

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 444 845**

51 Int. Cl.:

**C07C 229/00** (2006.01)

**C07C 239/04** (2006.01)

**C07C 309/14** (2006.01)

**C07C 309/18** (2006.01)

**C07C 311/32** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.08.2004 E 04801985 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.01.2014 EP 1656095**

54 Título: **Aminoácidos N,N-dihalogenados y derivados**

30 Prioridad:

**18.08.2003 US 496207 P**

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

**27.02.2014**

73 Titular/es:

**NOVABAY PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)  
5980 Horton Street Suite 550  
Emeryville CA 94608, US**

72 Inventor/es:

**BASSIRI, MANSOUR;  
NAJAFI, RAMIN;  
WANG, LU y  
YANG, JANE**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 444 845 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

Aminoácidos N,N-dihalogenados y derivados

### Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a compuestos y composiciones bactericidas, antibacterianas, anti-infecciosas, antimicrobianas, esporicidas, desinfectantes, antifúngicas y antivíricas basadas en aminoácidos y sus derivados que tienen la capacidad de liberar halógenos, y a nuevos usos de estas composiciones en terapia.

Esta memoria descriptiva también describe métodos para usar los nuevos compuestos y composiciones. La memoria descriptiva describe además métodos para preparar estos compuestos. Más específicamente, estos aminoácidos halogenados y sus derivados también se denominan en la presente memoria como aminoácidos.

10 Los materiales de partida pueden usarse en forma de sus ésteres o sales. El término halógeno cuando se usa en la presente memoria incluye cloro, bromo y yodo.

15 Los materiales de partida para los N,N-dihaloaminoácidos son en general compuestos conocidos o pueden prepararse por métodos conocidos. Estos materiales se describen en Tetrahedron: Asymmetry 1997, 8 (13), FEMS Microbiol. Lett., 70, 23-28 (1990), Synth. Commun. 2725-2731 (1994), FEMS Microbiol. Lett. 108, 225-230 (1993), Neurosci. Lett. 21: 77-92 (1981), Br. J. Pharmacol. 75, 65, y por ejemplo, en Prof. R. Noyori Nobel Lecture 'Asymmetric Catalysis: Science and Opportunities' fechada el 8 de diciembre de 2001 ([www.nobel.se/chemistry/laureates/2001/noyori-lecture.pdf](http://www.nobel.se/chemistry/laureates/2001/noyori-lecture.pdf)).

20 Varios de los aminoácidos N,N-dihalogenados son conocidos. Con respecto a estos aminoácidos y sus derivados, los presentes inventores proporcionan nuevas composiciones con propiedades bactericidas, antibacterianas, anti-infecciosas, antimicrobianas, antifúngicas y antivíricas.

La invención también se refiere a varios nuevos aminoácidos N,N-dihalogenados y sus derivados con propiedades bactericidas, antibacterianas, anti-infecciosas, esporicidas, antimicrobianas, antifúngicas, y antivíricas.

### Antecedentes de la invención

25 Las células inmunes del cuerpo, los neutrófilos y macrófagos que son conocidos por sus capacidades para eliminar infecciones pueden generar metabolitos que reaccionan con el oxígeno que destruyen a los microorganismos y a las células normales o neoplásicas (cancerosas) y modulan las respuestas inflamatorias.

30 Los neutrófilos pueden activarse en respuesta a estímulos inflamatorios, infecciones bacterianas y/u otros cambios en las membranas. Como resultado, producen radicales superóxido tales como:  $\text{HOO}\cdot$ ,  $\text{O}_2\cdot$ , y  $\text{OH}\cdot$ . El ion cloruro ( $\text{Cl}^-$ ) en concentraciones fisiológicas de 100-150 mM es oxidado por  $\text{H}_2\text{O}_2$ , reacción que es catalizada por la mieloperoxidasa (una enzima dentro de los neutrófilos) para formar ácido hipocloroso ( $\text{HOCl}$ ) y  $\text{HCl}$ .

