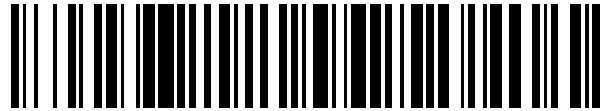


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 432 844**

51 Int. Cl.:

A61K 33/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.04.2007 E 07728058 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.09.2013 EP 2012805**

54 Título: **Composición terapéutica y uso**

30 Prioridad:

12.04.2006 GB 0607402

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.12.2013

73 Titular/es:

**BARTS AND THE LONDON NATIONAL HEALTH
SERVICE TRUST (50.0%)
R & D Office, Royal London Hospital, 4th Floor,
Alexander House Whitechapel
London E1 1BB, GB y
QUEEN MARY AND WESTFIELD COLLEGE
(50.0%)**

72 Inventor/es:

**ALLAKER, ROBERT;
HINDS, CHARLES y
TUCKER, ARTHUR TUDOR**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 432 844 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).

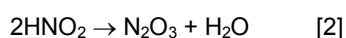
DESCRIPCIÓN

Composición terapéutica y uso

5 La presente invención se refiere al uso de formulaciones líquidas en la preparación de un medicamento para la prevención y el tratamiento de infecciones orales, gástricas y digestivas y, en particular, para la prevención de la neumonía asociada a la ventilación mecánica, así como composiciones líquidas de alimentación enteral por sonda. Las composiciones de alimentación son adecuadas para su uso en la prevención de la neumonía asociada a la ventilación mecánica.

10 El óxido nítrico se forma de manera natural en el estómago a partir de una reacción del nitrito en la saliva en combinación con el ácido del estómago.

15 Se cree que la producción de NO a partir de nitrito se produce a través del siguiente mecanismo:



Se cree que el ácido gástrico del estómago puede no ser suficiente para destruir los microorganismos y, por lo tanto, que la producción de NO en el estómago puede ayudar a la destrucción de estos microorganismos (McKnight *et al.*, "Chemical synthesis of nitric oxide in the stomach from dietary nitrate in humans". Gut 1997; 40 (2):211-4).

25 Ha habido un gran interés en los últimos años por las aplicaciones farmacéuticas del óxido nítrico [NO] y los precursores de óxido nítrico. Se ha demostrado que el óxido nítrico posee propiedades antimicrobianas, revisadas por F. C. Fang (1997) (*J. Clin. Invest.* 99 (12) 2818-2825 (1997)).

30 En el documento WO03/032928, se ha encontrado que es posible formular soluciones con una cantidad clínicamente eficaz de óxido nítrico disuelta o dispersada en las mismas. Posteriormente, estas soluciones se nebulizan para su pulverización en los pulmones con el fin de tratar ciertas enfermedades respiratorias.

35 Hay una serie de otras divulgaciones que también se ocupan del suministro artificial del óxido nítrico.

El documento WO 95/22335 (Benjamin y Dougal) divulga una forma de dosificación para el tratamiento de afecciones bacterianas, virales o micóticas que comprende un agente acidificante farmacéuticamente aceptable, una fuente farmacéuticamente aceptable de iones nitrito o un precursor de nitrato para los anteriores, y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable, donde el agente acidificante está adaptado a reducir el pH del ambiente de uso hasta por debajo de pH 4. Preferentemente, el agente acidificante es un ácido orgánico, por ejemplo, ácido salicílico o ácido ascórbico. El precursor para el ión nitrito puede ser un metal alcalino o metal alcalinotérreo capaz de convertir un nitrato mediante acción enzimática. En una forma particularmente preferida de la invención, el agente acidificante y la fuente de iones nitrito o el precursor de los anteriores, se disponen por separado en dicha crema o pomada para la mezcla con el fin de liberar los iones nitrito en el ambiente de uso. Como alternativa, se puede presentar una composición ácida para la administración en forma de comprimido o líquido.

50 El documento US-A-5648101 (Tawashi) divulga un método para administrar NO gaseoso en una zona deseada o en el cuerpo de un animal sensible, por ejemplo, seres humanos, que comprende combinar y hacer reaccionar una sal reductora soluble, preferentemente sulfato ferroso, y un nitrito, preferentemente nitrito de sodio en presencia de humedad *in situ* en o adyacente a dicha zona. Los medios para dicha administración incluyen composiciones tales como comprimidos, cápsulas, pomadas, cremas, lociones y pulverizados que contienen mezclas de partículas o gránulos de los dos reactivos, parches transdérmicos y bombas osmóticas para la combinación de soluciones de reactivo o reactivos *in situ*.

55 Wink *et al.*, "The role of nitric oxide chemistry in cancer treatment," (*Biochemistry* (Moscú) 802-809; 63 (7): 1998) divulgan el efecto del óxido nítrico sobre tumores de mamíferos. Las divulgaciones actuales en el campo del tratamiento del cáncer se refieren a la producción endógena de óxido nítrico. Los intentos por aumentar la disponibilidad local se han limitado a intervenciones no directas tales como la dosificación con precursores de óxido nítrico (L-arginina) y las maniobras para aumentar la semivida/biodisponibilidad del óxido nítrico endógeno mediante la modulación temporal de las rutas de degradación.

60 En los documentos WO-A-99/02148, WO-A-95/09612 y *Chemical Abstracts*; 127:130755, B. H. Cuthbetson *et al.*, *British Journal of Anaesthesia*, (1977), 78(6), 714-717, se divulgan otros métodos clínicos que implican el uso de precursores de NO.

65

También se conoce el uso tópico del óxido nítrico gaseoso y los precursores de óxido nítrico como antimicrobianos. El documento WO-A-01/53193 divulga el uso de nitrito acidificado para producir óxido nítrico por vía tópica en la superficie de la piel. El tratamiento es útil para tratar la isquemia y las afecciones relacionadas.

- 5 En la aplicación tópica en la piel de nitrito a concentraciones de hasta el 20 % en una crema o pomada portadora inerte, el nitrito, cuando se mezcla con un ácido orgánico tal como ácido ascórbico (vitamina C), reacciona produciendo óxidos de nitrógeno que provocan la liberación de óxidos nítricos que conducen a una vasodilatación sostenida de los vasos sanguíneos microcirculatorios, sin provocar una inflamación significativa.
- 10 En los siguientes artículos de revistas, se proporcionan comentarios útiles sobre el uso del NO en terapia, *Chemical Abstracts*, 134:216558, W. E. Hurford *et al.*, "Nitric Oxide", (2000), 931-945; *Chemical Abstracts*; 128:21192, M. Andresen *et al.*, *Revista Medica de Chile*, (1997), 125 (8) 934-938; *Chemical Abstracts*; 124:44545, M. Beghetti *et al.*, "Expert Opinion on Investigational Drugs", (1995), 4 (10) 985-995.
- 15 La neumonía asociada a la ventilación mecánica (NAVVM) es una infección nosocomial que se produce en pacientes que han sido ventilados mecánicamente durante más de 48 horas (Young *et al.* 1999). El inicio temprano de la NAVVM se produce entre las 48 y 72 horas posteriores al inicio de la ventilación mecánica, y se cree que se produce como consecuencia de la aspiración durante el proceso de intubación traqueal. El desarrollo de la NAVVM más allá de este periodo de tiempo se considera que es de aparición tardía. La incidencia publicada de la NAVVM varía del
- 20 aproximadamente 10 % a más del 30 %, dependiendo de la mezcla de casos y de los criterios de diagnóstico. La NAVVM es la infección más frecuente en las unidades de cuidados intensivos europeas y representa casi la mitad de todas las infecciones adquiridas en la UCI. El desarrollo de la NAVVM prolonga los cuidados intensivos y la estancia hospitalaria, aumentando los costes. En pacientes con síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA), por ejemplo, la aparición de la NAVVM fue responsable de un aumento de casi tres veces en la duración de la ventilación
- 25 mecánica (Markowicz *et al.*, 2000). Aunque es controvertido, muchos creen que el desarrollo de NAVVM también aumenta de forma independiente la mortalidad (la mortalidad directamente atribuible a la NAVVM se ha estimado en aproximadamente el 27 %). Por lo tanto, se requieren urgentemente nuevas intervenciones para reducir la considerable morbilidad y mortalidad asociadas con la NAVVM, así como para reducir los costes, particularmente en vista de la creciente resistencia de las bacterias patógenas al tratamiento antimicrobiano tradicional (Bonten *et al.*
- 30 "Bird's eye view of nosocomial infections in medical ICU: blue bugs, fungi, and device days". *Crit Care Med* 1999, 27: 853-854; Bonten: "Prevention of the infection in the Intensive Care Unit". *Current Opinion in Critical Care*, 2004,10:364-368; Richards M. J., Edwards J. R., Culver D. H., *et al.*: "Nosocomial infections in medical intensive care units in the United States". Sistema de vigilancia epidemiológica de las infecciones nosocomiales de EE.UU. *Crit Care Med* 1999, 27:887-892).
- 35 El desarrollo de la NAVVM de inicio tardío normalmente se produce como consecuencia de la aspiración de secreciones infectadas procedentes del tracto aerodigestivo en la vía respiratoria distal. Mientras que en los individuos sanos, la orofaringe es colonizada por bacterias no patógenas y el estómago es estéril, durante la enfermedad crítica, el estómago, la orofaringe, las zonas periodontales y los senos paranasales son colonizados por
- 40 organismos patógenos, incluyendo bacterias aeróbicas gram negativas, *Staphylococcus* spp. y *Pseudomonas* spp. Posteriormente, las secreciones infectadas mezcladas en la orofaringe y la abertura laríngea se fugan del manguito del tubo endotraqueal y se dispersan distalmente. Se cree que la presencia casi invariable de una sonda nasogástrica predispone a los pacientes a tener reflujo gástrico y aumenta la posibilidad de que se produzca una aspiración. Además, el lumen interior del tubo endotraqueal desarrolla rápidamente una capa adhesiva y viscosa de
- 45 acumulaciones que contiene organismos patógenos ('biopelícula'), cuyas partículas se pueden desplazar y propulsar más profundamente en los pulmones. Por otro lado, se cree que la inoculación directa desde el aparato respiratorio contaminado o el circuito de ventilación es una causa poco frecuente de NAVVM. La vulnerabilidad de los pacientes ventilados mecánicamente al desarrollo de neumonía nosocomial aumenta aún más cuando sus mecanismos de defensa se ven comprometidos, incluyendo la alteración de la tos y la disminución en el aclaramiento mucociliar. La
- 50 lesión de la mucosa a nivel del manguito y la punta del tubo endotraqueal (quizás agravada por la aspiración de la bilis y el jugo gástrico) y el daño de la mucosa por los catéteres de succión dejan al descubierto la membrana basal, facilitando de ese modo la adhesión y la colonización bacteriana. Finalmente, el daño alveolar y la pérdida de surfactante deterioran aún más las defensas pulmonares.
- 55 McMullin *et al.*, "The Antimicrobial Effect of Nitric Oxide on the Bacteria That cause Nosocomial Pneumonia in Mechanically Ventilated Patients in the Intensive Care Unit", (noviembre de 2005) *Respiratory Care* Vol. 50, Nº 11, p. 1451-1456 divulgan que 200 ppm de NO gaseoso actúan como un agonista antimicrobiano contra diversas cepas de bacterias encontradas en la neumonía nosocomial.
- 60 Por consiguiente, sería ventajoso que se pudiera encontrar un nuevo método para prevenir el desarrollo de la NAVVM. En un primer aspecto de la presente invención, se proporciona una formulación líquida que comprende una cantidad clínicamente eficaz de óxidos de nitrógeno disueltos y/o dispersados en la misma para su uso en la prevención de la neumonía asociada con la ventilación mecánica, donde la formulación líquida contiene de 10 a 40.000 partes por mil millones de óxidos de nitrógeno.
- 65

