloroquina-quitosano en la Realización 1.

(2) Se añadieron 20 g de carboximetilcelulosa con 300 g de glicerol (dosificación de prescripción) y 2 g de etilparabeno, después la mezcla obtenida se agitó uniformemente y se hinchó completamente y se usó como una matriz de gel; Se disolvieron 10 g de las nanoesferas de cloroquina-quitano con 100 mL de agua, se añadieron a la matriz de gel en lotes y se agitaron. Se añadió 1 mL de aceite de menta, y se añadió agua a 1000 mL para preparar un gel de nanoesferas de cloroquina-quitano antibacteriano y antiviral adecuado para genitales externos.

3. Se preparó gel de cloroquina puro mediante el mismo procedimiento, y se compararon las tasas de liberación de cloroquina en el gel de nanoesferas de cloroquina-quitano y el gel de cloroquina. Como se muestra en la Figura 4, el gel de nanoesferas de cloroquina-quitano podría liberar lentamente y de manera estable la cloroquina. El gel de nanoesferas de cloroquina-quitano preparado por la presente invención no tiene el fenómeno de liberación repentina en la etapa temprana, y la velocidad de liberación del gel de nanoesferas de cloroquina-quitano no es casi afectada por un medio. La nanoesfera de cloroquina-quitano presenta un buen efecto de liberación lenta, que es beneficioso para la liberación sostenida de un medicamento después de la administración externa.

Realización 5 - Preparación de gel de nanoesferas de cloroquina-quitano

1. Prescripción de gel:

Nanoesfera de cloroquina-quitano	5 %
Carboximetilcelulosa	0,5 %
Etilparabeno	0,5 %
Glicerol	30 %
Aceite de menta	0,1 %
Agua purificada	Complementado a 100 %

2. El procedimiento incluye las siguientes etapas.

(1) Preparación de nanoesfera: la nanoesfera se preparó según las etapas de preparación de la nanoesfera de cloroquina-quitano en la Realización 1.

(2) Se añadió carboximetilcelulosa con glicerol (dosificación de prescripción) y 800 mL de agua, a continuación se agitó la mezcla obtenida uniformemente y se hinchó completamente y se usó como una matriz de gel; Las nanoesferas de cloroquina-quitano se disolvieron con 100 mL de agua, se añadieron a la matriz de gel en lotes y se agitaron. Se disolvió etilparabeno con 50 mL de agua caliente a 80 °C a 85 °C, y se añadió a la matriz de gel cuando la temperatura se redujo por debajo de 40 °C y se agitó uniformemente. Se añadió aceite de menta, y se añadió agua a 1000 mL para preparar un gel de nanoesferas de cloroquina-quitano antibacteriano y antiviral adecuado para genitales externos.

3. Según las etapas anteriores, con las condiciones restantes del procedimiento sin cambios, se cambiaron las relaciones de masa de fosfato de cloroquina a quitano para preparar los geles 1, 2, 3 y 4 respectivamente; y mientras tanto, según las etapas de preparación de la realización anterior, con las condiciones restantes del procedimiento sin cambios, se usó quitano puro como componente activo principal para preparar el gel 5, sin adición de cloroquina o un derivado de cloroquina, como se muestra en la siguiente tabla.

Tabla 1 - Resultados de la preparación de gel de nanoesferas con diferentes relaciones de cloroquina a quitano

	Relación másica de fosfato de cloroquina a quitano	Carácter	Valor del pH	Viscosidad (mp/s)	Contenido de cloroquina eficaz (%)
Gel 1	1:5	Gel semitransparente amarillo pálido con textura uniforme y fragancia de menta suave, que puede fluir hacia abajo en una columna	4,27	11868	0,84
Gel 2	1:3	Gel beige no transparente con una textura uniforme y una fragancia de menta suave, que puede fluir hacia abajo en una columna	4,08	9246	1,67
Gel 3	1:1	Pasta no transparente beige con fragancia de menta suave y partículas pequeñas	3,97	6217	2,50
Gel 4	1:0,5	Pasta no transparente de color amarillo terroso con fragancia de menta suave y partículas grandes	3,77	5890	5,03
Gel 5	Quitano puro	Gel transparente de color naranja con fragancia de menta verde y textura uniforme	4,79	20969	0

La Figura 5 es un diagrama de forma de productos de gel con diferentes relaciones observadas en un plano de vidrio liso (la relación másica de fosfato de cloroquina a quitosano es, respectivamente, 1:5, 1:3, 1:1, 1:0,5 a partir de productos de gel del núm. 1 al núm. 4, en donde el núm. 5 es un producto de quitosano puro); y la Figura 6 muestra el flujo de los productos de gel con diferentes relaciones en el plano de vidrio liso en 1 minuto.

El experimento mostró que cuando la relación del fosfato de cloroquina al quitosano era 1:1 o 1:0,5, el gel preparado era de textura irregular, tenía partículas pequeñas y tenía una mala fluidez. Cuando la relación del fosfato de cloroquina con el quitosano era 1:5 o 1:3, se preparaba un producto con gel de textura uniforme, un pH adecuado para administración vaginal y cutánea, una viscosidad moderada, color y olor que cumplen las necesidades de diferentes poblaciones, y de contenido estable de cloroquina. Sin embargo, cuando la relación másica del fosfato de cloroquina con respecto al quitosano era 1:5, el contenido de cloroquina fue menor y el efecto del medicamento se limitó en cierta medida, y en consideración integral, cuando la relación másica del fosfato de cloroquina al quitosano fue 1:3, el producto era mejor en rendimiento.

Ejemplo 6 - Ensayo de irritación de gel de nanoesferas de cloroquina-quitosano en piel dañada

1. B. Procedimiento experimental

(1) Se usaron conejos de Nueva Zelanda como objetos experimentales, se compararon la piel izquierda y derecha del mismo cuerpo entre sí, un símbolo "Tic-Tac-Toe" (con un área de aproximadamente 3,0 cm x 3,0 cm) se marcó en pieles de partes de administración en los lados izquierdo y derecho respectivamente mediante el uso de un procedimiento de autocomparación de la piel izquierda/derecha del mismo individuo. 1, 0 g de sustancia probada se administraron al lado izquierdo, en donde la dosis de administración era de 9 cm²/por conejo, un área de aplicación de cada vez fue de 3,0 cm x 3,0 cm. Se proporcionó 1,0 g de vaselina blanca al lado derecho como un lado de control negativo. Los animales en cada grupo se administraron una vez al día durante 28 días consecutivos.

Los grupos de las sustancias ensayadas fueron respectivamente los siguientes:

Grupo A: un grupo de control, con una matriz de gel en blanco,

Grupo B: un grupo 1 de gel de nanoesferas de cloroquina-quitosano, en donde una relación másica de fosfato de cloroquina con respecto a quitosano era 1: 3,

Grupo C: un grupo 2 de gel de nanoesferas de cloroquina-quitosano, en donde una relación másica de fosfato de cloroquina con respecto al quitosano era 1: 5,

Grupo D: un grupo 3 de gel de nanoesferas de cloroquina-quitosano, en donde una relación másica de fosfato de cloroquina con respecto al quitosano era 1: 0,5, y

Grupo E: un grupo de gel de cloroquina.