35 La generación fisiológica de  $\text{HOCl}$  está estrechamente regulada por medio de una inhibición con retroalimentación mediante una intrincada red de señales bioquímicas. El  $\text{HOCl}$  es generado en una concentración de  $2 \times 10^{-7}$  M por  $10^6$  neutrófilos activados. Se estima que esta cantidad de  $\text{HOCl}$  mata aproximadamente  $150 \times 10^6$  bacterias *E. coli*. Una vez que se produce  $\text{HOCl}$ , se degrada rápidamente por reacción con múltiples sustratos oxidables dentro del complejo sistema celular. Así, es de esperar que las concentraciones de metabolitos que reaccionan con el oxígeno disminuyan a valores indetectables en horas. Sin embargo, se ha demostrado que los neutrófilos pueden usar su  $\text{HOCl}$  para generar grandes cantidades de oxidantes con una vida bastante larga, tales como las N-cloraminas. Estos oxidantes de larga vida son generados como monocloraminas de taurina (NCT, o N-clorotaurina) y dicloraminas de taurina (NNDCT, o N,N-diclorotaurina) dependiendo del pH del entorno celular. Estos oxidantes son poderosos agentes antimicrobianos y juegan papeles clave dentro del sistema de defensa así como modulan a las citoquinas y los factores de crecimiento en el cuerpo anfitrión.

### Descripción de la técnica relacionada

45 La Solicitud de Patente Alemana 4041703, de W. Gottardi, describe sales de metales alcalinos de N-clorotaurina. La solicitud menciona que no ha sido posible aislar N-clorotaurina como una sustancia pura pero sólo en forma de una disolución diluida cuando se prepara *in situ*. Más tarde, el trabajo estableció que la N-clorotaurina podría prepararse como se describe más adelante. La Solicitud de Patente Alemana también describe la preparación de sales puras de metales alcalinos de N-clorotaurina en forma cristalina. También describe el uso de estas sales como desinfectantes y bactericidas en aplicaciones médicas para seres humanos. La Solicitud Alemana describe las preparaciones de las sales de metales alcalinos mediante la reacción de taurina con una cloramida de metal alcalina, tal como N-

clorobenceno sulfonamida de sodio (Cloramina-B) o N-cloro-4-metil-benceno sulfonamida de sodio (Cloramina-T). La Cloramina-B y la Cloramina-T están listadas en el Merck Index, Decimotercera Edición, 2001, Entradas 2084 y 2085 en la página 356.

5 El documento WO0222118, de W. Gottardi et al., describe N-clorotaurina, en particular en la forma de su sal de sodio, como útil para el tratamiento de infecciones fúngicas, tales como *Rinosinusitis* aguda o crónica u otras infecciones fúngicas tales como *Otitis*, *Dermatitis*, *Bronquitis*, diversas formas de neumonía, tales como la producida por el hongo *Pneumocystis carinii*, las infecciones fúngicas de órganos sexuales, tales como *Colpitis*, *Endometritis*, *Balnitis*, infecciones fúngicas del tracto gastrointestinal, tales como *Estomatitis*, *Esofagitis*, *Enteritis*, o infecciones fúngicas de la uretra, tales como *Pielonefritis*, *Ureteritis*, *Cistitis*, o *Uretritis*.

10 Recientemente, Gelder *et al.* han sintetizado y aislado N,N-diclorotaurina como un polvo (Gelder, N. M.; Bowers, R. Synthesis and characterization of N,N-dichlorinated amino acids: Taurine, Homotaurine, GABA and L-Leucine, J. Neurochemical Research. 2001; 26:575-578). La N-clorotaurina (NCT) y la N,N-diclorotaurina (NNDCT) pueden identificarse por sus espectros UV. La NNDCT tiene una absorbancia máxima a 302 nm con una absorptividad molar de  $332,9 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . Estos valores son de Gottardi, W.; Nagl, M. Arch. Pharm. Med. Chem. 2002, 9, 411-421. La NCT  
15 tiene una absorbancia máxima a 252 nm con una absorptividad molar de  $415 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .

Juan M. Antelo et al., J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2, 2000, 2109-2114, describieron la catálisis general ácido-base en la reacción de desproporción reversible de N-clorotaurina. Los autores también describen la preparación de disoluciones de N,N-diclorotaurina por desproporción de N-clorotaurina a pH 2-2,5 y la estabilidad de N,N-diclorotaurina a pH = 1,88. La pérdida de N, N-diclorotaurina fue menos que 5% después de 5 horas.

20 El documento US 4.386.103 se refiere a derivados de dicloroaminoácidos que son útiles como agentes germicidas y fungicidas. Los compuestos descritos en el documento US 4.386.103 son aminoácidos y derivados de los mismos que tienen todos un grupo ácido carboxílico. El documento no describe aminoácidos o derivados de aminoácidos que tienen un grupo ácido sulfónico.