- Se ha encontrado que, en los pacientes ventilados mecánicamente, hay una gran reducción en la producción de óxido nítrico gástrico. Sin el deseo de quedar vinculados a la teoría, se considera que esta reducción en la producción del óxido nítrico gástrico permite un aumento de la colonización bacteriana del contenido del estómago. Esto predispone al paciente a padecer NAVM, especialmente cuando se combina con la alcalinización de las secreciones gástricas por antagonistas de los receptores H2.
- Lo que se ha descubierto ahora es que una formulación líquida que comprende óxidos de nitrógeno disueltos y/o dispersados en la misma es útil en la prevención de la propagación de las bacterias hacia los pulmones.
- La mayoría de los pacientes con ventilación mecánica se alimentan mediante una sonda enteral. Por lo tanto, un método adecuado para suministrar la formulación líquida que contiene óxidos de nitrógeno en el estómago es a través de una sonda enteral. Así pues, un método preferido para suministrar los óxidos de nitrógeno en el estómago es el uso de una composición de alimentación líquida que comprenda los óxidos de nitrógeno.
- En un segundo aspecto de la presente invención, se proporciona una composición líquida de alimentación enteral por sonda que comprende tanto una cantidad clínicamente eficaz de óxidos de nitrógeno disueltos y/o dispersados en la misma como al menos un nutriente.
- La composición de alimentación permite suministrar directamente los óxidos de nitrógeno en el estómago. Además, la composición de alimentación también puede prevenir la formación microbiana (bacteriana, micótica, protozoaria y viral) en el interior de la sonda enteral. Dicha formación de colonias se puede producir fácilmente, porque el alimento líquido de nutrientes proporciona un entorno particularmente bueno para el crecimiento de dichas bacterias.
- La solución que contiene nutrientes tiene preferentemente un contenido calórico variable, proteínas, glucosa, grasa, agua, electrolitos, oligoelementos y vitaminas, pero puede variar de acuerdo con la indicación clínica. La alimentación enteral se pueden clasificar en tres categorías: dietas químicamente definidas, dietas formuladas específicamente y dietas poliméricas convencionales. Las dietas químicamente definidas o elementales contienen nutrientes que requieren una digestión escasa o nula, y por lo tanto, se absorben fácilmente. Las dietas formuladas especialmente son las destinadas a resolver un problema de digestión específico tal como la intolerancia a la lactosa. La dieta polimérica convencional tiene proteína entera en lugar de aminoácidos como fuente de nitrógeno, y es apropiada cuando la función gastrointestinal es normal o casi normal. Los preparados adecuados para la alimentación por sonda son generalmente de tres tipos: la comida normal que se ha puesto a través de un mezclador y se ha tamizado, las preparaciones en polvo reconstituidas que requieren la adición de agua o leche y los productos listos para consumir. Se prefiere particularmente que la alimentación de nutrientes sea una composición líquida de alimentación enteral disponible en el mercado tal como la que se comercializa con el nombre comercial Osmolite®.
- Las formulaciones líquidas de la presente invención y, en particular, la composición de alimentación pueden comprender además otros componentes. Mediante la adición de estos componentes, se pueden aumentar la adherencia, la duración del contacto y la amplitud de la acción biológica deseada de las formulaciones líquidas. Los componentes adicionales preferidos incluyen agentes espumantes (tales como jabón y detergentes) para reducir la acumulación del sistema de descarga *in situ*. Otros componentes adicionales preferidos incluyen agentes gelificantes (por aumentar la viscosidad), espesantes (para aumentar el tamaño de las gotitas), extendedores (para mejorar incluso el recubrimiento de una superficie diana), estabilizadores y tampones (para mantener la integridad del sistema y mejorar la combinación eficaz con otros agentes) y tensioactivos (para aumentar la humectabilidad de una superficie diana).
- Los óxidos de nitrógeno pueden estar presentes en las formulaciones líquidas de acuerdo con la invención en una solución propiamente dicha y/o en forma de una dispersión o suspensión (por ejemplo, en suspensión coloidal). La totalidad de dichos tipos de formulaciones se denominan "soluciones" en la presente memoria.
- Los óxidos de nitrógeno que están presentes comprenden óxido nítrico. Sin embargo, también pueden estar presentes otros óxidos de nitrógeno en la mezcla. Habitualmente, hay presente una variedad de óxidos de nitrógeno.
- En dichas formulaciones líquidas, las composiciones eficaces contendrán, por lo general, concentraciones de NO dispersado y/o disuelto en el intervalo de 10 a 40.000 ppb (partes por mil millones) en peso, preferentemente de 100 a 10.000 ppb, y más preferentemente de 1.000 a 10.000 ppb.
- Las formulaciones líquidas empleadas de acuerdo con la presente invención se pueden preparar mediante el uso de un agente acidificante farmacológicamente aceptable, junto con una fuente farmacológicamente aceptable de iones nitrito o un precursor de nitrito.
- Se prefiere que el óxido nítrico esté disuelto o suspendido en un líquido, bien mediante el paso de NO gaseoso a través de un líquido o mediante la generación de NO *en situ* en el líquido.

Se prefiere generar el NO en el líquido *in situ* mediante la reacción de al menos un nitrito y al menos un ácido. Por ejemplo, el NO se puede producir en solución acuosa mediante la reacción de nitrito 0,5 molar con ácido cítrico 0,5 molar, lo que resulta en una concentración de NO dispersado o disuelto en la formulación líquida, tras la evolución de gas, del orden de 1.500 ppb (1,5 ppm). Además, la formulación líquida resultante se mantiene estable durante un lapso de tiempo requerido para su uso destinado a prevenir la neumonía asociada a la ventilación mecánica (por ejemplo, durante periodos de más de una hora).

Un método preferido de generación de NO es la reacción de NaNO₂ y KNO₂ con ácido ascórbico. Se prefiere particularmente el uso de cantidades equimolares de NaNO₂ y KNO₂. En una realización favorable, el NO se genera mediante una reacción de un volumen de NaNO₂ 1 M y un volumen igual de KNO₂ 1 M con dos veces el volumen de ácido ascórbico 1 M.

El pH de la formulación líquida resultante se puede manipular mediante la valoración del agente de acidificación y/o el posterior tampón químico mediante técnicas convencionales para crear una formulación farmacéuticamente aceptable.

El agente acidificante puede incluir cualquier ácido orgánico adecuado, tal como ácido ascórbico (vitamina C), ácido salicílico, ácido acetil-salicílico, ácido acético, o una sal o un derivado de los mismos, generalmente a una concentración de hasta el 20 % p/v, preferentemente del 0,25 al 10 % p/v, más preferentemente del 4 al 6 % p/v. Una concentración particularmente preferida es la del 4 % o 5 % p/v. Otros agentes acidificantes incluyen, pero sin limitación, sales de amonio o aluminio, fenol y ácido benzoico. Los ácidos inorgánicos tales como el ácido clorhídrico se pueden usar si se diluyen suficientemente y/o se tamponan apropiadamente. El agente acidificante puede estar presente en forma de sal disuelta o en una forma líquida.

La fuente farmacológicamente aceptable de iones nitrito puede ser un nitrito de metal alcalino o un nitrito de metal alcalinotérreo, por ejemplo, LiNO₂, NaNO₂, KNO₂, RbNO₂, CsNO₂, FrNO₂, Be(NO₂)₂, Mg(NO₂)₂, Ca(NO₂)₂, Sr(NO₂)₂, Ba(NO₂)₂ o Ra(NO₂)₂. Como alternativa, se puede usar un precursor de nitrito como fuente de iones nitrito en la composición tal como, por ejemplo, una solución diluida de ácido nítrico. Otras fuentes de iones nitrito son iones nitrato derivados de sales de metales alcalinos o sales de metales alcalinotérreos capaces de realizar la conversión enzimática en nitrito. Por ejemplo, LiNO₃, NaNO₃, KNO₃, RbNO₃, CsNO₃, FrNO₃, Be(NOS)₂, Mg(NO₃)₂, Ca(NO₃)₂, Sr(NO₃)₂, Ba(NO₃)₂ o Ra(NO₃)₂. La concentración de la fuente de iones nitrato antes de la acidificación puede ser de hasta el 20 % p/v, adecuadamente del 0,25 al 10 %, preferentemente del 4 al 6 %. Una concentración particularmente preferida es la del 4 % o 5 % p/v.

La formulación líquida empleada de acuerdo con la invención está preferentemente saturada con óxido nítrico en solución.

Las características descritas en relación con un aspecto de la invención también se pueden usar en conexión con otros aspectos de la invención.

A continuación, se describirán más detalladamente las realizaciones preferidas de la invención con referencia a las figuras, en las que:

la figura 1 muestra placas de agar que contienen *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina tratadas con:

- A – ácido ascórbico
- B – ácido ascórbico previamente mezclado, NaNO₂ y KNO₂
- C - NaNO₂ seguido de ácido ascórbico y
- D - KNO₂ seguido de ácido ascórbico;

la figura 2 muestra placas de agar que contienen *Candida albicans* tratadas con:

- A – ácido ascórbico
- B – ácido ascórbico previamente mezclado, NaNO₂ y KNO₂
- C - NaNO₂ seguido de ácido ascórbico y
- D - KNO₂ seguido de ácido ascórbico;

la figura 3 muestra placas de agar que contienen *Pseudomonas aeruginosa* tratadas con:

- A – ácido ascórbico
- B – ácido ascórbico previamente mezclado, NaNO₂ y KNO₂
- C - NaNO₂ seguido de ácido ascórbico y
- D - KNO₂ seguido de ácido ascórbico;

la figura 4 muestra placas de agar que contienen estafilococos coagulasa negativos tratadas con:

- A – ácido ascórbico
- B – ácido ascórbico previamente mezclado, NaNO_2 y KNO_2
- C - NaNO_2 seguido de ácido ascórbico y
- D - KNO_2 seguido de ácido ascórbico;

la figura 5 muestra una placa de agar que contiene *Staphylococcus aureus* resistente a la metilina tratada con gas de óxido nítrico:

la Figura 6 muestra el efecto de una mezcla que contiene óxido de nitrógeno en una serie de diferentes cepas de bacterias;

la Figura 7 muestra el efecto de una mezcla de óxidos de nitrógeno en Osmolite® en *Pseudomonas aeruginosa*;

la Figura 8 muestra el efecto de una mezcla de óxidos de nitrógeno en Osmolite® en estafilococos coagulasa negativos;

la Figura 9 muestra el efecto de una mezcla de óxidos de nitrógeno en Osmolite® en *Candida albicans*;

la Figura 10 muestra el efecto de una mezcla de óxidos de nitrógeno en Osmolite® en *Escherichia coli*; y

la Figura 11 muestra el efecto de una mezcla de óxidos de nitrógeno en Osmolite® en *Staphylococcus aureus* resistente a la metilina;

la Figura 12 muestra el efecto sobre el pH de la adición gradual de ácido a nitrito.

la Figura 13 muestra el efecto sobre el pH de la adición de una vez de ácido a nitrito.

la figura 14 muestra una serie de espectros de Raman tras la adición de ácido a nitrito.

la Figura 15 muestra las propiedades bacteriostáticas y bactericidas de una mezcla de óxidos de nitrógeno en diversas bacterias.

Ejemplos

Se preparó una serie de ejemplos para analizar la eficacia de las soluciones que contienen óxidos de nitrógeno en la destrucción de bacterias.

Ejemplo 1 a 4

Se preparó una solución generadora de "óxidos de nitrógeno" previamente mezclada mediante la acidificación de nitrito de sodio (NaNO_2) y nitrito de potasio (KNO_2) con ácido ascórbico. Se preparó una solución 1 M de nitrito de sodio disolviendo 6,9 g de NaNO_2 en 100 ml de agua destilada. Se preparó una solución 1 M de nitrito de potasio diluyendo 8,51 g de KNO_2 en 100 ml de agua destilada. Se diluyeron 17,612 g de ácido ascórbico en 100 ml de agua destilada para formar una solución 1 M. Las tres soluciones madre se prepararon unos minutos antes de los experimentos.

Se mezclaron un volumen de NaNO_2 y un volumen igual de KNO_2 con dos veces el volumen de ácido ascórbico en un recipiente estéril, produciéndose una solución que contenía "óxidos de nitrógeno". Instantáneamente, se produjo una reacción entre los nitritos y el ácido. Se liberó el gas producido y se añadieron 2 ml del líquido mezclado previamente (0,25 M) a 20 ml de agua destilada, dando una concentración final de la solución de 1,25 mM.

También se prepararon muestras separadas de NaNO_2 , KNO_2 y ácido ascórbico como se ha descrito anteriormente.

Se midió el efecto antibacteriano de:

- A) ácido ascórbico solo,
- B) la solución generadora de "óxidos de nitrógeno" previamente mezclada,
- C) una combinación de NaNO_2 y ácido ascórbico añadidos por separado, y
- D) una combinación de KNO_2 y ácido ascórbico añadidos por separado

analizando en el:

Ejemplo 1: *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM),
 Ejemplo 2: *Candida albicans* (CA)
 Ejemplo 3: *Pseudomonas aeruginosa* (PS) y
 Ejemplo 4: estafilococos coagulasa negativos (ECN).

5 Se preparó un cultivo de una noche de bacterias mediante la inoculación de 20 ml de caldo LB (Luria-Bertani, 10 g de Bacto-triptona + 5 g de extracto de Bacto-levadura + 10 g de cloruro de sodio por litro, a pH 7,5) con 2 a 3 colonias, y la incubación a 37 °C durante una noche. Se produjeron cultivos de caldo que contenían aproximadamente 109 organismos. Se diluyeron las bacterias 1:1.000 usando solución salina de tampón fosfato (PBS), y se sembraron 100 µl de cultivos de caldo diluido en las placas de agar de cerebro y corazón. Antes de la siembra de las bacterias sobre la superficie de las placas de agar, se retiró un parte de agar (aproximadamente 10 70 mm de diámetro) del centro de las placas.

15 En A), para analizar la potencia bactericida del ácido ascórbico 0,25 M, se diluyeron además 50 ml de solución madre (1 M). Se añadieron 280 µl de ácido ascórbico 0,25 M al círculo hueco de las placas de agar sembradas con las bacterias. En B), se añadieron 280 µl de la solución generadora de "óxido de nitrógeno" (concentración final 0,25 M) a los círculos huecos de las placas de agar. En C) y D), se analizó el efecto antibacteriano del NO gaseoso mediante la adición de productos químicos por separado en lugar de mezclar previamente las soluciones. En C), se añadieron 140 µl de NaNO₂ (0,5 M) a las placas de agar, seguidos de 140 µl de ácido ascórbico (0,5 M). Se produjo 20 la reacción, se taparon las placas de agar de inmediato. Se repitió el mismo procedimiento en D) usando KNO₂ y ácido ascórbico.