Antes de cada aplicación, y 1 hora después de cada eliminación de medicamentos, y 1 hora, 24 horas, 48 horas, 72 horas y 14 días después de la última eliminación de medicamentos en el 28º día, se observaron y registraron eritema y edema en las partes de administración respectivamente en cada punto de tiempo de observación para los animales en cada grupo anterior, y se puntuaron el eritema y el edema. Mientras tanto, fue necesario observar si se produjo pigmentación, punto de sangrado, rugosidad de la piel o adelgazamiento de la piel en las partes de administración, y registrar el tiempo de aparición y regresión de la pigmentación, el punto de sangrado, la rugosidad de la piel o el adelgazamiento de la piel.

(2) Para los animales en los cinco grupos anteriores, las pieles izquierda y derecha de las partes de administración de los animales en cada grupo se sometieron respectivamente a examen histopatológico en el 14º día después de la última eliminación de medicamentos.

2. Resultados

(1) Resultados de la observación de la piel de cada grupo

Resultados de ensayo:

En el lado de control negativo (lado derecho), las pieles de las partes de administración de los animales en cada grupo de sustancias probadas no tuvieron una reacción de irritación obvia en cada punto de tiempo de observación, de modo que se pudo evaluar que el resultado de una sustancia de control negativo (vaselina blanca) era negativa.

Grupo A: no se encontró una reacción irritante obvia en todos los puntos de tiempo de observación, de modo que pudiera juzgarse que la matriz de gel en blanco no provocó irritación en la piel.

El grupo B: las pieles de las partes de administración en el lado de la sustancia ensayada (lado izquierdo) de 6/6 animales tuvieron ligeros eritema o edema en el punto de tiempo de observación visual del 1^{er} día al 12^o día, no se encontró una anomalía obvia en la observación de las partes de administración de cada animal del 12^o día al momento antes de la necropsia, y los resultados de exámenes histopatológicos de 72 horas después y del 14^o día después de la última eliminación de medicamentos mostró que las pieles de las partes de administración en el lado de la sustancia probada de 6/6 animales tenían un ligero edema en 2 casos y ningún cambio anormal obvio en otros casos. Por lo tanto, la irritación anterior tendió a ser juzgada porque el medicamento agrava ligeramente una estimulación mecánica después de que la piel fue dañada.

Grupo C: las pieles de las partes de administración en el lado de la sustancia ensayada (lado izquierdo) de 6/6 animales tuvieron ligeros eritema o edema en un punto de tiempo de observación visual del 1^{er} día al 12^o día, no se encontró una anomalía obvia en la observación de las partes de administración de cada animal del 12^o día al momento antes de la necropsia, y los resultados de exámenes histopatológicos de 72 horas después y del 14^o día después de la última eliminación de medicamentos mostró que las pieles de las partes de administración en el lado de la sustancia probada de 6/6 animales no tuvieron ningún cambio anormal evidente. Por lo tanto, la irritación anterior tendió a ser evaluada como una estimulación mecánica después de que la piel fue dañada.

Grupo D: 4/6 de las partes de administración en el lado de la sustancia ensayada (lado izquierdo) de los 6/6 animales tuvieron eritema o edema relativamente obvios en el 12^o día, las costras cayeron durante la administración, las superficies de la piel no pudieron cicatrizar por completo cuando las costras cayeron, y las heridas cicatrizaron obviamente 72 horas después de la última eliminación de medicamentos.

Grupo E: 4/6 de las partes dañadas de las partes de administración en el lado de la sustancia ensayada (lado izquierdo) de los 6/6 animales se agrietaron en el 11^o día, y tendieron a extenderse hacia afuera, el eritema o el edema en las partes de administración fue más evidente que el del periodo previo, se regeneraron continuamente las costras y luego se desprendieron, y la superficie de la piel no pudo cicatrizar por completo cuando las costras cayeron, lo que era significativamente diferente del lado de control negativo (el lado derecho intra-individual). Combinado con los resultados de examen histopatológico de 72 horas después y del 14^o día después de la última eliminación de medicamentos, los 6/6 animales tuvieron anomalías obvias en las pieles de las partes de administración en el lado de la sustancia probada, en donde 3 casos de autopsia 72 horas después de la última eliminación de medicamentos mostraron un cierto grado de daño, el engrosamiento obvio de una capa epidérmica, el trastorno de la disposición de los tejidos conectivos subepidérmicos, la proliferación de tejidos fibrosos, la infiltración de células inflamatorias, la costra de la epidermis, la depresión de una parte de la epidermis, la estructura difusa, etc., y 3 casos de autopsia el 14^o día después de la última eliminación de medicamentos mostró engrosamiento epidérmico local, trastorno de disposición de tejidos conectivos subepidérmicos, proliferación de tejidos fibrosos e infiltración de células inflamatorias.

Se pudo observar a partir de los resultados experimentales anteriores que la irritación del gel de nanoesferas de fosfato de cloroquina en las pieles dañadas fue significativamente menor que la del gel de cloroquina (preparación externa general) después de administración múltiple a las pieles dañadas de los conejos de Nueva Zelanda. Para el gel de nanoesferas de fosfato de cloroquina con quitosano, cuanto menor sea la relación entre el portador de cloroquina/nanoesfera, menor será la reacción de irritación en la piel, y mejor será la reparación de la piel dañada después de detener la administración. Sin embargo, el gel de cloroquina podría causar peor daño en las pieles dañadas, cuando el lado de control negativo se reparó completamente, las pieles en el lado del gel de cloroquina no se podrían reparar normalmente, y las pieles en el lado de gel de cloroquina solo se pueden recuperar en cierto grado 14 días después de detener la administración, con una diferencia obvia, lo que indicó que la cloroquina tenía un efecto de irritación en las pieles dañadas, y la nanoesfera de cloroquina-quitosano podría reducir significativamente el efecto de irritación, lo que podría estar relacionado con los efectos antibacterianos, antiinflamatorios y de cicatrización de heridas del propio quitosano.

(2) Resultados de exámenes patológicos

Grupo A: como se muestra en la Figura A1 (lado de matriz en blanco) y la Figura A2 (lado de control negativo) en la Figura 7, epidermis de piel, dermis y accesorios estaban en buena condición estructuralmente, y no se encontró infiltración de células inflamatorias ni dilatación de vasos pequeños.

Grupo B: como se muestra en la Figura B1 (gel de nanoesferas de cloroquina-quitosano) y la Figura B2 (lado de control negativo) en la Figura 7, la Figura B2 mostró que la epidermis de la piel, la dermis y los accesorios estaban en buena condición estructuralmente, y no se encontró infiltración de células inflamatorias ni dilatación de vasos pequeños. En comparación con el lado de control negativo, la Figura B1 mostró que una capa epidérmica focal pequeña de las pieles en el grupo estaba ligeramente engrosada, con infiltración de un pequeño número de células inflamatorias.