25 El documento WO 98/30116 se refiere a la conservación de los alimentos por presión hidráulica extendida. En ejemplos específicos del documento, la monoclorotaurina y la diclorotaurina se usan como conservantes.

### Sumario de la invención

En su aspecto más amplio, la presente invención proporciona una composición con actividad bactericida, antibacteriana, anti-infecciosa, antimicrobiana, desinfectante, antifúngica, esporicida y antivírica, que comprende un N,N-dihalo-aminoácido seleccionado del grupo que consiste en N,N-dicloro-2,2-dimetiltaurina, N,N-dicloro-1,1,2,2-tetrametiltaurina, N,N-dibromo-2,2-dimetiltaurina, N,N-dibromo-1,1,2,2-tetrametiltaurina, N,N-dicloro-3,3-dimetilhomotaurina, o uno de sus derivados; seleccionándose dicho derivado del grupo que consiste en sales y ésteres farmacéuticamente aceptables con alcanoles de C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>.

Una composición preferida de la invención tiene una concentración del N,N-dihaloaminoácido entre 0,1 y 50 mM y un intervalo de pH entre 2 y 7, ó 3,0 y 6,0, ó 3,0 y 5,0, ó 3,5.

35 Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen sales con cationes farmacéuticamente aceptables. Las sales del N,N-dihaloaminoácido incluyen sales de bases con el grupo -SO<sub>3</sub>H. Las sales farmacéuticamente aceptables también incluyen sales de amonio, metales alcalinos, magnesio, o sales de calcio y sales de cualquier amina orgánica. Las sales de metales alcalinos, Mg, Ca y Al son de interés. Las sales de metales alcalinos son de particular interés, particularmente sales de litio, sodio, o potasio.

40 Ejemplos de sales de adición de ácidos incluyen, pero no se limitan a, sales de ácidos minerales u orgánicos de residuos básicos, tales como aminas; sales alcalinas u orgánicas de residuos ácidos, tales como ácidos carboxílicos, y similares. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, hidroháluros, sulfatos, metosulfatos, metanosulfatos, toluensulfonatos, nitratos, fosfatos, maleatos, acetatos, lactatos y similares.

45 Listas de sales adecuadas se encuentran en Remington's Pharmaceutical Sciences, 17<sup>a</sup> ed, Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1985, p. 1418, o en The Merck Index, Decimotercera Edición, 2001, publicado por Merck Research Laboratories Division de Merck & Co., Inc., en la páginas MISC-22 y MISC-23, cuyas descripciones se incorporan por la presente por referencia en su totalidad.

50 El término "composición" como se usa en la presente memoria, se refiere a varias formas de los compuestos o composiciones de la presente invención, que incluyen sólidos tales como polvos, mezclas de polvos y similares, emulsiones, suspensiones así como disoluciones.

Las composiciones y sus usos incluyen nuevos N,N-dihaloaminoácidos o sus derivados. Las composiciones pueden mantenerse en forma ácida, que está a un pH por debajo de 7, por ejemplo 6,8, que es un pH entre 2 y 7, que es un intervalo de pH entre 2,0 y 6,8, 2,5 y 6,5, 2,5 y 6,0, ó 2,5 y 5,0, ó 3,0 y 5,0, o a un pH de 3,5. En circunstancias diferentes, el pH puede mantenerse por debajo de 5, esto es, en un intervalo de pH de 3 a 4,5, ó 3,5 a 4,5, o a un pH de 3,5. La clave es que el pH de la composición sea ácido. La selección del pH dependerá de muchos factores, que incluyen el uso específico del N,N-dihaloaminoácido (si *in vitro* o *in vivo*), el tipo de infección tratada (por ejemplo, si la infección es causada por bacterias, levaduras, hongos o virus), el sitio de la infección (por ejemplo, si es una infección del ojo, la laringe o la uretra o de cualquier tejido u órgano diana), la gravedad de la infección, la sensibilidad del paciente, etc.

10 En otro aspecto, las disoluciones de la invención contienen N,N-dihaloaminoácidos en el intervalo de concentraciones de 0,1 a 100 mili molar (mM).

En un aspecto adicional, la composición será isotónica y fisiológicamente equilibrada.