25 Los resultados se muestran en las Figuras 1 a 4. Se puede observar que para cada uno de los Ejemplos 1 a 4, hay una gran cantidad de bacterias cuando solo se usa ácido ascórbico en A). Sin embargo, en B, C y D, se ha destruido la mayor parte de las colonias bacterianas.

Ejemplo 5

30 Se produjo un cultivo de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM) de la misma manera que para los Ejemplos 1 a 4. Se colocó la placa de agar en una caja de poliestireno. Se produjo NO gaseoso mediante la reacción de 10 ml de ácido ascórbico 1 M con 5 ml de NaNO₂ 1 M y 5 ml de KNO₂ 1 M en la caja, y se volvió a colocar la tapa de la caja inmediatamente, tras lo que se incubó el cultivo durante una noche.

35 Los resultados se muestran en la Figura 5. Como se puede ver, no quedan cultivos bacterianos visibles.

Ejemplos 6 a 10

40 Se analizó el efecto bactericida de la solución generadora de óxidos de nitrógeno en condiciones que simulaban el estómago. La Figura 6 muestra que la exposición de las bacterias a la solución generadora de óxidos de nitrógeno durante 1 hora dio lugar a una destrucción media del 97 % en cinco bacterias diferentes analizadas, en concreto, *Pseudomonas aeruginosa*, estafilococos coagulasa negativos, *Candida albicans*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. El diseño experimental fue idéntico al descrito en los Ejemplos 1 a 4.

Ejemplos de 11 a 15

45 Se usó la solución generadora de óxidos de nitrógeno usada en los Ejemplos 1 a 4 para analizar su actividad antimicrobiana en el producto de alimentación enteral disponible en el mercado Osmolite® usado para la nutrición de pacientes de la UCI. Se analizó el efecto de la mezcla sobre *Pseudomonas aeruginosa* (PS), estafilococos coagulasa negativos (ECN), *Escherichia coli* (*E. coli*), *Candida albicans* y *Staphylococcus aureus* resistente a la 50 meticilina.

55 Se prepararon cultivos de bacterias de una noche mediante la inoculación de 20 ml de caldo LB (Luria-Bertani, 10 g de Bacto-triptona + 5 g de extracto de Bacto-levadura + 10 g de cloruro de sodio por litro, a pH 7,5) con 2-3 colonias, y la incubación a 37 °C durante una noche. Se produjeron cultivos de caldo que contenían aproximadamente 109 organismos. Se diluyeron las bacterias 1:1.000 en solución salina de tampón fosfato (PBS), y se sembraron 100 µl de cultivos de caldo diluido en 20 ml del producto de alimentación enteral disponible en el mercado Osmolite® usado en la UCI para la nutrición de los pacientes.

60 Se añadieron 2 ml de la solución generadora de óxidos de nitrógeno previamente mezclada a 20 ml del Osmolite® que contenía bacterias, dando una concentración final de la solución de 1,25 mM. Se usó el mismo volumen de agua estéril como control. Se realizó la incubación de 20 ml de alimento contaminado que contenía 2 ml de mezcla generadora de óxidos de nitrógeno o agua estéril durante 1 h a 37 °C. Tras la incubación de 1 h, se colocaron las muestras de alimento (100 µl) en placas de agar con sangre y se esparcieron un esparcidor estéril. Se incubaron las placas durante 20 h a 37 °C. Se contó el número de colonias y se expresaron los datos como un porcentaje de 65 destrucción o simplemente como la comparación del número de colonias visibles en el grupo tratado y en grupo

control.

Los resultados se muestran en las Figuras 7 a 11. La Figura 7 muestra el efecto sobre *Pseudomonas aeruginosa*, la Figura 8 muestra el efecto sobre estafilococos coagulasa negativos (ECN), la Figura 9 muestra el efecto sobre *Candida Albicans*, la Figura 10 muestra el efecto sobre *Escherichia Coli* (*E. Coli*) y la Figura 11 muestra el efecto sobre *Staphylococcus aureus* resistente a la metilina (SARM).

Los resultados demuestran claramente que la mezcla que contiene óxido de nitrógeno destruye la mayor parte de las colonias bacterianas.

Los resultados muestran que las soluciones que contienen óxido de nitrógeno se pueden usar de manera segura para la higiene orofaríngea de los pacientes.

También se ha descubierto que, cuando no se mezclan previamente el nitrito y el ácido, el nitrito puede reaccionar con el alimento, produciendo un precipitado. Por ejemplo, el nitrito, seguido de la adición de ácido ascórbico produce la precipitación significativa de las proteínas, lo que aumenta la viscosidad del alimento. Por esta razón, para producir la solución generadora de óxido de nitrógeno, se deben mezclar los componentes previamente. El aumento de la viscosidad del alimento aumentará sustancialmente los riesgos conocidos de obstrucción del catéter.

Por lo tanto, la producción de nitrito acidificado mediante la adición de productos químicos por separado no es una formulación de elección en términos de desarrollo y prevención de un posible tratamiento. Por otra parte, a menos que se use la solución generadora de NO/NOx previamente mezclada, los pacientes ya vulnerables sometidos a ventilación mecánica, que normalmente reciben inhibidores de H2, podrían ser expuestos a un mayor riesgo de desarrollar una úlcera gástrica.

Otro beneficio de la solución de generación de óxidos de nitrógeno previamente mezclada es que el efecto antibacteriano se presenta en un intervalo más amplio de niveles de pH, es decir, no sólo por debajo de 5,0.

Así pues, la solución se puede usar de manera segura para la higiene orofaríngea de los pacientes.

Por otra parte, los componentes residuales de las reacciones de nitrito acidificado, en particular el ácido ascórbico (vitamina C), tienen un papel nutricional y de protección individual. La vitamina C es un potente antioxidante hidrosoluble que protege las lipoproteínas de baja densidad de la oxidación, reduciendo los oxidantes nocivos en el estómago (por ejemplo, radicales libres de peroxinitrito) y promueve la absorción del hierro.

Ejemplos 16 y 17

Se midió el cambio de pH al añadir ácido L-ascórbico de forma gradual a nitrito de sodio y como una sola adición. Se usaron nitrito de sodio (NaNO_2) (> 99% de pureza) de calidad analítica y ácido L-ascórbico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$) de Sigma-Aldrich, RU. También se usó solución salina (0,9 % p/v de NaCl) de Baxter Healthcare-RU.

Se usó solución salina normal como disolvente en la preparación de las soluciones de nitrito de sodio y ácido ascórbico. Todas las soluciones se prepararon a temperatura ambiente (22-25 °C) en lotes de 25 o 50 ml, y se usaron en el plazo de 10-20 días. Las soluciones madre se mantuvieron en recipientes herméticos lejos de la luz.

Todas las mediciones de pH de las soluciones se llevaron a cabo con un medidor de pH Wissenschaftlich-Technische Werkstätten (WTW), modelo pH340i junto con un electrodo de combinación de pH SenTix 20 dotado de un termopar. El electrodo se calibró con soluciones tampón de calibración recién preparadas (pH 7,00 y 4,00 \pm 0,002). Las soluciones de calibración se prepararon a partir de cápsulas tampón Tri-check ALDRICH, Aldrich, EE.UU.

Se midió el pH de las soluciones con la adición de una varilla de agitación magnética convencional que funcionaba a 60 rpm. Se usaron al menos 12 ml de soluciones para asegurarse de que el electrodo estuviera completamente sumergido. Se prepararon soluciones 1 M de nitrito de sodio y ácido ascórbico usando solución salina normal como disolvente. En el Ejemplo 16, se añadió 1 ml de ácido al nitrito cada 10 minutos. En el Ejemplo 17, se añadieron 5 ml de ácido ascórbico 1 M a 12 ml de solución de nitrito de sodio 1 M.

Los resultados se pueden ver en las Figuras 12 y 13.

En el Ejemplo 16, el pH inicial de la solución de nitrito de sodio se midió en aproximadamente 7,35. El pH cae bruscamente hasta un nivel de entre 4,2 y 4,7, y luego se recupera rápidamente (en el plazo de 4-5 minutos) hasta un valor más estable de ~6 tras cada adición. En algunos casos, la recuperación del pH es tan rápida que produce un exceso antes de volver a bajar hasta el valor estable.

En el Ejemplo 17, el nivel de pH estable que se consigue tras mezclar los reactivos durante 5 minutos es muy superior al nivel fisiológicamente tolerable de 5,0 (el pH de la solución salina) para la administración oral-gástrica-

digestiva.

Ejemplo 18

5 Se tomaron mediciones de espectroscopia de Raman para la reacción de 6 ml de ácido ascórbico 1 M con 12 ml de nitrito de sodio 1 M. Los reactivos y las soluciones fueron como para los Ejemplos 16 y 17.

10 Se midieron las mezclas de reactivos y los productos finales usando un espectrómetro de Raman dispersivo Nicolet Almega XR dotado de entradas tanto macro como microscópicas. Los espectros se excitaron con un diodo láser en el infrarrojo cercano (NIR 785 nm) estabilizado externamente. Las mediciones se realizan con un ancho de ranura de 25 μm y una resolución espectral de 4 cm^{-1} . Se usó un programa informático (Omnicon, ver. 7.2a) para representar y recoger los datos. Se colocaron las muestras líquidas o cristalinas por analizar en un pequeño tubo de cuarzo que encajaba en un portamuestras y estaba alineado con el haz de láser.

15 Se añadió el ácido a la solución de nitrito mientras se agitaba la mezcla a una velocidad constante de 60 rpm. Se extrajo una pequeña cantidad (aproximadamente 0,07 ml) de la mezcla para el análisis espectroscópico a intervalos variables.

20 Los espectros se tomaron a los 10, 30, 60, 90 y 135 minutos desde el momento en el que se mezclaron los reactivos, así como tras completarse toda la reacción. La Figura 14 muestra el espectro de la solución de nitrito de sodio junto con los espectros obtenidos durante la reacción de 6 ml de ácido con 12 ml de solución de nitrito. El trazo inferior pertenece solo a una solución de nitrito de sodio.

25 La ausencia de picos en la región de 2250-2050 cm^{-1} indica la ausencia de cualquier compuesto peligroso de cianuro iónico (como NaCN), cianato (OCN) o fulminato (CNO) en la mezcla. Por ejemplo, la vibración de valencia (CN) produce una banda definida situada en la región de 2250-2050 cm^{-1} .

30 Las mediciones de la fuerte vibración de valencia simétrica en 1325 cm^{-1} , ($V_s(\text{NO}_2)$ de nitrito de sodio), revelan que la mitad del nitrito es reducido por el ácido en menos de 10 minutos. Se observó que la cantidad de nitrito de la mezcla mostraba una nueva disminución del 8 % en las siguientes 2 horas de la observación. Cuando la reacción se hubo completado, solo quedaba en la mezcla aproximadamente el 31 % de la cantidad inicial de nitrito.

35 Esto demuestra que, tras una reacción, una solución con una proporción en exceso de nitrito con respecto a ácido retiene suficiente nitrito para permitir posteriores reacciones de generación de NO/NOx *in vivo* si el entorno interno conserva un pH bajo. Dichas reacciones aumentarán la disponibilidad local de los productos de reacción de NO-NOx y ayudarán en la desacidificación local *in vivo* de los tejidos.

40 En la Tabla 1, se muestran las bandas de Raman de una solución de nitrito acidificado. La Tabla 2 muestra las superficies de los picos de las bandas de Raman de la solución de nitrito acidificado registradas en los momentos indicados.

Tabla 1

Posición de la banda	Asignación
1791 cm^{-1}	$V_s(\text{NO}_2)$
1704 cm^{-1}	$V(\text{HONO})$
1590 cm^{-1}	$V_s(\text{NO}_2)$ de HONO
1467 cm^{-1}	$V(\text{N}=\text{O}), V_s(\text{NO}_2)$
1325 cm^{-1}	$V_s(\text{NO}_2)$ de NaNO_2
1041 cm^{-1}	$V(\text{NO})$ de NO_3^- de HNO_3 o NaNO_3
827 cm^{-1}	$d(\text{ONO}), V_s(\text{NO}_3)$
600 cm^{-1}	Flexión en plano de HONO

Tabla 2

Posición de la banda	Superficie del pico					
	10 min	30 min	60 min	90min	135 min	Prod. final
1791 cm^{-1}	1378	1159	766	606	374	-
1704 cm^{-1}	903	828	449	-	495	256
1590 cm^{-1}	5839	5416	4525	4739	4264	3934
1467 cm^{-1}	934	855	720	632	659	-

Posición de la banda	Superficie del pico					
	10 min	30 min	60 min	90min	135 min	Prod. final
1325 cm ⁻¹	6359	6161	5860	5944	5655	3967
1041 cm ⁻¹	2501	2109	2084	2122	2202	2113
827 cm ⁻¹	7693	7302	6628	6647	6170	4387
600 cm ⁻¹	2041	1842	1479	1334	923	921

Tras más de 2 horas de observación, todavía había una cantidad considerable de burbujas de gas en evolución desde la mezcla. Se detuvo la agitación y se mantuvo la mezcla durante toda la noche. Tras 24 horas, no se observaron más burbujas de gas, y los espectros de Raman de la izquierda sobre la solución (producto final) revelaron que la concentración de nitrito se había reducido hasta dos tercios de su concentración a los 10 minutos (un tercio de su concentración inicial antes de la reacción).