Grupo C: como se muestra en la Figura C1 (lado de gel de nanoesferas de cloroquina-quitosano) y la Figura C2 (lado de control negativo) en la Figura 7, la Figura C2 mostró que la epidermis de la piel, la dermis y los accesorios estaban en buena condición estructuralmente, y no se encontró infiltración de células inflamatorias ni dilatación de vasos pequeños. La Figura C1 mostró que una capa epidérmica local de las pieles en el grupo estaba ligeramente engrosada, se incrementaron evidentemente varias capas celulares y las células crecieron de manera extensiva a una capa de

dermis y la disposición de tejidos conectivos subepidérmicos se desordenó, con infiltración de algunas células inflamatorias.

Grupo D: como se muestra en la Figura D1 (lado de gel de cloroquina-quitosano) y la Figura D2 (lado de control negativo) en la Figura 7, la Figura D2 mostró que la epidermis de la piel, la dermis y los accesorios estaban en buena condición estructuralmente, y no se encontró infiltración de células inflamatorias ni dilatación de vasos pequeños. En comparación con el lado de control negativo, la Figura D1 mostró que la capa epidérmica local en el grupo estaba ligeramente engrosada, y el número de capas celulares aumentó, con infiltración de un pequeño número de células inflamatorias.

Grupo E: como se muestra en la Figura E1 (lado de gel de cloroquina) y la Figura E2 (lado de control negativo) en la Figura 7, en el lado de control negativo, la epidermis de la piel, la dermis y los accesorios estaban en buena condición estructuralmente, no se encontró infiltración de células inflamatorias ni dilatación de vasos pequeños, mientras que una capa epidérmica local de las pieles en el lado del gel de cloroquina tenía costras, y la epidermis estaba obviamente engrosada; una parte de las pieles con costras estaban estrechamente conectadas con un tejido subcutáneo, la capa epidérmica se hundió, la estructura estaba difusa, y un gran número de células inflamatorias se infiltraron con hiperplasia de tejido fibroso; un número de folículos pilosos en una capa dérmica disminuyó significativamente; y sin embargo, no se encontró una anomalía obvia en una capa muscular y en el tejido subcutáneo.

Los resultados del examen patológico antes vistos mostraron que, en comparación con el gel de cloroquina, el gel del grupo de nanoesferas de cloroquina-quitosano tuvo ventajas obvias en la irritación y curación después de la retirada del medicamento. En cada grupo de nanoesferas de cloroquina-quitosano, cuanto menor sea la relación de la cloroquina al portador de nanoesferas, menor será la reacción de irritación a la piel.

Según los resultados de la observación cutánea y los resultados del examen patológico, la reacción de irritación del gel de nanoesferas de cloroquina-quitosano en las pieles fue evidentemente menor que la del gel de cloroquina, lo que indicó que la nanoesfera de cloroquina-quitosano redujo considerablemente un efecto secundario de irritación de la cloroquina sobre las pieles y promovió la cicatrización de heridas en cierta medida. Cuando la relación másica de la cloroquina al quitosano no era superior a 1:3, el efecto de irritación era menor y el contenido de medicamento era el más alto.

Realización 7 - Prueba animal sobre vaginitis por virus del herpes

1. B. Procedimiento experimental

La nanoesfera de cloroquina-quitosano obtenida en la Realización 1 se convirtió en gel para la prueba animal sobre vaginitis por virus del herpes.

El procedimiento experimental específico fue que: un número de cobayas Hartley calificados para observación adaptativa se seleccionaron, 10 animales se seleccionaron aleatoriamente como grupo de control en blanco (A), y los otros animales se infectaron todos con el virus del herpes a través de la vagina para el modelado. Después del modelado, los animales se dividieron aleatoriamente en cinco grupos, y el agrupamiento global fue el siguiente:

Grupo A: un grupo de control en blanco,

Grupo B: un grupo modelo,

Grupo C: un grupo 1 de gel de nanoesferas de cloroquina-quitosano, en donde una relación másica de fosfato de cloroquina a quitosano era 1:3,

Grupo D: un grupo 2 de gel de nanoesferas de cloroquina-quitosano, en donde la relación másica de fosfato de cloroquina a quitosano era de 1:0,5, y

Grupo E: un grupo de gel de cloroquina.

10 animales en cada grupo se administraron por vía vaginal. El grupo de control en blanco y el grupo de control modelo recibieron una inyección de cloruro de sodio al 0,9 %, mientras que a los Grupos C, D y E se le administró el medicamento probado correspondiente una vez al día durante dos semanas. 14 días después de la administración, se tomó un tejido de la mucosa vaginal para fijar e incrustar el día siguiente, cera de parafina se cortó continuamente en secciones de 4 µm, y después de la tinción con hematoxilina-eosina (HE), se observó una afección patológica del tejido de la mucosa vaginal bajo un microscopio.

2. Resultados

(1) Examen patológico

Grupo A: los resultados del grupo de control en blanco se muestran en la Figura A en la Figura 8, en donde una célula epitelial de la mucosa vaginal del grupo de control en blanco tenía una estructura completa y un recipiente de la lámina propia no tenía dilatación ni infiltración de células inflamatorias.

- 5 Grupo B: los resultados del grupo de control modelo se muestran en la Figura B en la Figura 8, en donde una lámina propia de la submucosa de la vagina en el grupo de control modelo tenía infiltración de un gran número de células inflamatorias, disposición desordenada de tejidos conectivos sueltos y edema obvio.

- 10 Ejemplo C: resultados del grupo 1 de gel de nanoesferas de cloroquina-quitano, en donde la relación másica del fosfato de cloroquina al quitano fue 1:3, se muestra en la Figura C en la Figura 8, en donde se incrementaron los tejidos conectivos de una capa serosa del grupo y se desordenaron en disposición, con edema obvio e infiltración de un pequeño número de células inflamatorias.

- 15 Grupo D: resultados del grupo 2 de gel de nanoesferas de cloroquina-quitano, en donde la relación másica del fosfato de cloroquina con respecto al quitano era de 1:0,5, se muestra en la Figura D en la Figura 8, en donde una lámina propia de la submucosa del grupo tuvo edema obvio, y los tejidos conectivos de la capa serosa se incrementaron y se desordenaron en disposición, con edema obvio e infiltración de células inflamatorias.

- 20 Grupo E: los resultados del grupo de gel de fosfato de cloroquina se muestran en la Figura E en la Figura 8, en donde las células epiteliales locales de la mucosa vaginal del grupo de gel de cloroquina se deformaron y se necrosaron, y los tejidos conectivos sueltos en la lámina propia de la submucosa se desordenaron ligeramente, con edema obvio e infiltración de células inflamatorias.