15 Los N,N-dihaloaminoácidos difieren significativamente del HOCl porque mantienen un potencial oxidante con actividades bactericidas significativas, y aún son menos tóxicos que el HOCl. Los N,N-dihaloaminoácidos también son bastante estables para difundirse una cierta distancia antes de oxidar a las moléculas diana susceptibles. Los N,N-dihaloaminoácidos de bajo peso molecular de la presente invención con n=0 ó un número entero de hasta 5 son moléculas más hidrófilas.

20 Sorprendentemente, se ha encontrado que, aunque los N,N-dihalo-aminoácidos de la invención tienen fuertes propiedades bactericidas, antibacterianas, anti-infecciosas, antimicrobianas, esporicidas, desinfectantes, antifúngicas y antivíricas, tienen una baja citotoxicidad.

En un aspecto adicional, las composiciones de la invención están estabilizadas para que cumplan el requisito de ser utilizables como composiciones para el tratamiento o prevención de infecciones o contaminaciones bacterianas, microbianas, por esporas, fúngicas y víricas.

25 En otro aspecto, la estabilización de la composición se proporciona almacenando las composiciones en un receptáculo que asegure suficiente estabilidad para controlar infecciones o contaminaciones bacterianas, microbianas, por esporas fúngicas y víricas.

Los derivados de los compuestos incluyen sales, y ésteres con alcoholes inferiores, farmacéuticamente aceptables. A este respecto, el término "inferior" incluye residuos con 1 a 6, preferiblemente 1 a 4 átomos de carbono.

Los derivados preferidos son sales farmacéuticamente aceptables.

30 En otro aspecto, las composiciones anteriores descritas incluyen los siguientes compuestos o uno de sus derivados; seleccionándose dichos derivados del grupo que consiste en sales y ésteres farmacéuticamente aceptables con alcoholes inferiores:

N,N-dicloro-2,2-dimetiltaurina;

N,N-dicloro-1,1,2,2-tetrametiltaurina;

35 N,N-dibromo-2,2-dimetiltaurina;

N,N-dibromo-1,1,2,2-tetrametiltaurina;

N,N-dicloro-3,3-dimetilhomotaurina;

o una sal o éster con alcoholes de C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> farmacéuticamente aceptables.

En otro aspecto, las composiciones de la invención además comprenden un vehículo farmacéuticamente aceptable.

40 De nuevo, todos los rasgos, características e intervalos descritos para la invención, en cualquier aspecto, ya descrito como de interés o como particular o no, pueden combinarse unos con otros.

#### Procedimientos para la preparación de N,N-dihaloaminoácidos y derivados

45 Los N,N-dihaloaminoácidos y derivados se preparan mediante la reacción del aminoácido o uno de sus derivados, a partir de los cuales se producen los aminoácidos halogenados, con una fuente de halógeno en condiciones de reacción que conducen al reemplazamiento de dos átomos de hidrógeno en el grupo amino del aminoácido por dos

átomos de halógeno, esto es, átomos de cloro o bromo. Estos procedimientos son conocidos para los químicos expertos en la técnica.

5 En un aspecto de la invención, los aminoácidos que se usan como materiales de partida incluyen taurina y homotaurina. En otro aspecto, estos materiales de partida pueden usarse en forma de sus ésteres o sales. Todos estos materiales de partida son bien conocidos, están comercialmente disponibles, o pueden prepararse por métodos de preparación bien conocidos. Varios de los materiales de partida están comercialmente disponibles, por ejemplo en Sigma-Aldrich.

10 Para producir los N,N-dihaloaminoácidos y sus derivados pueden usarse las siguientes fuentes no exclusivas de halógenos: HOCl o sus sales (por ejemplo, NaOCl o KOCl), sales de N-haloarilsulfonamidas, donde el grupo arilo contiene de 6 a 15 átomos de carbono con 1 ó 2 anillos aromáticos, 6 a 10, ó 6 a 8, átomos de carbono y un anillo aromático, tales como N-halobenceno-sulfonamidas o N-halo-4-alquilbencenosulfonamidas, donde el grupo alquilo es un alquilo inferior de 1 a 4 átomos de carbono, metilo o etilo. Las N-halobencenosulfonamidas o N-halo-4-alquilbencenosulfonamidas son con frecuencia usadas en forma de sus sales, por ejemplo, sales alcalinas, por ejemplo, sus sales de sodio o de potasio. Los reactivos más frecuentemente usados serán N-clorobencenosulfonamida y N-cloro-4-metil-bencenosulfonamida en forma de sus sales de sodio, porque están fácilmente comercialmente disponibles. Otros agentes o fuentes no limitantes de liberación de halógenos pueden ser HClO<sub>2</sub>, N-clorosuccinimida o N-bromosuccinimida, Cl<sub>2</sub>, Br<sub>2</sub>, y agentes clorantes, tales como los usados en piscinas, o combinaciones de los agentes.