Ejemplo 19

Se usó un ensayo de viabilidad sencillo para determinar si una cepa de laboratorio convencional de *M. tuberculosis* era susceptible a la destrucción mediada por NO/NOx.

Se cultivó *M. tuberculosis* en 10 ml de medio convencional (Middlebrook 7H9, Tween 80 al 0,05 %, suplemento de OADC al 10 % v/v). Para la exposición a NO/NOx, se inoculó 1 ml de cultivo en 10 ml de la solución de Middlebrook más 0,1 ml de una mezcla de NaNO₂ 0,5 M y ácido ascórbico 0,25 M. Se preparó un control sin la solución de nitrito/ácido ascórbico.

Se incubaron los cultivos a 37 °C, reposando durante 24 horas. Se sembraron diluciones en serie en medio sólido (Middlebrook 7H10, OADC al 10% v/v) y se registraron las UFC tras 3 semanas.

El pH del medio no se redujo significativamente mediante la adición de la solución de nitrito/ácido ascórbico.

Los recuentos de unidades formadoras de colonias (UFC) del cultivo de control fueron 1,5 x 10⁷ por ml. No hubo bacterias viables del cultivo tratado con NO en la dilución más baja sembrada (límite de detección de 10 UFC/ml).

La solución de nitrito/ácido ascórbico generadora de NO fue eficaz para matar > 6 registros de *M. tuberculosis* en 24 horas.

Ejemplo 20

Se usó un ensayo para determinar la susceptibilidad de una selección de diferentes bacterias a la destrucción mediada por NO/NOx.

Los experimentos se llevaron a cabo en placas de 96 micropocillos. Se llenó una serie de micropocillos con 60 µl de nitrito de sodio, dando concentraciones finales de 0; 0,2; 0,5; 1; 2; 10; 15 y 30 mM. También se añadieron sesenta µl de suspensión bacteriana (densidad de 2 x 10⁷ unidades formadoras de colonias por ml) y 120 µl de caldo de infusión de cerebro y corazón (Oxoid, Basingstoke, RU) acidificado con ácido clorhídrico, dando valores de pH finales de 2,0; 3,0; 4,0; 4,5; 5,0; 6,0 y 7,0.

Se cerraron herméticamente las placas y se incubaron durante una noche a 37 °C. Se determinó el efecto inhibitor del nitrito acidificado sobre el crecimiento bacteriano mediante la medición de la densidad óptica (540 nm) de los pocillos usando un lector de placas de micropocillos (Anthos HT III, Salzburgo, Austria).

Todos los experimentos se llevaron a cabo por triplicado.

Para determinar la actividad bactericida tras la exposición a nitrito acidificado, se transfirieron 60 µl de la suspensión bacteriana a 180 µl de un medio de recuperación (caldo de infusión de cerebro y corazón; pH 7,0). Se determinó la evaluación del crecimiento microbiano con el lector de placas de micropocillos para medir la densidad óptica como se ha explicado anteriormente.

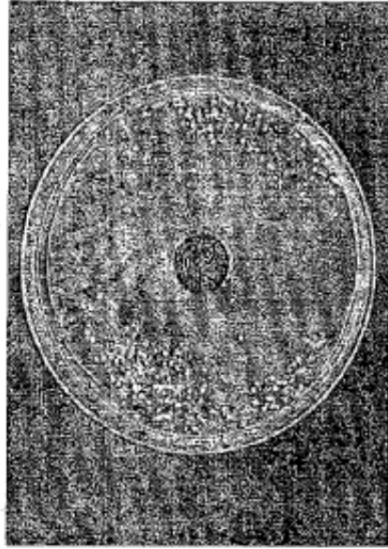
Se analizó el efecto de esta mezcla en microorganismos previamente aislados de pacientes. Los resultados se muestran en la Figura 15a-n.

Se puede ver que la solución de nitrito acidificado tiene un efecto bacteriostático, así como bactericida en diversos aislados bacterianos.

La solución se puede usar para el tratamiento de diversas afecciones, ya que es activa contra organismos resistentes a antibióticos, no fomenta la aparición de cepas resistentes y es eficaz en un amplio intervalo de pH.

REIVINDICACIONES

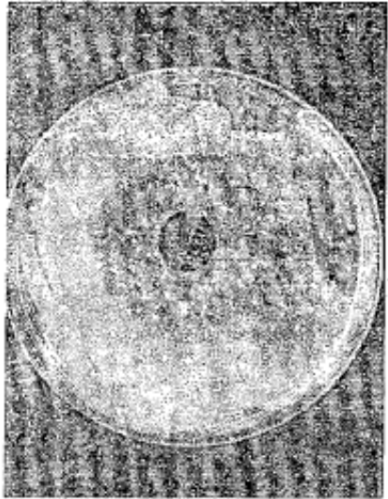
- 5 1. Una formulación líquida que comprende una cantidad clínicamente eficaz de óxidos de nitrógeno disueltos y/o dispersados en la misma para su uso en la prevención de la neumonía asociada a la ventilación mecánica, donde la formulación líquida contiene de 10 a 40.000 partes por mil millones de óxidos de nitrógeno.
2. La formulación para su uso según lo reivindicado en la reivindicación 1, donde la formulación líquida contiene de 100 a 10.000 partes por mil millones de óxidos de nitrógeno.
- 10 3. La formulación para su uso según lo reivindicado en una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la formulación líquida es una formulación acuosa.
- 15 4. La formulación para su uso según lo reivindicado en una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la formulación líquida comprende el producto de reacción de al menos un nitrito de metal alcalino y/o al menos un nitrito de metal alcalinotérreo con al menos un ácido.
5. La formulación para su uso según lo reivindicado en la reivindicación 4, donde la formulación líquida comprende el producto de reacción de al menos un nitrito de metal alcalino con ácido ascórbico.
- 20 6. La formulación para su uso según lo reivindicado en una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la formulación líquida comprende además al menos un nutriente.
- 25 7. Una composición líquida de alimentación enteral por sonda para la prevención de la neumonía asociada con la ventilación mecánica, comprendiendo la composición una cantidad clínicamente eficaz de óxidos de nitrógeno disueltos y/o dispersados en la misma y al menos un nutriente.
8. La composición según lo reivindicado en la reivindicación 7, donde la composición contiene de 10 a 40.000 partes por mil millones de óxidos de nitrógeno.
- 30 9. La composición según lo reivindicado en la reivindicación 8, donde la formulación líquida contiene de 100 a 10.000 partes por mil millones de óxidos de nitrógeno.
- 35 10. La composición según lo reivindicado en una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, donde la composición es una composición acuosa.
11. La composición según lo reivindicado en una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, donde la composición comprende el producto de reacción de al menos un nitrito de metal alcalino y/o al menos un nitrito de metal alcalinotérreo con al menos un ácido.
- 40 12. La composición según lo reivindicado en la reivindicación 11, donde la composición comprende el producto de reacción de al menos un nitrito de metal alcalino con ácido ascórbico.



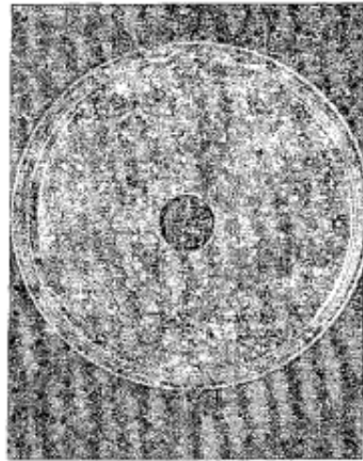
B



D



A



C

Figura 1

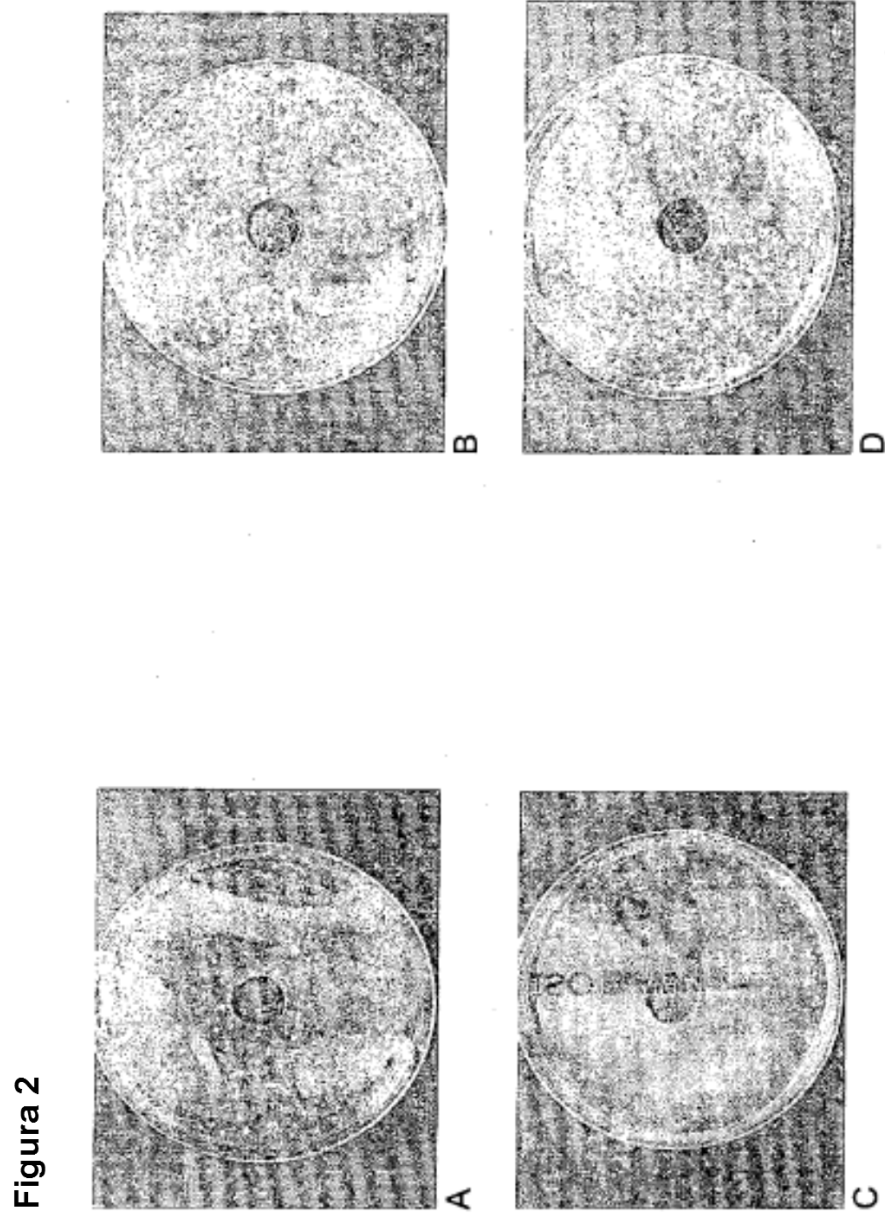


Figure 2

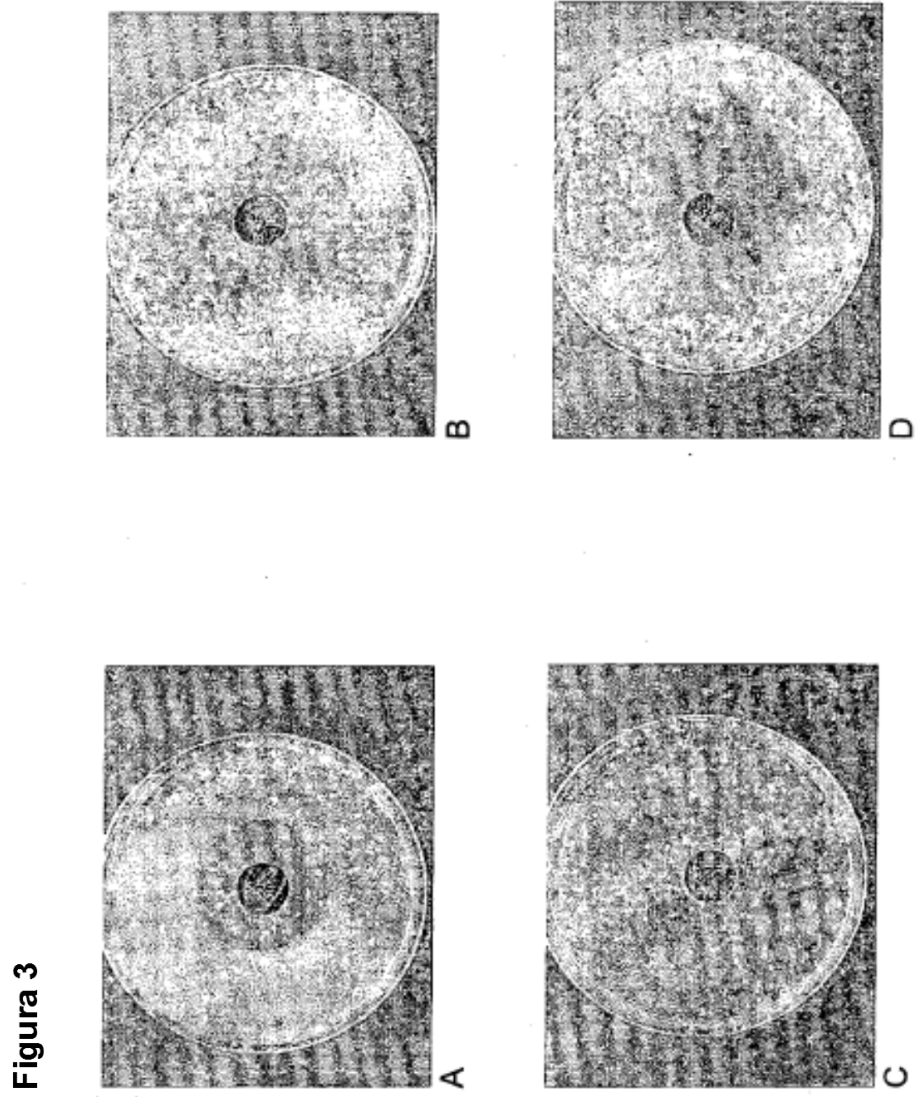
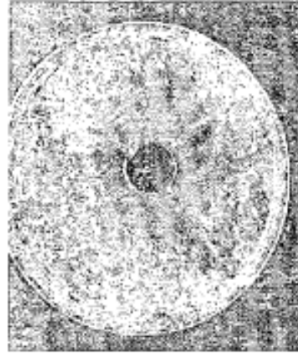