(2) Resultados del grado de lesión de los animales sometidos a ensayo en examen histológico

Tabla 3: Tabla estadística del grado de lesión de animales sometidos a ensayo en examen histológico

Grupo	Grado de lesión	Vagina		
		Tejidos conectivos sueltos desordenados de lámina propia y edema	Capa serosa engrosada y edema	Infiltración de células inflamatorias de la lámina propia
Grupo A Control en blanco	-	10/10	10/10	10/10
	±	0/10	0/10	0/10
	+	0/10	0/10	0/10
	++	0/10	0/10	0/10
	+++	0/10	0/10	0/10
Grupo D Control modelo	-	0/10	2/10	2/10
	±	2/10	3/10	4/10
	+	5/10	3/10	2/10
	++	3/10	2/10	2/10
	+++	0/10	0/10	0/10
Grupo C Gel de nanoesferas de cloroquina-quitano	-	4/10	9/10	4/10
	±	3/10	0/10	3/10
	+	2/10	0/10	3/10
	++	1/10	1/10	0/10
	+++	0/10	0/10	0/10
Grupo D Gel de nanoesferas de cloroquina-quitano	-	2/10	8/10	5/10
	±	2/10	0/10	4/10
	+	3/10	1/10	1/10
	++	3/10	0/10	0/10
	+++	0/10	1/10	0/10
Grupo E Fosfato de cloroquina	-	1/10	6/10	4/10
	±	3/10	0/10	4/10
	+	1/10	3/10	2/10
	++	4/10	0/10	0/10
	+++	1/10	1/10	0/10

Nota: "-" indica que una estructura de tejido no tiene anomalías obvias; "±" indica lesión extremadamente leve; "+" indica lesión leve; "++" indica lesión moderada; y "+++" indica lesión grave.

Los resultados de la investigación anteriores mostraron que en comparación con el gel de cloroquina, el gel de nanoesferas de cloroquina-quitosano podría mejorar obviamente la vaginitis causada por el virus del herpes. Se comparó un grado de inflamación de cada grupo; el grupo de control modelo > el grupo E de fosfato de cloroquina > el grupo D de gel de nanoesferas de cloroquina-quitosano > el grupo C de gel de nanoesferas de cloroquina-quitosano > el grupo de control en blanco. Además, la aplicación combinada de cloroquina y quitosano podría mejorar significativamente el edema vaginal, y los resultados fueron similares al grado de inflamación, lo que indicó que la aplicación combinada de la cloroquina y el quitosano tuvieron un efecto terapéutico significativo.

Realización 8 - Tratamiento de condiloma acuminado causada por VPH

1. B. Procedimiento experimental

Se seleccionó una pluralidad de ratones desnudos (mitad machos y mitad hembras) calificados para observación adaptativa, se inocularon directamente tejidos de verruga infectados con VPH a los ratones desnudos por vía subcutánea. Un procedimiento de trasplante fue estrictamente de acuerdo con un principio de operación aséptica. 5 días a 6 días después de la inoculación de verrugas, los ratones desnudos con partes buenas inoculadas se seleccionaron y se dividieron aleatoriamente y uniformemente en 4 grupos según el peso corporal y el género, especialmente:

Grupo A: un grupo de control modelo,

Grupo B: un grupo 1 de gel de nanoesferas de cloroquina-quitosano, en donde una relación másica de fosfato de cloroquina con respecto a quitosano era 1: 3,

Grupo C: un grupo 2 de gel de nanoesferas de cloroquina-quitosano, en donde una relación másica de fosfato de cloroquina con respecto al quitosano era de 1: 0,5, y

Grupo D: un grupo de gel de fosfato de cloroquina.

Cada grupo tenía 6 ratones desnudos (mitad machos y mitad hembras). El grupo de control modelo recibió vaselina blanca y a los otros grupos se le dieron los geles correspondientes. Cada grupo fue administró a través de la piel, y un área de administración correspondiente en las partes de administración de animales era de aproximadamente 2 cm x 2 cm. El medicamento se administró una vez al día, con 6 horas para cada contacto y después de 6 horas de contacto, se retiró el medicamento. La administración se realizó continuamente durante 14 días. 14 días después de la administración, se tomó un tejido de verruga para fijar e incrustar el día siguiente, cera de parafina se cortó continuamente en secciones de 4 µm, y después de la tinción con hematoxilina-eosina (HE), se observó una afección patológica del tejido de verruga bajo un microscopio.

2. Resultados

Resultados de exámenes patológicos

(1) Los resultados de verrugas del Grupo A mostraron que el tejido de verruga podía verse en cada animal, una estructura de células epiteliales del tejido de verruga estaba completa, y una célula koilocitoide podría verse localmente.

Como se muestra en la Figura A en la Figura 9, para las verrugas, existían vacuolas obvias alrededor de un núcleo de una célula epitelial local, con un nucleolo obvio. (Tinción H-E x200)

(2) los resultados de verrugas del Grupo B mostraron que el tejido de verruga podía verse en 6 animales. Células epiteliales de tejidos de verruga de 2 animales (03 y 04; 2/6) se degeneraron y necrosaron localmente, y unas pocas células koilocitoides podían ser vistas y células epiteliales de tejidos de verruga de 4 animales (01, 02, 05 y 06; 4/6) estaban completas en estructura, y las células koilocitoides podían verse localmente.

Como se muestra en la Figura B en la Figura 9, para las verrugas, existían vacuolas obvias alrededor de un núcleo de una célula epitelial local, con un nucleolo obvio. (Tinción H-E x200)

(3) los resultados de verrugas de grupo C mostraron que el tejido de verruga podía verse en 6 animales. Las células epiteliales de tejidos de verruga de 3 animales (03, 04 y 05; 3/6) se degeneraron y necrosaron localmente, y unas pocas células koilocitoides podían ser vistas y células epiteliales de tejidos de verrugas de 3 animales (01, 02 y 06; 3/6) estaban completas en estructura, y células koilocitoides podían verse localmente.

Como se muestra en la Figura C en la Figura 9, para las verrugas, existían vacuolas obvias alrededor de un núcleo de una célula epitelial local, con un nucleolo obvio. (Tinción H-E x200)

(4) los resultados de verrugas del Grupo D mostraron que el tejido de verruga podía verse en 6 animales. Células epiteliales de tejidos de verruga de 4 animales (01, 02, 03 y 04; 4/6) se degeneraron y necrosaron localmente, y unas pocas células koilocitoides podían ser vistas; y células epiteliales de tejidos de verruga de 2 animales (05 y 06; 2/6) estaban completas en estructura, y células koilocitoides podían verse localmente.

Como se muestra en la Figura D en la Figura 9, para las verrugas, las células epidérmicas de las verrugas tenían hiperqueratosis, epitelio escamoso podía verse bajo la epidermis, las células epiteliales se degeneraron y necrosaron localmente, y se podían ver localmente unas pocas células koilocitoides.

Los resultados de la investigación anterior mostraron que la cloroquina tuvo el efecto de eliminar los virus de las células infectadas por las verrugas causadas por el VPH, y con el aumento del contenido de cloroquina, se redujo la cantidad de células koilocitoides infectadas con el VPH. El grupo de gel de cloroquina (Grupo D) podría eliminar obviamente las células infectadas, pero podría causar degeneración local y necrosis de tejidos. En comparación con el gel de cloroquina puro, el gel de cloroquina-quitano podría proteger la piel al tiempo que reducía las células infectadas.