20 Otros materiales de partida aminoácidos incluyen 2,2-dimetilhipotaurina, 1,1,2,2-tetrametilhipotaurina, 2,2-dimetiltaurina, 1,1,2,2-tetrametiltaurina, y 3,3-dimetilhomotaurina.

Si una molécula de la fuente de halógeno libera un halógeno, obviamente se usarán al menos dos moléculas de la fuente de halógeno por cada amina de partida de la molécula de aminoácido o derivado. En los ejemplos se ponen de manifiesto más detalles de la preparación de N,N-dihaloaminoácidos y sus derivados.

25 Los compuestos según la presente invención también pueden incluir sus estereoisómeros individuales (enantiómeros y diastereómeros) así como las mezclas racémicas del compuesto. Los isómeros individuales tales como los R, S, RR, SS, RS, SR, etc., puros pueden prepararse tratando la mezcla de isómeros con un agente de resolución ópticamente activo para formar un par de compuestos diastereómeros. Los compuestos diastereómeros pueden separarse y el enantiómero o diastereómero ópticamente puro puede aislarse usando procedimientos bien conocidos en la técnica. Debido a que los diastereómeros tienen distintas propiedades físicas (tales como los puntos de fusión, puntos de ebullición, solubilidades, reactividad, etc.), pueden separarse fácilmente aprovechando estas disimilaridades. Los diastereómeros pueden separarse por cromatografía, o preferiblemente, por técnicas de separación o resolución basadas en diferencias de solubilidad. Una descripción más detallada de las técnicas aplicables a la resolución de estereoisómeros de compuestos a partir de sus mezclas racémicas puede encontrarse en Jean Jacques Andre Collet, Samuel H. Wilen, Enantiomers, Racemates and Resolutions, John Wiley & Sons, Inc. (1981) y en las referencias citadas en el mismo.

30 El material de partida aminoácido se disuelve en un alcohol inferior (por ejemplo, metanol o etanol) y se hace ácido. A esta disolución se añade una disolución acuosa de NaOCl. La reacción da lugar a la cloración del grupo amino y a la precipitación de cloruro de sodio. El disolvente se evapora a baja temperaturas, por ejemplo, por debajo de 30°C y se obtiene un residuo. El residuo se toma en un disolvente y el N,N-dihaloaminoácido se aísla por extracción con un disolvente no miscible con la fase acuosa de alcohol inferior. Similarmente, los N,N-dihalo-aminoácidos pueden prepararse haciendo reaccionar el material de partida aminoácido con HOCl.

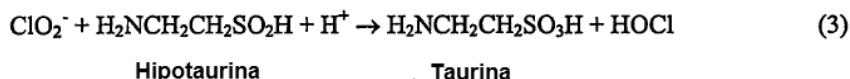
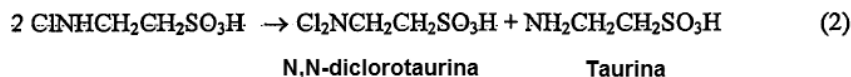
40 Por consiguiente, los compuestos bromo análogos también pueden prepararse con NaOBr como agente halogenante.

45 Según J Marcinkiewicz et al 2000 (J. of Inflammatory Research 49, 280-289) la NNDCT (N,N-diclorotaurina) puede sintetizarse en disolución haciendo reaccionar HOCl con taurina a pH 5. La NNDCT también puede generarse en la oxidación de la sal de Bunte (H<sub>2</sub>NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S-SO<sub>3</sub>H) (Chinake et al. Oxyhalogen-sulfur chemistry: kinetics and mechanism of the oxidation of a Bunte salt 2-aminoethanethiolsulfuric acid by chlorite. Phys. Chem. Chem. Phys. 2001; 3:4957-4964) e hipotaurina (H<sub>2</sub>NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>H) mediante clorito (ClO<sub>2</sub><sup>-</sup>) (Martincigh, B. S.; Mundoma, C.; Simoyi, R. H.; Antioxidant chemistry: Hypotaurine-taurine oxidation by chlorite. J. Phys. Chem. A. 1998; 102:9838-9846).