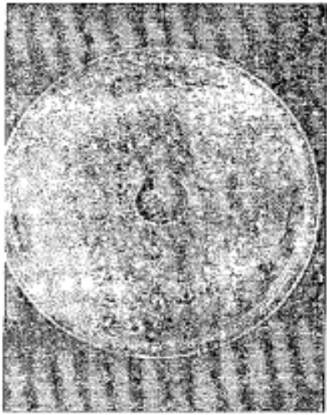
Figura 3



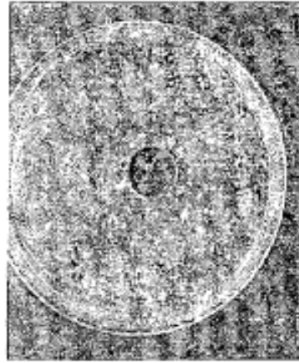
B



D



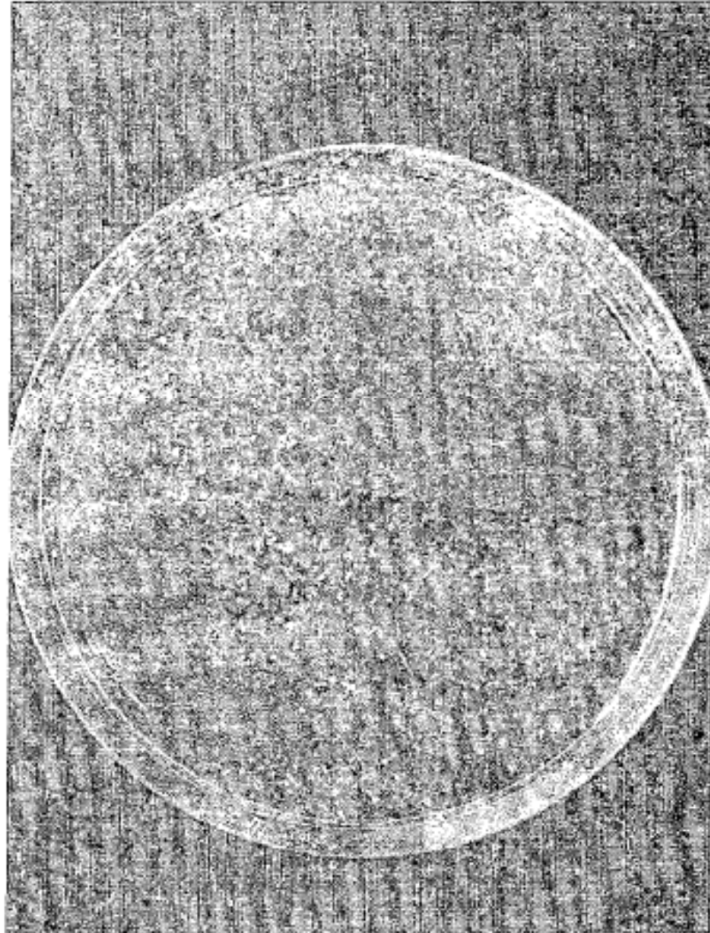
A



C

Figura 4

Figura 5



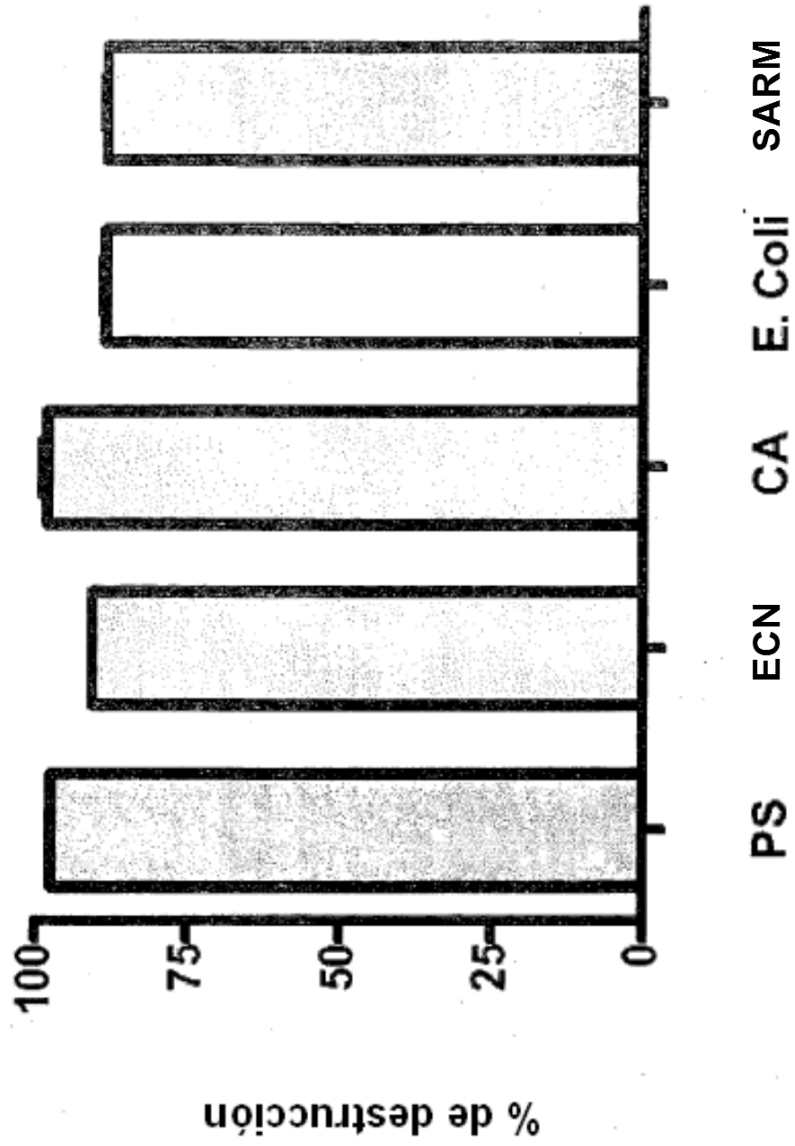


Figura 6

Figura 7

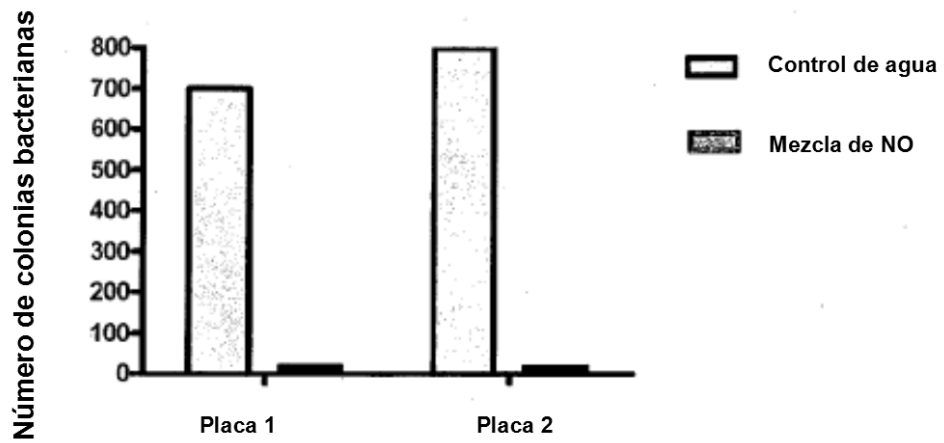


Figura 8

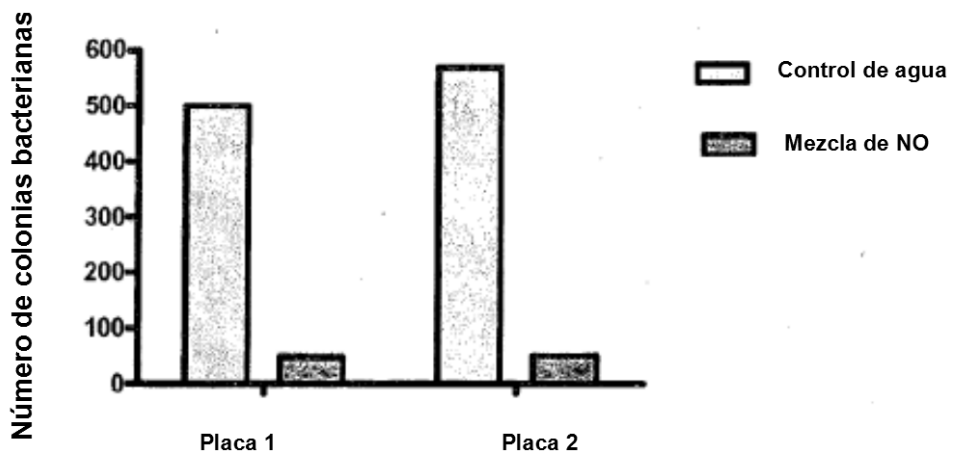


Figura 9