Realización 9 - Efecto de destrucción o inhibición sobre diversos microorganismos patógenos vaginales

Se realizó la detección de actividad antibacteriana in vitro en el grupo de gel de nanoesferas de cloroquina-quitano (Grupo B: gel de nanoesferas de cloroquina-quitano, en donde la relación másica de fosfato de cloroquina a quitano fue 3: 1) en la Realización 6. Se añadieron 20 g de producto de gel a 100 mL de tampón de pH 7,0 (no se añadió control negativo con una muestra de prueba) para disolver completamente el producto de gel. Se añadieron 1 mL, 0,5 mL, 0,25 mL y 0,125 mL de tampones pH 7,0 añadidos con la muestra de ensayo en medios de cultivo correspondientes de bacterias correspondientes, y se cultivaron en una placa. *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* se reanimaron y se diluyeron, y cuando la concentración bacteriana era de 100 ufc/mL, se inoculó cada medio de cultivo con un bucle de inoculación, y se inició la observación después de cultivar durante de 5 días a 7 días.

Los resultados de detección de actividad antibacteriana in vitro mostraron que la nanoesfera de quitano-cloroquina con diferentes concentraciones podría inhibir el crecimiento de la *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* y cuanto mayor es la concentración, mayor será la tasa de inhibición de bacterias. Particularmente, *Candida albicans* y *Staphylococcus aureus* son más sensibles.

Los resultados mostraron que el gel de nanoesferas de cloroquina-quitano tenía un buen efecto de inhibición en diversas bacterias, pero diferentes sensibilidades.

Según la presente invención, la cloroquina y el quitano se aplicaron conjuntamente, lo que tenía un efecto de inhibición sinérgico sobre diversos microorganismos patógenos vaginales. El medicamento de la presente invención podría eliminar o inhibir diversos microorganismos patógenos vaginales, tales como *staphylococcus aureus* (SA), *Pseudomonas aeruginosa*, beta *Hemolytic streptococcus* (ST), *Candida albicans* (CA), *Ureaplasma urealyticum* (Uu), *Trichomonas vaginalis* y *Bacteroides fragilis*, y virus del herpes simple tipo 2 (HSV-2). Además, el medicamento de la presente invención podría inhibir la adhesión de un patógeno y una célula epitelial vaginal de un hospedador, y prevenir y tratar diversas vaginitis, tales como vaginitis por *Candida albicans*, vaginitis tricomoniasis, vaginosis bacteriana, virus del herpes genital y otras infecciones genitales externas.

Realización 10 - Resultados preliminares de investigación clínica

Se encontró, a partir de la aplicación de la nanoesfera de cloroquina-quitano de la presente invención a 10 mujeres que padecen vaginitis causada por infección por candida, que ningún paciente informó de un efecto secundario ni de ninguna reacción adversa en el procedimiento de tratamiento, y no se encontró ningún efecto secundario ni reacción adversa después de 6 meses de seguimiento, y la tasa eficaz total del grupo de tratamiento con nanoesferas de cloroquina-quitano se incrementó evidentemente en un 30 % en comparación con la del grupo de tratamiento solo con cloroquina.

La presente invención se aplicó al tratamiento de verrugas de 30 pacientes causadas por infección por VPH, y después de 2 semanas a 3 semanas de tratamiento, se encontró que las verrugas de los 30 pacientes se cayeron naturalmente sin ninguna reacción adversa.

La nanoesfera de cloroquina de la presente invención tiene buenos efectos terapéuticos sobre la infección de los genitales externos; incluyendo vaginitis viral, condiloma acuminado, vaginosis bacteriana, vaginitis infecciosa por hongos o vaginitis tricomoniasis, y otras verrugas cutáneas, incluyendo verrugas planas y verrugas en partes no genitales provocadas por infección por VPH.

REIVINDICACIONES

1. Un producto de gel que comprende nanoesferas de cloroquina, **caracterizado por que**, cada nanoesfera de cloroquina comprende un vehículo de nanoesferas soluble en agua, y cloroquina o un derivado de cloroquina, una relación de masa de la cloroquina o el derivado de cloroquina al vehículo de nanoesferas soluble en agua durante la preparación varía de 1:3 a 1:5; una tasa de carga de la cloroquina o del derivado de cloroquina en la nanoesfera de cloroquina preparada varía de 3,0 % a 21,6 %;
 5 el vehículo de nanoesferas soluble en agua es quitosano soluble en agua; un grado de desacetilación del quitosano soluble en agua varía del 80 % al 95 %, y un peso molecular promedio en viscosidad del mismo varía de 3000 a 5000; y
 10 el derivado de cloroquina se selecciona de uno o más de hidroxicloroquina, fosfato de cloroquina o sulfato de cloroquina.
2. El producto según la reivindicación 1, que puede obtenerse por un procedimiento de preparación de la nanoesfera de cloroquina que comprende las siguientes etapas:
 15 S1: después de disolver el vehículo de nanoesferas soluble en agua, añadir la cloroquina o el derivado de cloroquina, y mezclar y agitar uniformemente para formar una fase acuosa;
 20 S2: añadir un emulsionante en una matriz de fase oleosa para formar una fase oleosa; añadir la fase acuosa a la fase oleosa, en donde una relación de volumen de la fase acuosa a la fase oleosa es de 1: 1 a 1: 6; y emulsionar a 10000-20000 r/min durante 10-30 minutos para obtener una emulsión de nanoesferas y
 25 S3: añadir un precipitante a la emulsión de nanoesferas, después de mezclar uniformemente, dejar reposar durante 2-8 minutos, después deshidratar, realizar una centrifugación a alta velocidad y limpiar, y secar para obtener la nanoesfera de cloroquina en donde las condiciones para la centrifugación a alta velocidad consisten en centrifugar a 1500-2000 r/min durante 5 -10 minutos;
 30 la matriz de fase oleosa se selecciona de uno o más de aceite de maíz, aceite de oliva, aceite de cacahuete, aceite de soja o aceite de colza,
 el emulsionante se selecciona de uno o más de Tween-20, tween-80 o Span 80;
 el precipitante es una solución mezclada de hidróxido de sodio-n-propanol.
3. El producto según la reivindicación 2, **caracterizado por que** una relación de volumen del emulsionante al precipitante es (1 -1,5): (30 - 50).
4. El producto según la reivindicación 2, **caracterizado por que** un valor de pH del precipitante varía de 8,5 a 10,0.
5. Uso del producto según la reivindicación 1 o 2 en la preparación de un producto antibacteriano y/o antiviral.
6. El producto según la reivindicación 1 ó 2 para uso en la prevención y el tratamiento de infecciones de los genitales externos y/o verrugas planas.
7. El producto para uso según la reivindicación 6, **caracterizado por que** la infección de la genitalia externa comprende vaginitis viral, condiloma acuminado, vaginosis bacteriana, vaginitis infecciosa por hongos o vaginitis tricomoníasis.
8. El producto para uso según la reivindicación 6, **caracterizado por que** la nanoesfera de cloroquina representa del 1 % al 6 % de un peso total del producto.