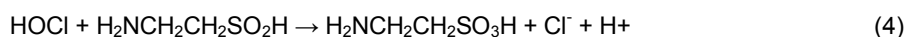
Las reacciones se muestran en las ecuaciones 1-6:



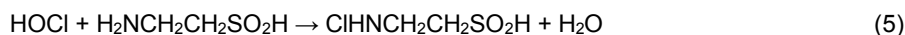
La N-clorotaurina se desproporciona para formar N,N-diclorotaurina y taurina en disolución ácida:



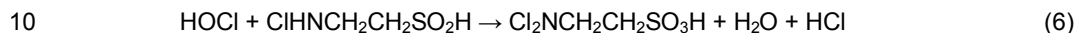
5 El HOCl puede oxidar rápidamente la hipotaurina restante a taurina:



u oxidar hipotaurina a N-clorohipotaurina:

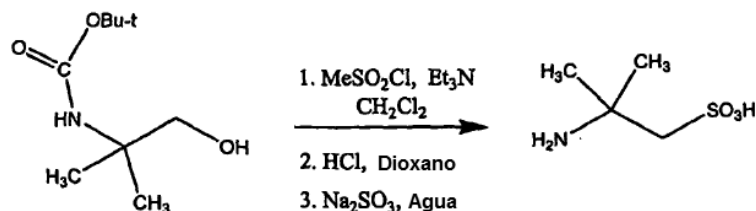


En condiciones muy ácidas, el HOCl oxida la N-clorohipotaurina a N,N-diclorotaurina:

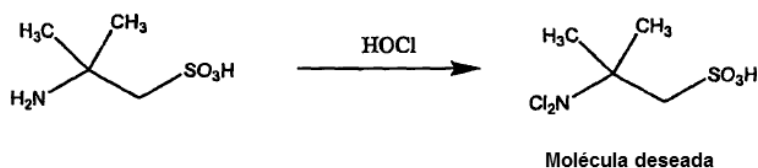


Los compuestos con al menos un grupo alquilo inferior unido al átomo de carbono al cual está unido el grupo amino son aminoácidos dihalogenados más estables.

Estos compuestos pueden prepararse como sigue:



*Tet. Let. 1996, 37(40), 7319-7322*



15 Las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos de la invención pueden prepararse haciendo reaccionar las formas de ácido o base libre de estos compuestos con una cantidad estequiométrica o mayor de la base o del ácido apropiado en agua o en un disolvente orgánico, o en una mezcla de los dos; en general, por ejemplo, medios no acuosos como éter, acetato de etilo, etanol, isopropanol. Las sales de la invención también pueden prepararse por intercambio iónico, por ejemplo.

20 Las sales también pueden prepararse haciendo reaccionar los N,N-dihaloaminoácidos mediante otras maneras conocidas per se que incluyen un método análogo al método descrito en la Solicitud de Patente Alemana 4041703, de W. Gottardi.

Las sales de sodio de los N,N-dihaloaminoácidos pueden convertirse en ésteres de alquilo inferior haciendo reaccionar la sal de sodio con un sulfato de dialquilo inferior, tal como sulfato de dimetilo o dietilo en presencia de bicarbonato de sodio.

#### Métodos para usar los N,N-dihaloaminoácidos y derivados

5 Los N,N-dihaloaminoácidos y sus derivados son agentes antimicrobianos que matan microbios en concentraciones relativamente bajas y pueden ser tolerados por las células eucariotas en concentraciones significativamente altas. Este intervalo de actividad terapéutica e índice terapéutico favorable es absolutamente crítico considerando el papel fisiológico de las cloraminas en la destrucción de patógenos *in vivo*. Para un producto antimicrobiano que se aplique a tejidos, tales como áreas oftálmicas, de la piel o cualquier otra área sensible, su seguridad y eficacia no pueden comprometerse. Así, el uso de tal o tales productos en seres humanos para tratar infecciones está soportado por los resultados positivos de los presentes inventores.