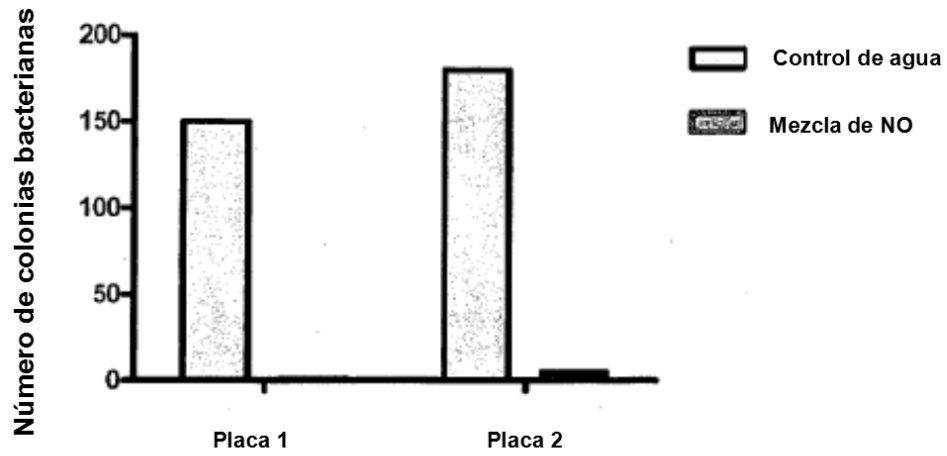


Figura 10

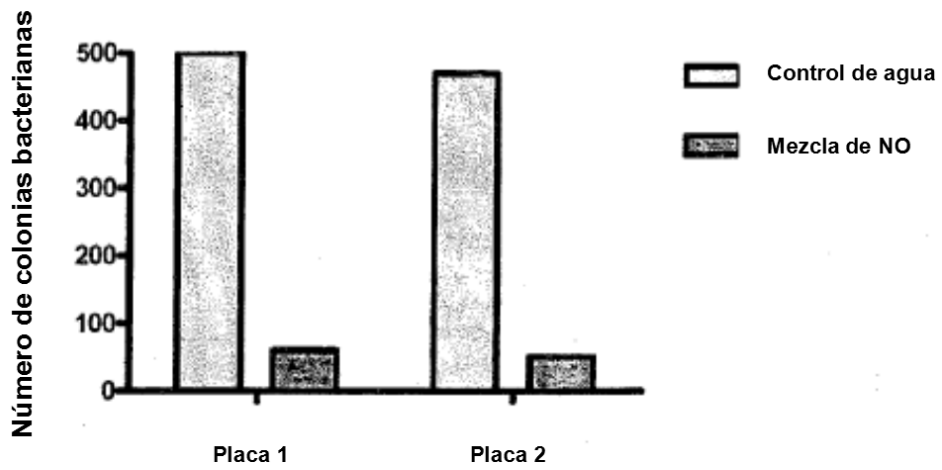


Figura 11

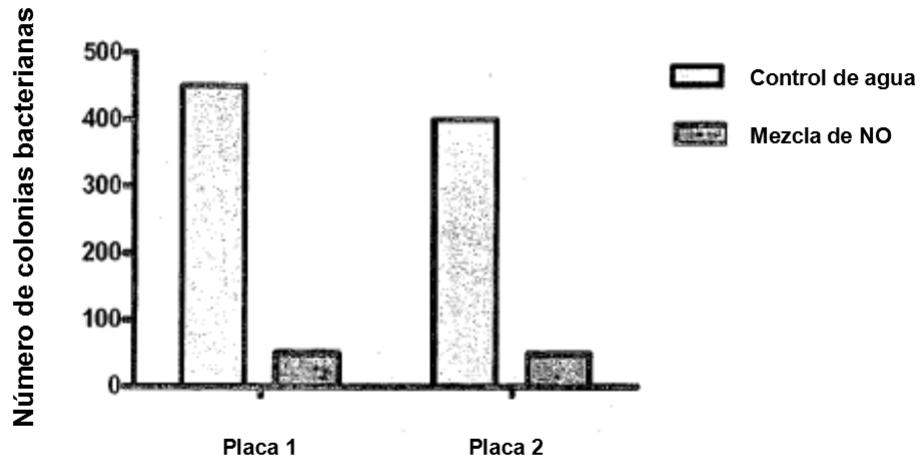


Figura 12

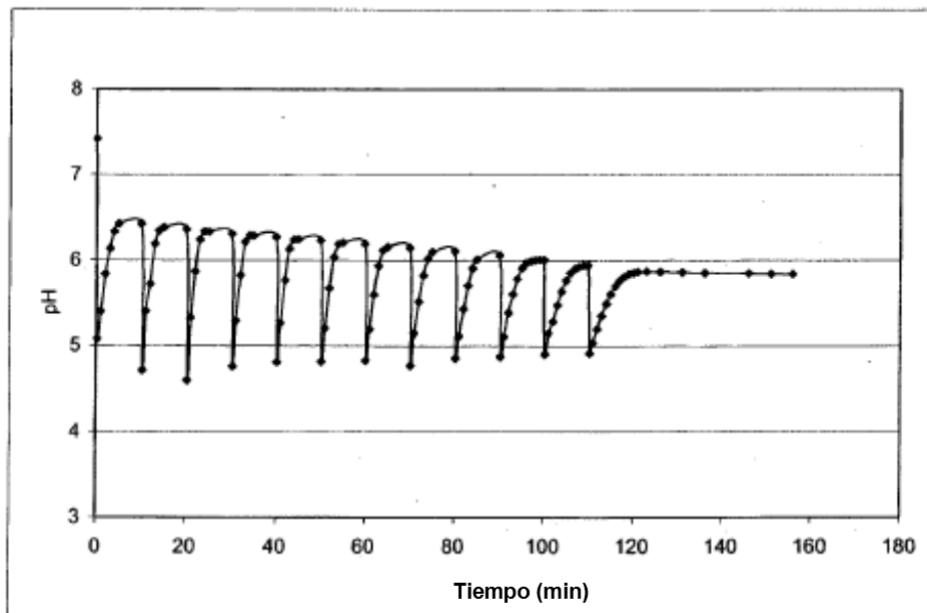


Figura 13

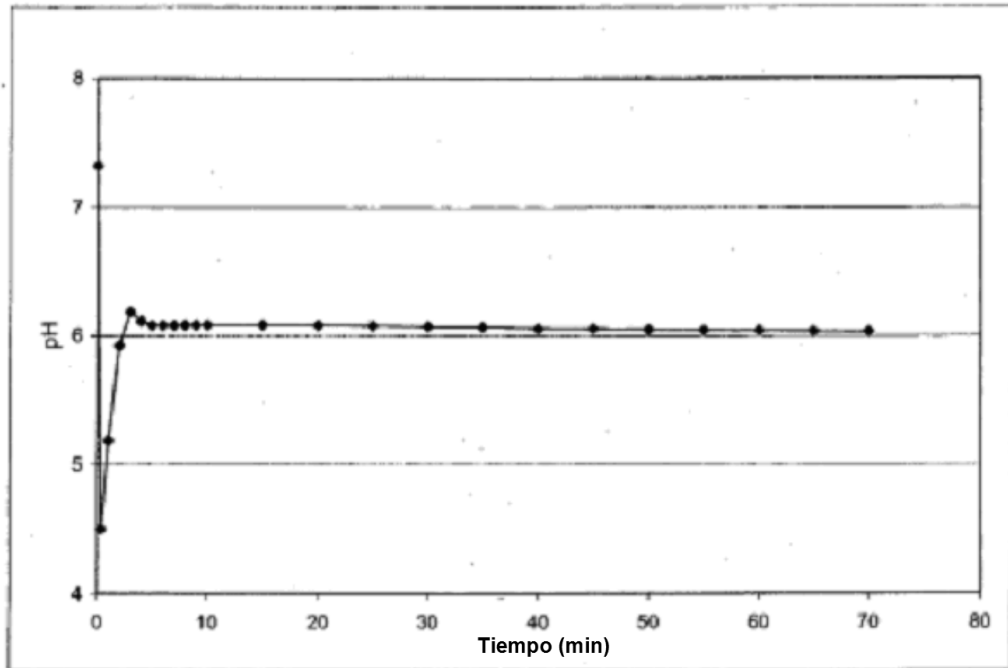


Figura 14

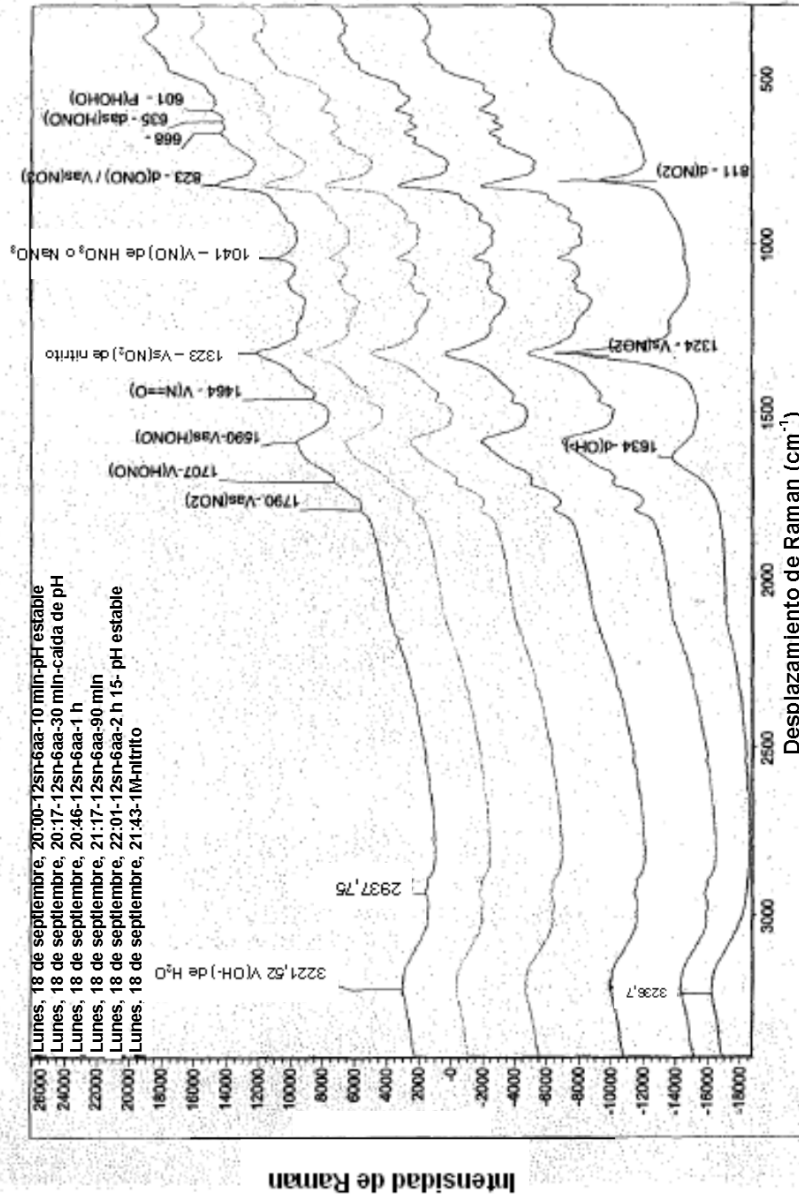


Figura 15A

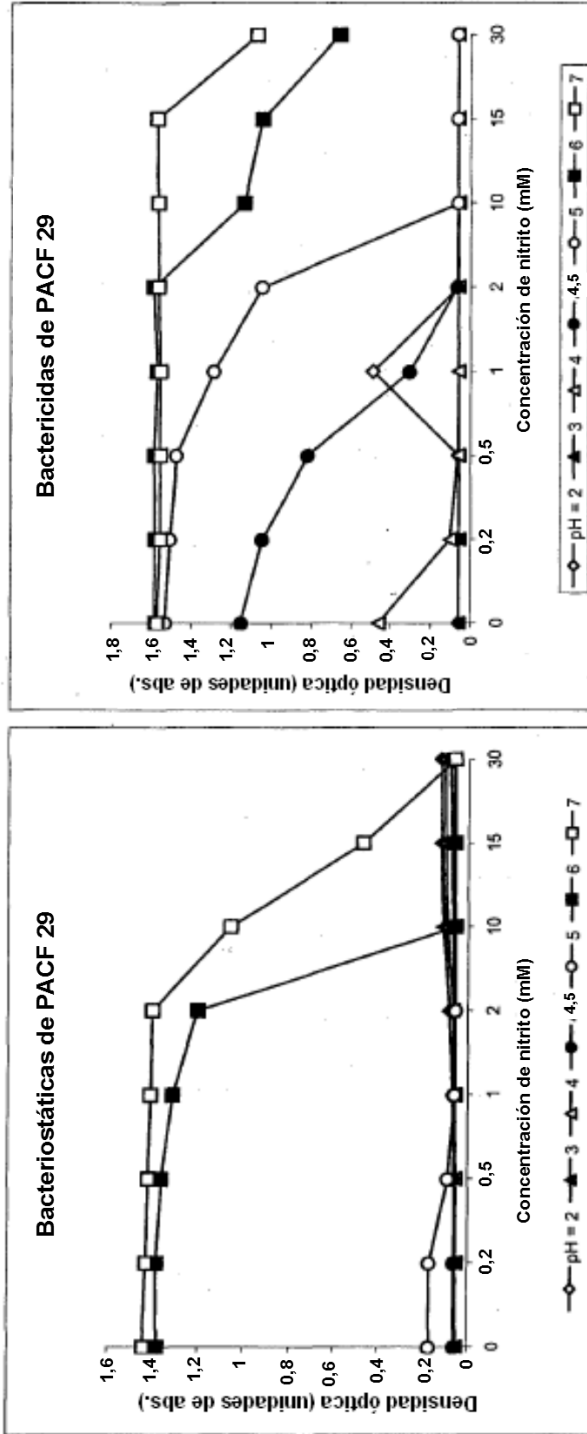