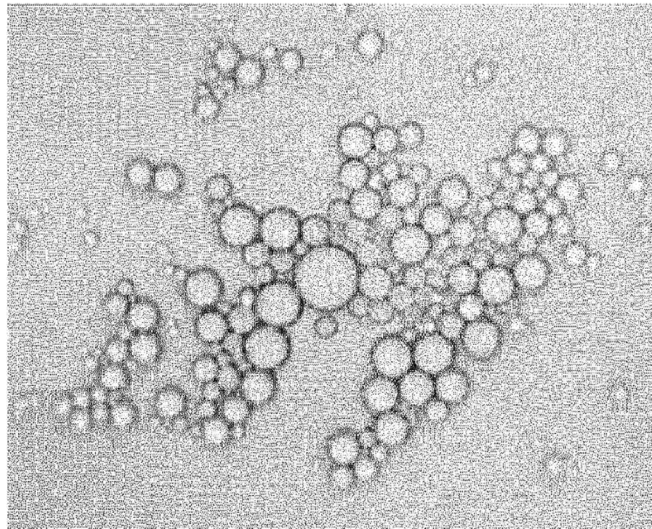


Figura 1

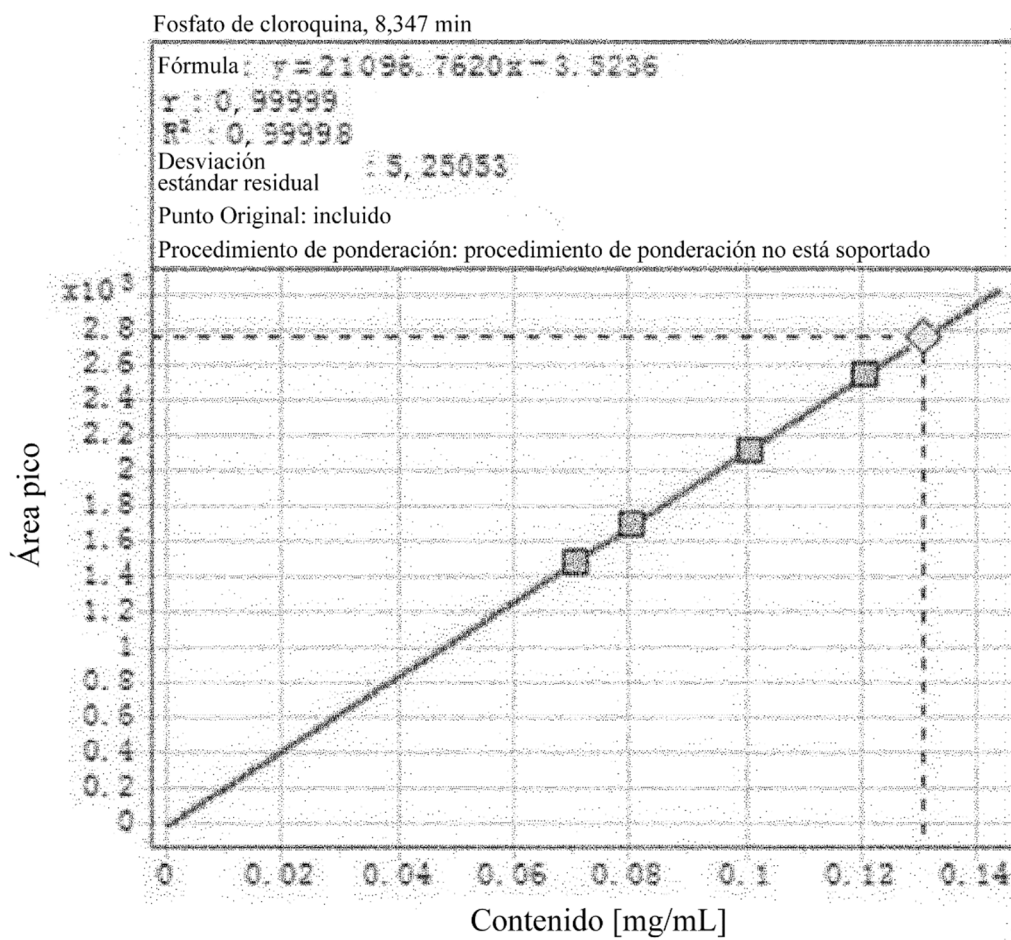


Figura 2

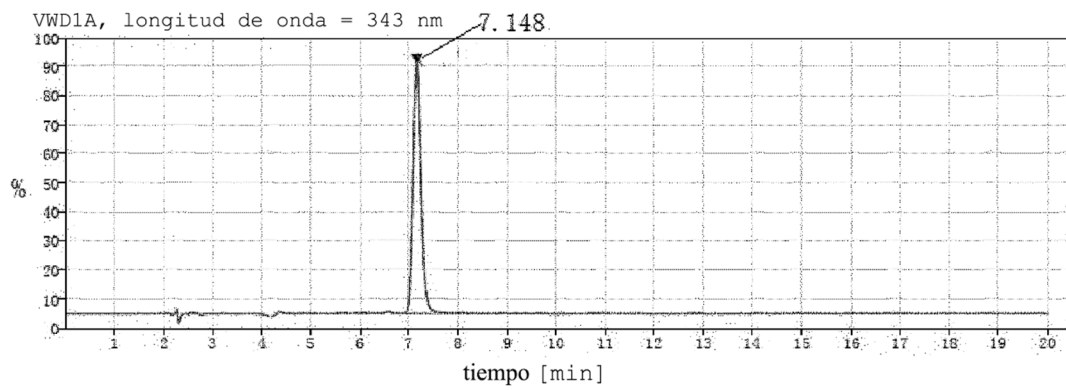


Figura 3