10 Los N,N-dihaloaminoácidos y sus derivados tienen las siguientes áreas potenciales de aplicación: limpiadores de lentes de contacto, inactivación bacteriana, oftálmica, preparación quirúrgica general, desinfección de instrumentos quirúrgicos, desinfección de dispositivos e instrumentos médicos, desinfección de instrumentos dentales y aplicación en higiene alimentaria, incluyendo la desinfección de áreas superficiales. También son útiles en formulaciones de vacunas (como conservantes y potencialmente como compuestos auxiliares), como compuestos con efecto viricida, para la inactivación víricas tanto de las clases de virus DNA y RNA que incluyen HIV, hepatitis A, virus sincitial respiratorio, virus del Nilo Occidental, HSV-1, HSV-2, SARS, virus de la gripe y para-gripe, picomavirus, y virus vacuna (como un modelo para Poxvirus). Además, estos compuestos también son útiles para el tratamiento de infecciones fúngicas, tales como *Rinosinusitis* aguda o crónica u otras infecciones fúngicas tales como *Otitis*, *Dermatitis*, *Bronquitis*, *Neumonía* tal como la producida por el hongo *Pneumocystis carinii*, infecciones fúngicas de los órganos sexuales, tales como *Colpitis*, *Endometritis*, *Balnitis*, infecciones fúngicas del tracto gastrointestinal, tales como *Stomatitis*, *Esofagitis*, *Enteritis*, o infecciones fúngicas de la uretra, tales como *Pielonefritis*, *Ureteritis*, *Cistitis*, o *Uretritis*. Además, las composiciones descritas en la presente memoria tienen actividad antimicrobiana contra muchos otros microorganismos, que incluyen *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *S. aureus* resistente a la meticilina (MRSA), *Pseudomonas aeruginosa*, *Lactobacillus*, levaduras, enterococcus resistentes a la vancomicina, mohos, y esporas, que incluyen esporas de ántrax. En particular, las disoluciones de la presente invención pueden ser útiles en el tratamiento de varias cepas diferentes de *Bacillus anthracis*. Las bacterias resistentes a la vancomicina, MRSA, y otras son fácilmente destruidas por las composiciones de la presente invención.

15 Las composiciones de la invención pueden usarse en un método para el tratamiento de varias afecciones médicas seleccionadas de los grupos que consisten en promover la curación de las heridas, la reducción de patógenos en heridas abiertas, la descontaminación de heridas, la desinfección o descontaminación ocular, la desinfección oral, terapia antifúngica, cirugía oftálmica, oral y odontología, aplicaciones otológicas, reducción de patógenos en infecciones pulmonares, reducción de patógenos en quemaduras, lavado, reducción de la carga infecciosa en órganos para trasplantar, reducción de la carga bacteriana en el trasplante de tejido autólogo o artificial, terapia antifúngica para la desinfección oral, tratamiento de biopelículas para la fibrosis cística u otras enfermedades que producen biopelículas, tratamiento de infecciones víricas, tratamiento de enfermedades de la piel, y reparación y regeneración de tejidos, método que comprende usar la disolución de la invención aplicando la disolución al sitio en el que se requiere el tratamiento.

20 La dosificación para usar en heridas crónicas de un tamaño aproximado de 25 cm cuadrados podría estar en el intervalo de 30 mL de disolución que contiene de 2 a 200 mg de ingrediente activo, donde el ingrediente activo es NNDCT aplicada una a diez veces por día. En ciertos casos, la composición puede contener 0,1 a 100 mM de ingrediente activo. Las dosificaciones en otras aplicaciones se ajustarían al área superficial dependiendo de dónde se requiera la actividad antimicrobiana y de la gravedad de la infección.

#### Las composiciones de la invención

En un aspecto, las composiciones en forma de disoluciones están osmóticamente equilibradas, y tienen una mínima citotoxicidad.

25 En otro aspecto, las composiciones descritas en la presente memoria tienen un índice terapéutico de aproximadamente 1000 a aproximadamente 5.000, definido por la relación de su índice de citotoxicidad a una concentración 50% inhibitoria (IC<sub>50</sub>) en una hora tanto frente a células epiteliales L929 de pulmón de ratón como fibroblastos primarios de ser humano en sus Mínimas Concentraciones Bactericidas contra *Escherichia coli* ATCC 11229 a 37°C durante una hora.