Figura 15B

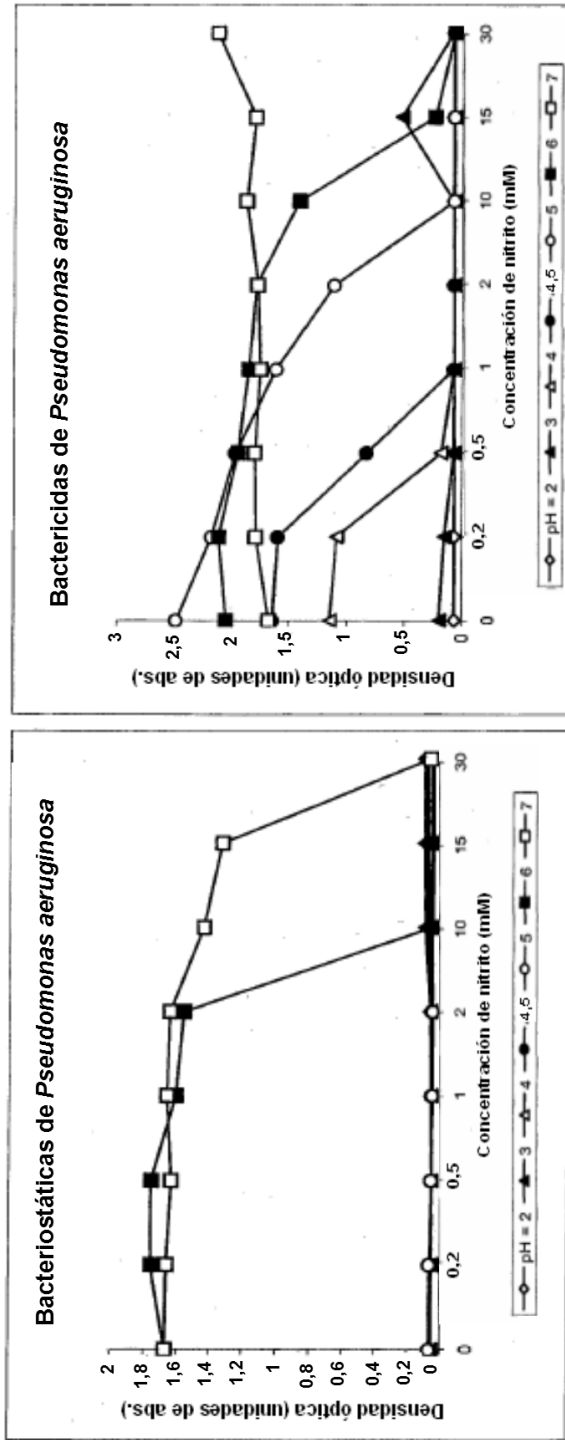


Figura 15C

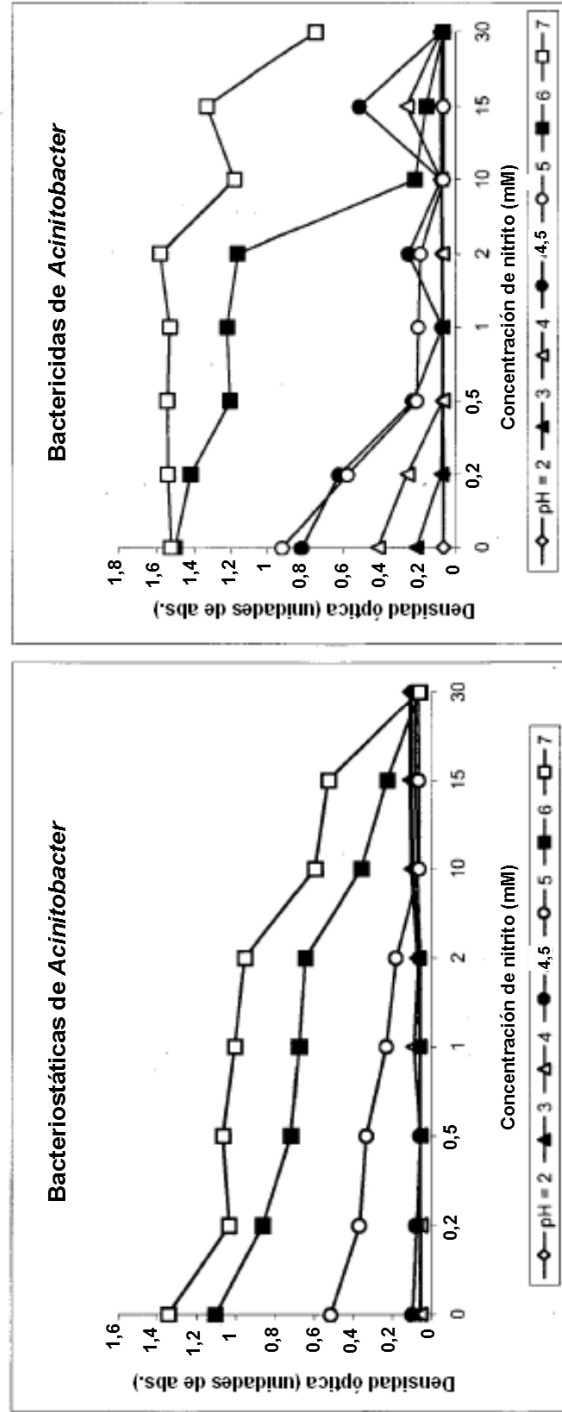


Figura 15D

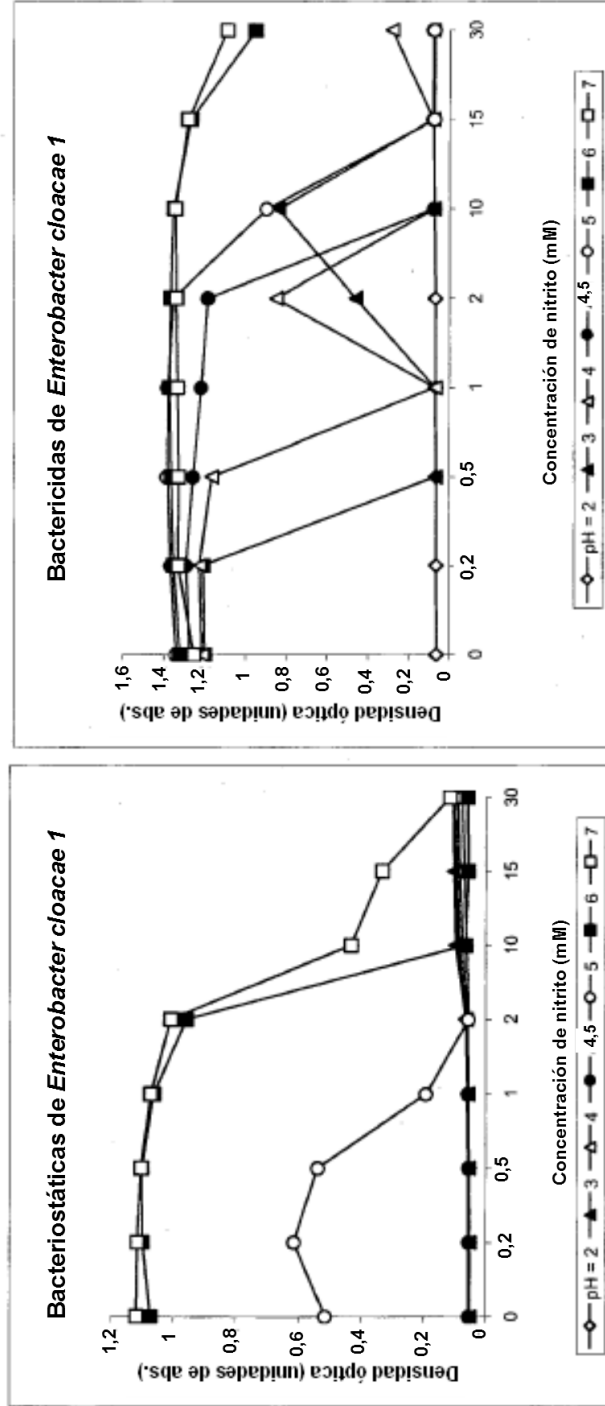


Figura 15E

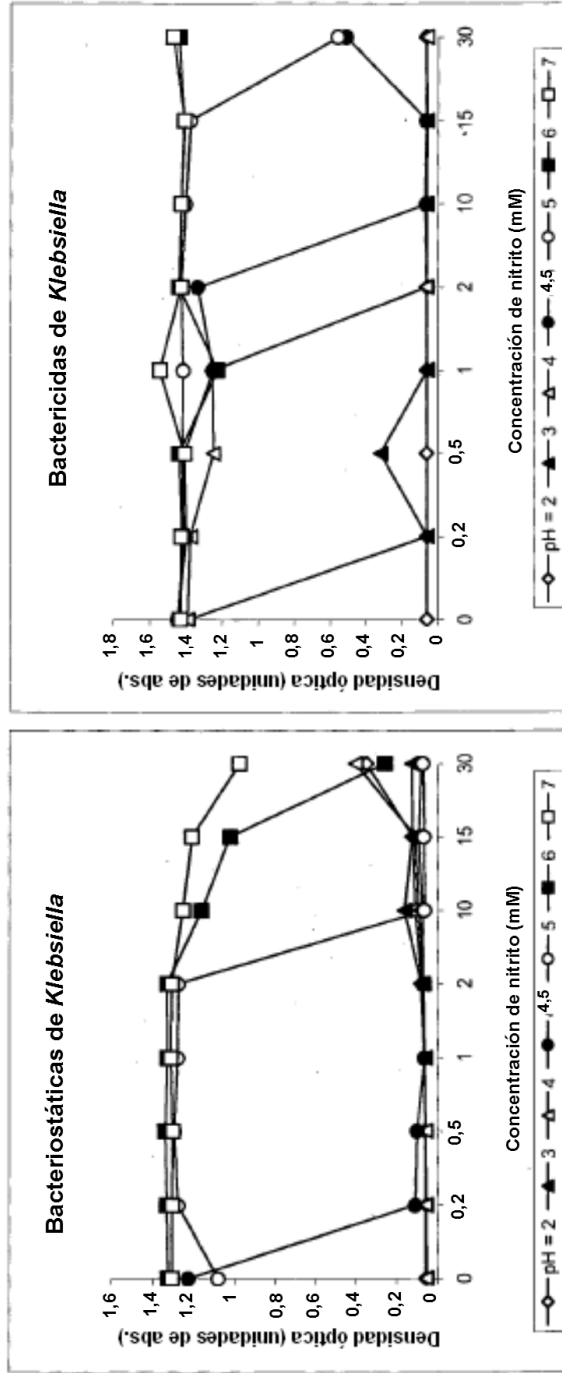


Figura 15F

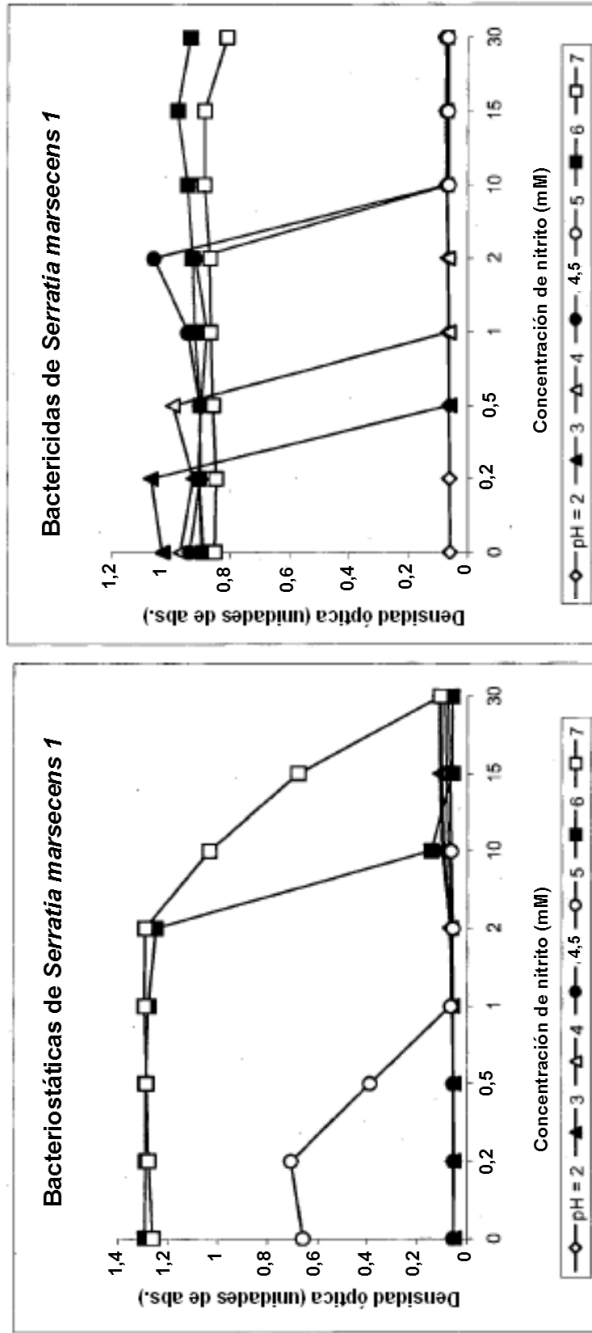


Figura 15G

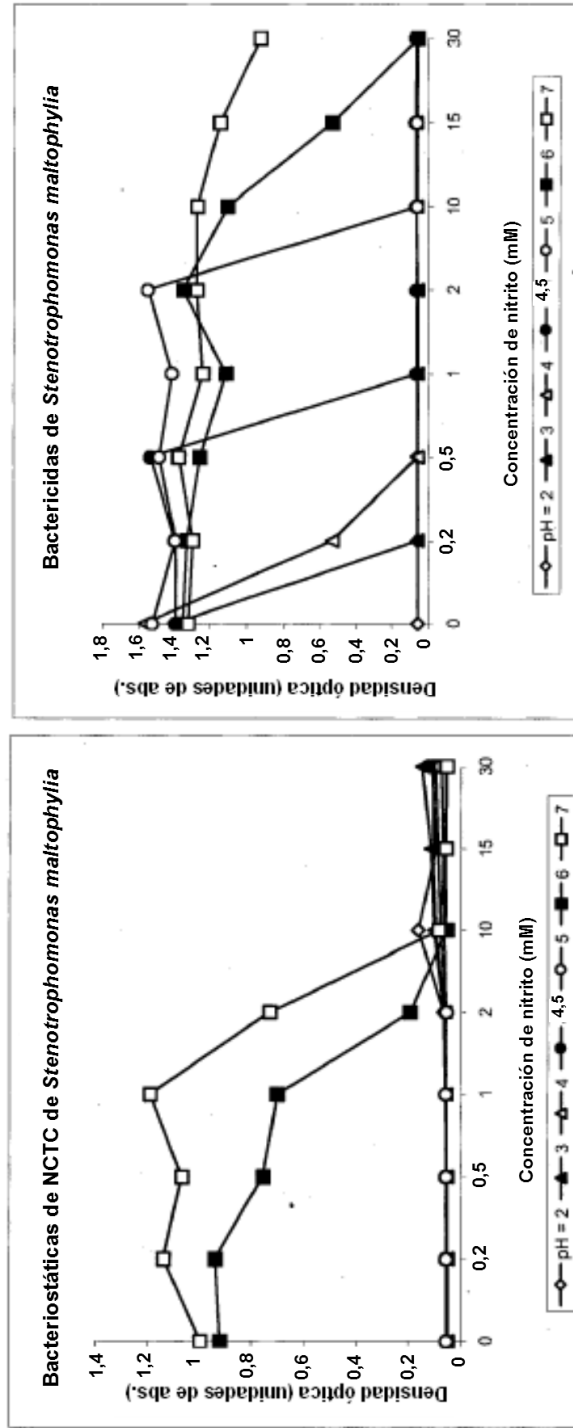