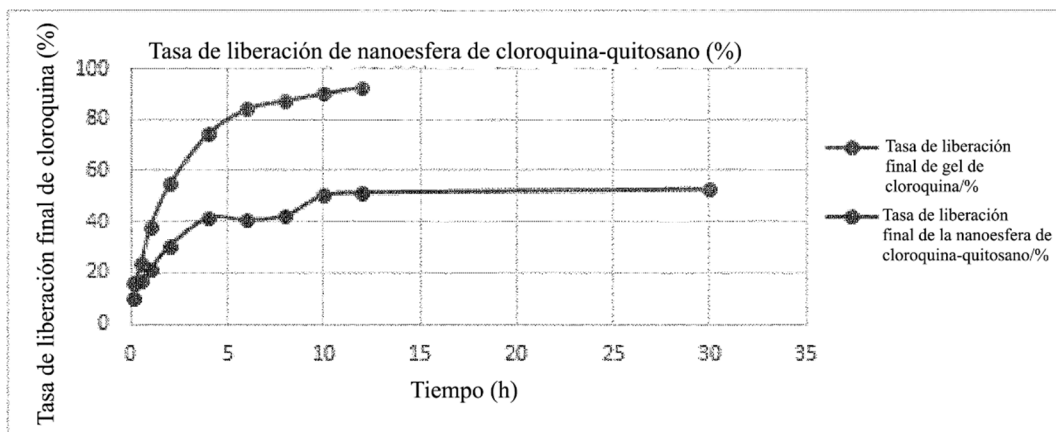


Figura 4

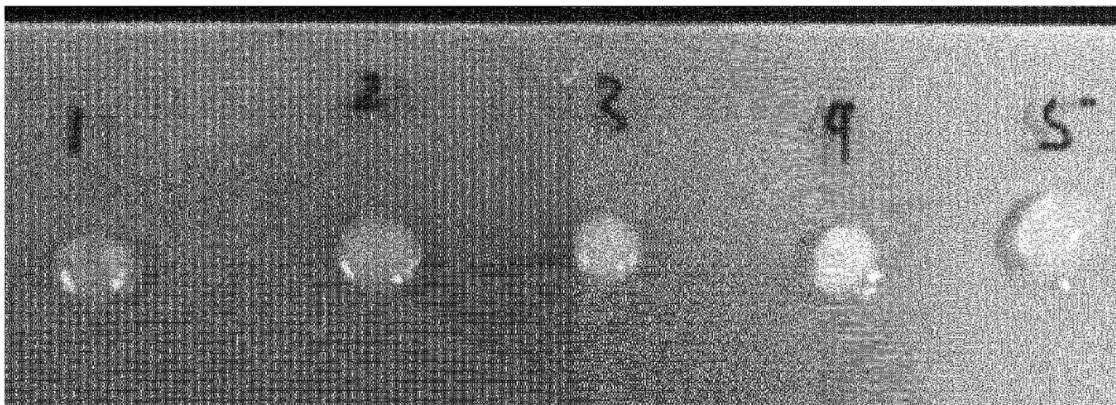


Figura 5

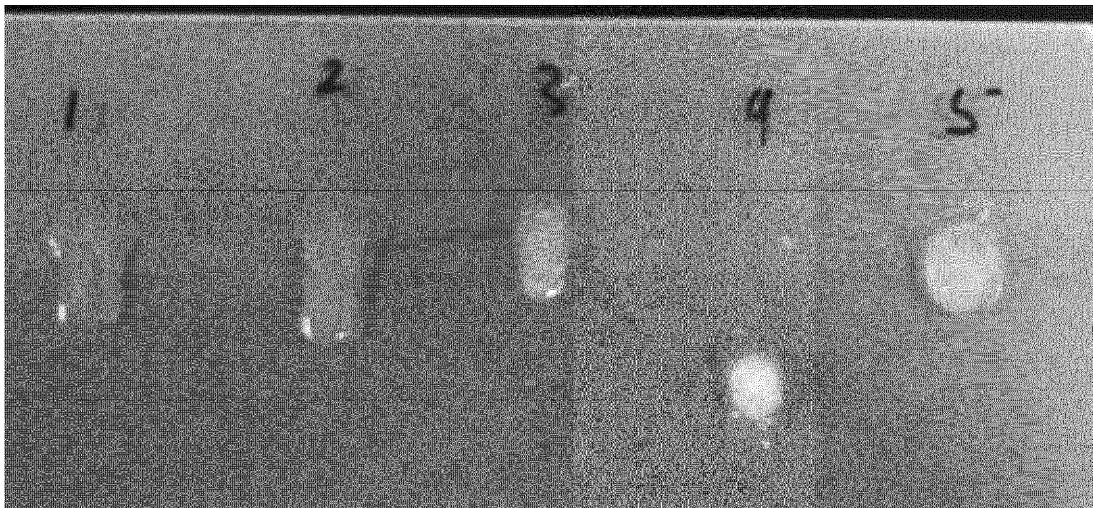


Figura 6

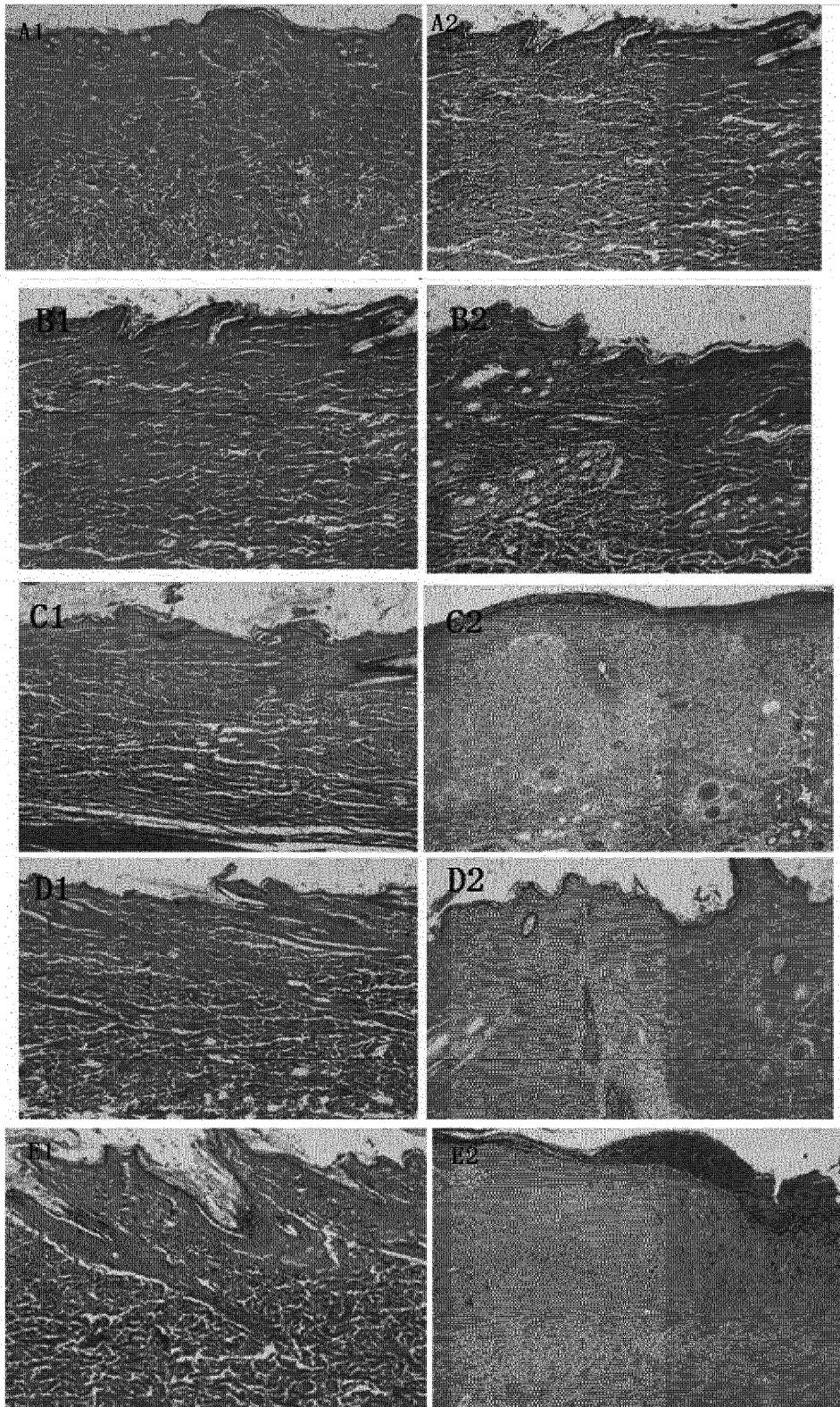


Figura 7

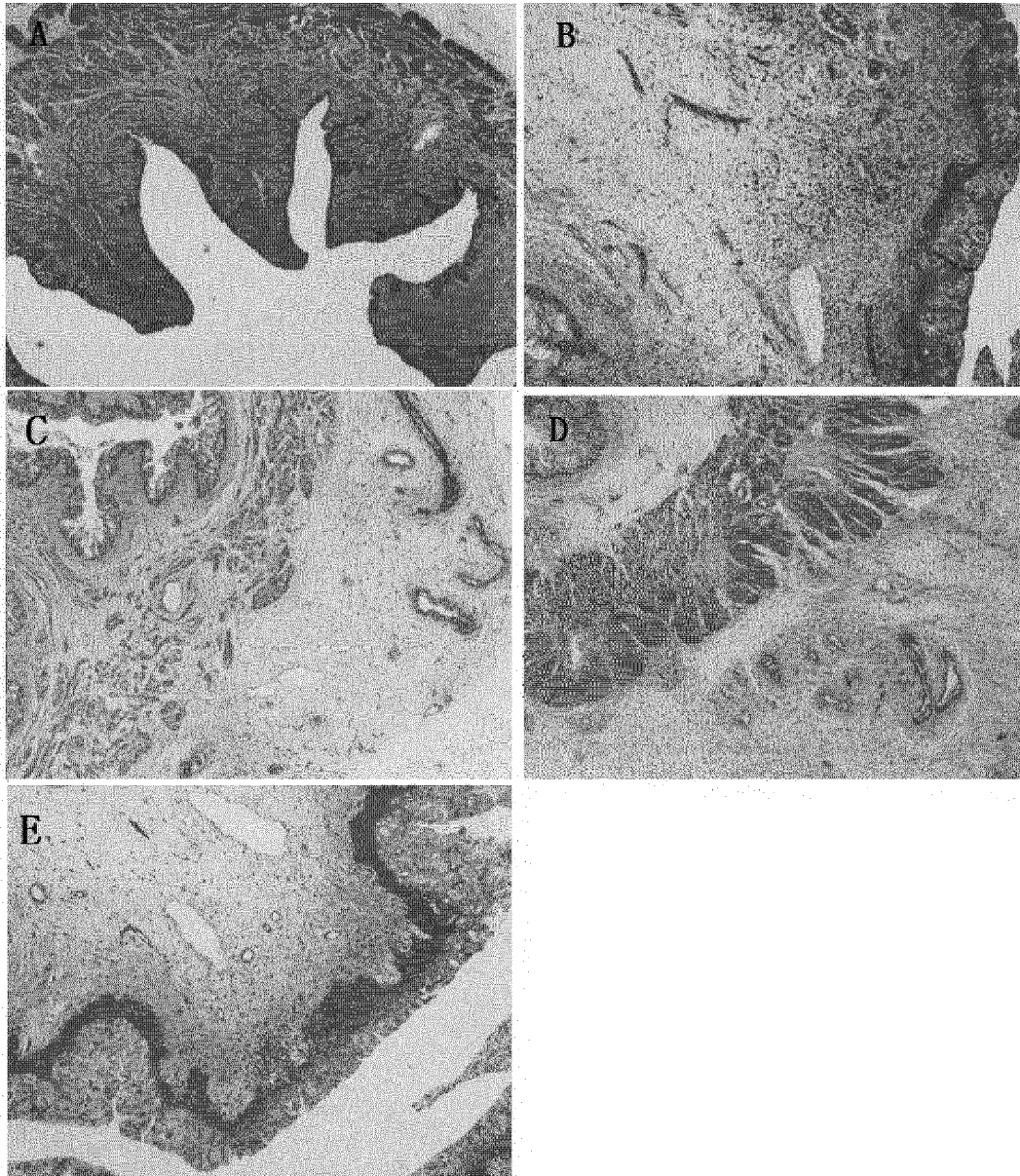


Figura 8

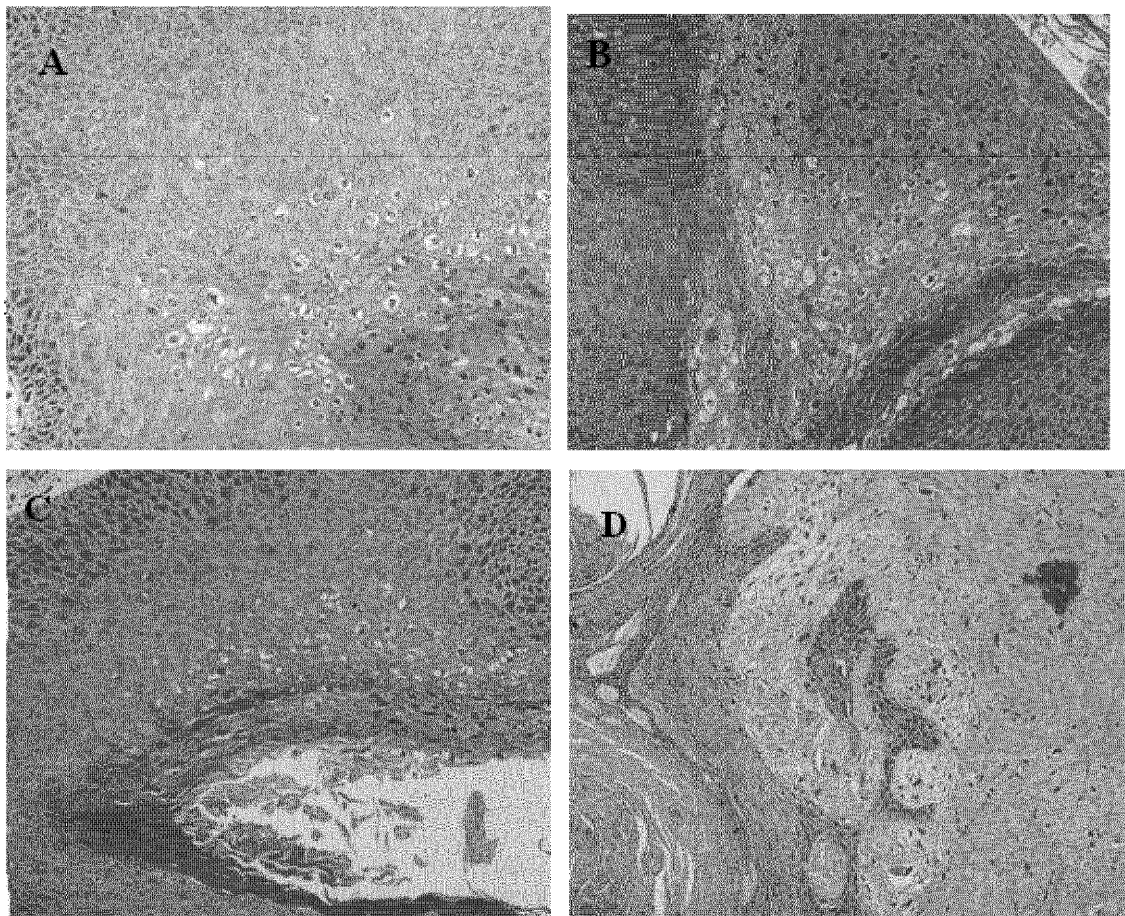


Figura 9