Figura 15H

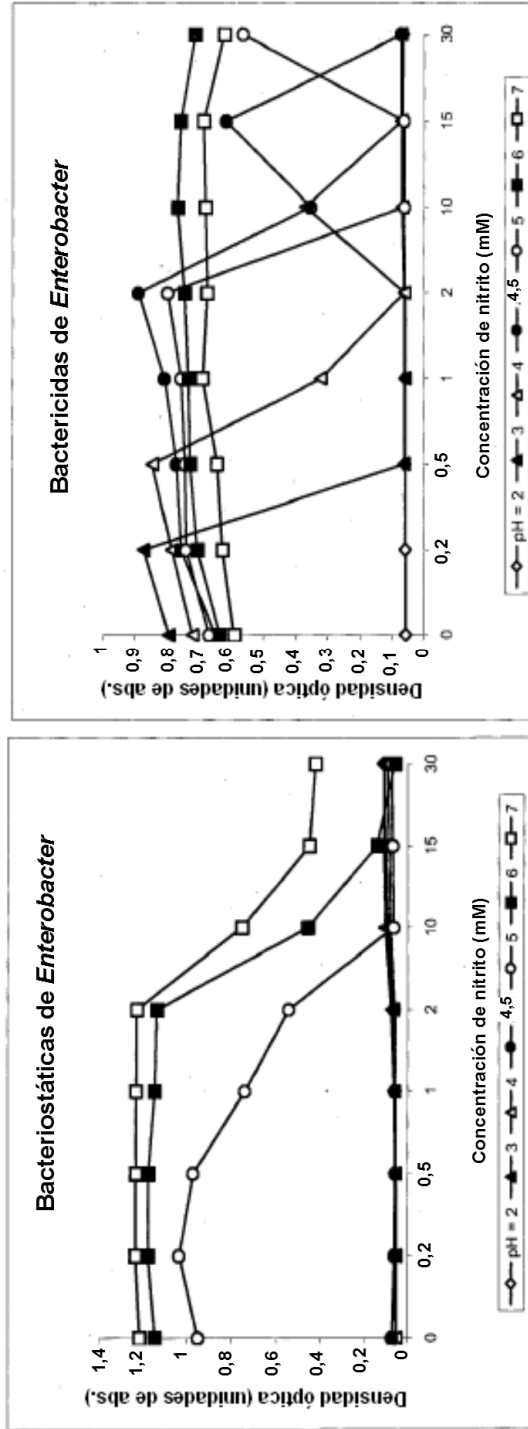


Figura 15I

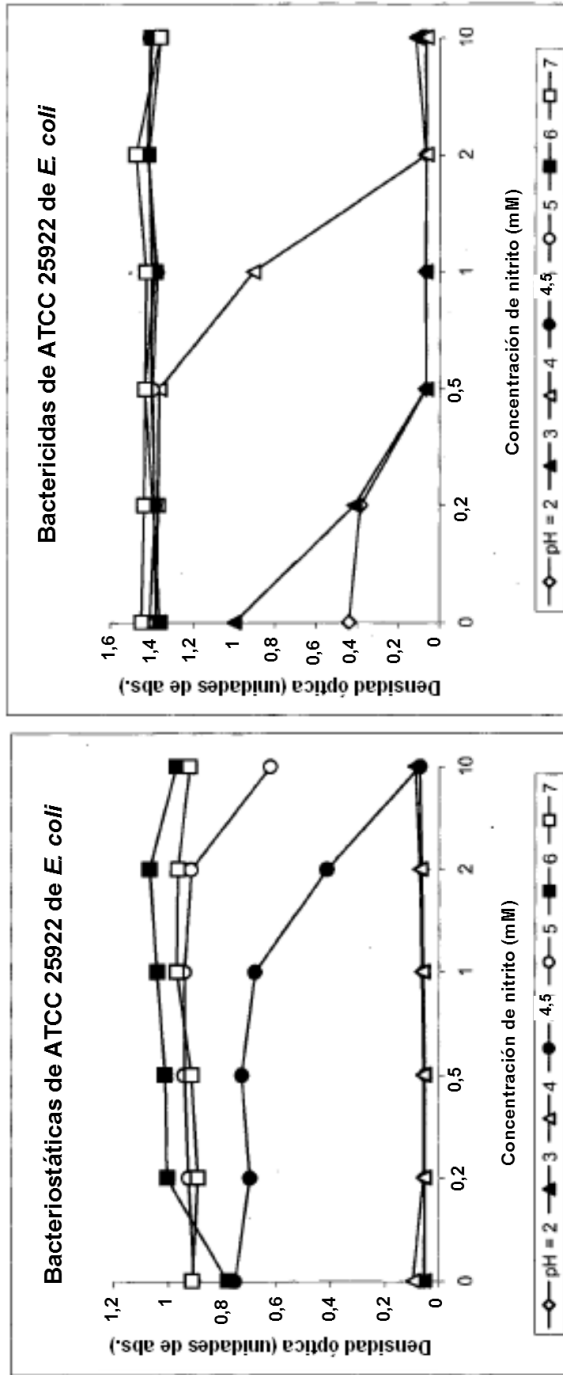


Figura 15J

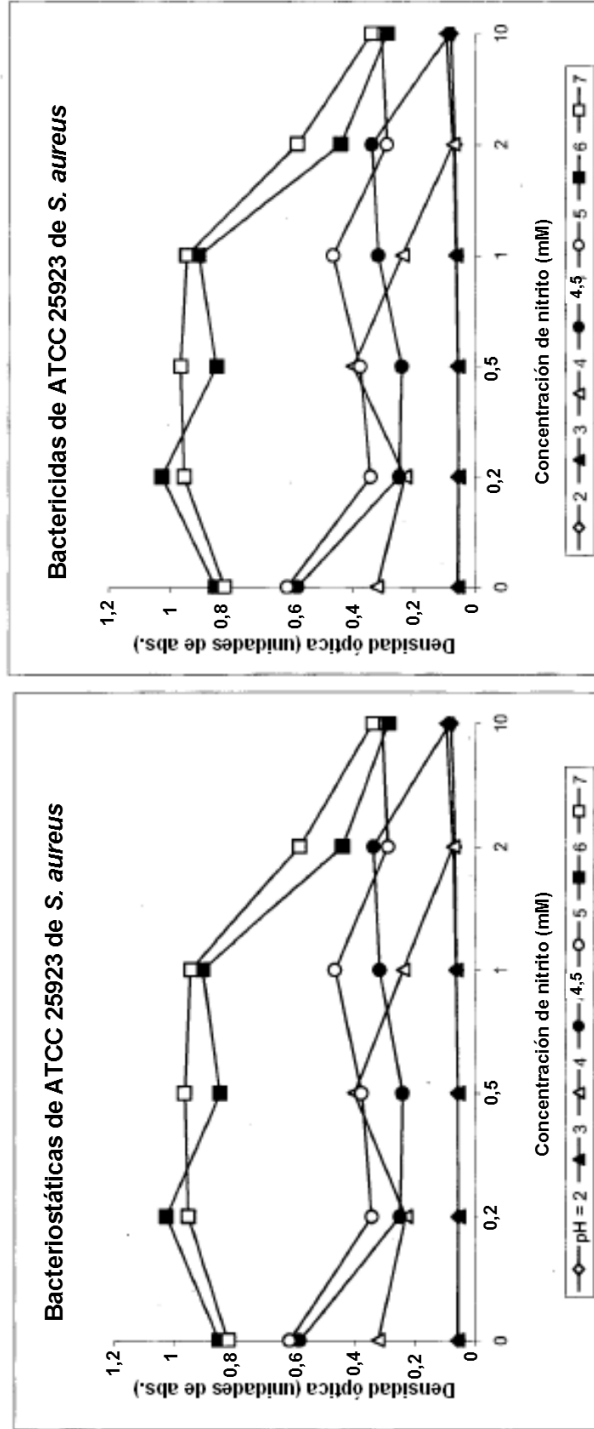


Figura 15K

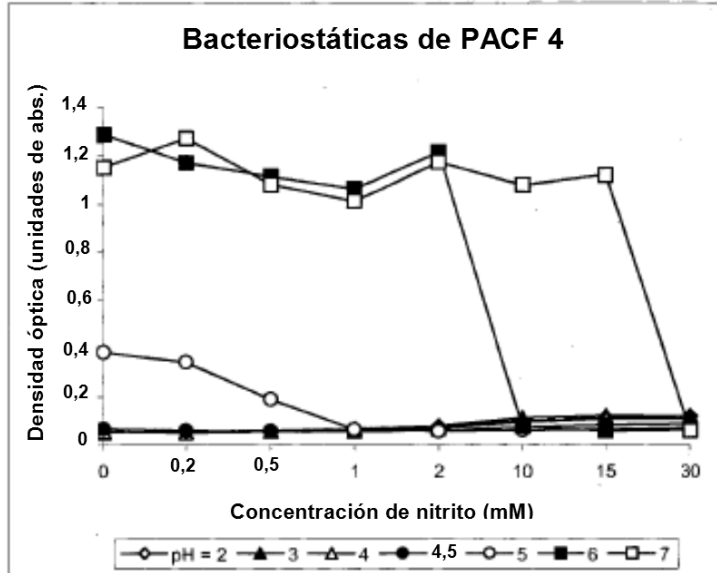


Figura 15L

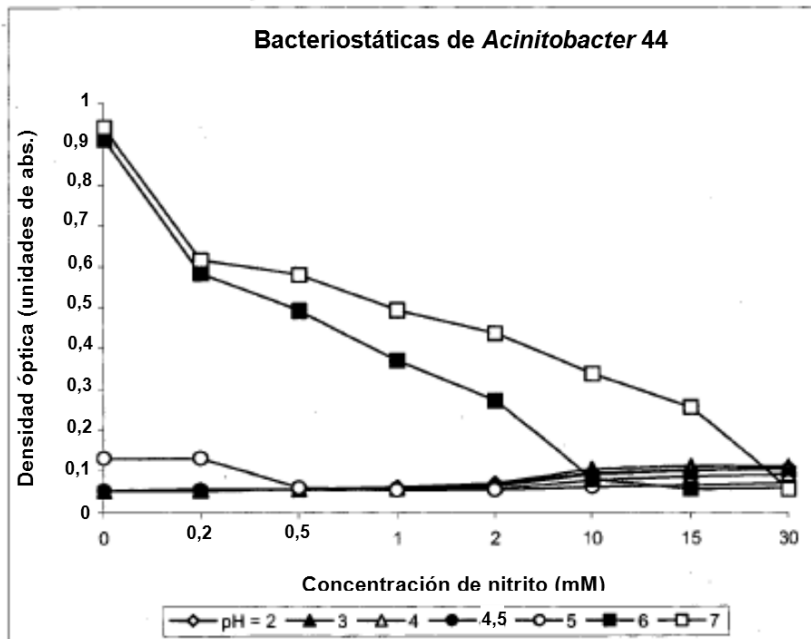


Figura 15M

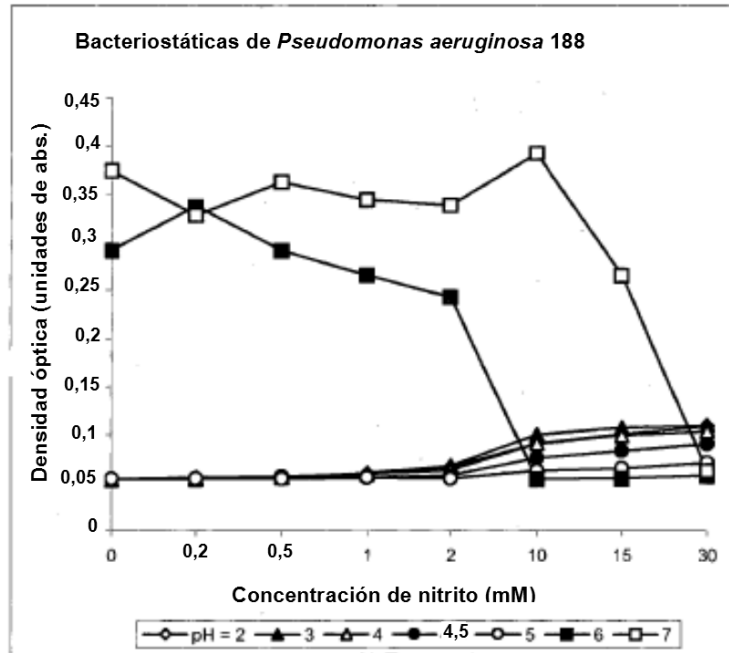


Figura 15N