Debido a que las composiciones de la presente invención no son tóxicas y tienen propiedades antibacterianas, son útiles en cualquier aplicación en la que sean deseables propiedades antimicrobianas. Tales aplicaciones incluyen, sin limitación, tratamiento de heridas, quemaduras y úlceras bucales; irrigación; limpieza de sitios en los tejidos (por ej., pre- y post-operatorio); aplicaciones oftálmicas (por ej., en disoluciones para la limpieza de lentes de contacto o para la irrigación del ojo antes, durante o después de la cirugía oftálmica); para aplicaciones dermatológicas, psoriasis; y numerosas aplicaciones que son fácilmente evidentes para un experto en la técnica. Las aplicaciones también incluyen la eliminación o reducción de patógenos en superficies que incluyen equipos médicos, instrumentos, dispositivos o comida (sin limitarse a carne, frutas, vegetales) y superficies de contacto para alimentos que incluyen la eliminación o reducción de biopelículas bacterianas. Al contrario que muchas composiciones anti-infecciosas usadas en aplicaciones similares, las composiciones de la invención tienen de mínimos a ningún efecto secundario.

Las composiciones de la invención que comprenden N,N-dihaloaminoácidos o sus derivados pueden incorporarse a una variedad de aplicaciones, que incluyen vendas o vendajes de heridas. Las composiciones en forma de disoluciones ácidas fisiológicamente equilibradas pueden usarse en combinación con vendas especialmente diseñadas en un protocolo para el tratamiento de heridas. La venda especializada puede incluir una apertura o "ventana" a través de la cual pueden aplicarse materiales para el tratamiento tópico, tales como la disolución de la presente invención.

En la presente memoria también se describe un artículo de fabricación que comprende la composición de la invención envasada en un recipiente. Las superficies del recipiente que están en contacto con la composición de la invención están fabricadas de un material que no es reactivo con un agente oxidante.

La estabilidad de una disolución de N,N-dihaloaminoácidos y sus derivados permite el uso de diferentes formas de envasado que serían prácticas para ser usadas por pacientes. La disolución puede envasarse en varias botellas de vidrio ámbar de 30 mL de uso único con tapas roscadas revestidas de Teflón y selladas con cinta para asegurar la estanqueidad a los gases. En un aspecto, la misma disolución puede envasarse en una botella de vidrio ámbar de 250 mL o en una botella de plástico no reactivo de 250 mL. Sin embargo, pueden usarse botellas de hasta 5 litros, debido a que tales volúmenes mayores son prácticos para el tratamiento de quemaduras. El almacenamiento en estos receptáculos asegura la estabilidad a largo plazo requerida por los usos de las composiciones descritas en detalle en la presente memoria. Adicionalmente, el envasado puede incluir un sistema de doble cámara en el que un componente A se mezcla con un componente B para formar el producto final, N,N-dihaloaminoácido o sus derivados.

En un aspecto, las disoluciones de la presente invención pueden almacenarse en recipientes de un solo uso. En otro aspecto, las disoluciones de la invención pueden almacenarse en recipientes de un solo uso de varios tamaños y configuraciones diferentes, y que tienen diferentes volúmenes adecuados para las aplicaciones deseadas que se describen en la presente memoria. En algunas aplicaciones, por ejemplo, la disolución de la invención puede almacenarse en recipientes de 30 mL de un solo uso, opcionalmente desechables. En un aspecto, la presente composición puede almacenarse en polvo junto con excipientes farmacéuticamente aceptados en un gas inerte a temperatura ambiente.

Las composiciones de la invención pueden incluir los siguientes vehículos farmacéuticamente aceptables: cloruro de sodio para obtener isotonicidad, agentes amortiguadores del pH, estabilizantes, disolventes, agentes aromatizantes (en el caso de administración oral o nasofaríngea y en la industria alimentaria), agentes conservantes, diluyentes, agentes de extensión y otras sustancias auxiliares o excipientes. Ejemplos específicos de vehículos y excipientes farmacéuticamente aceptables que pueden usarse se describen en Remington: The Science and Practice of Pharmacy, A. Gennaro, ed., 20<sup>a</sup> edición, Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia, PA; Advances in Pharmaceutical Sciences (David Ganderton, Trevor Jones, Eds., 1992); Advances in Pharmaceutical Sciences Vol 7. (David Ganderton, Trevor Jones, James McGinity, Eds., 1995), cuyas descripciones se incorporan a la presente memoria en su totalidad. En general, el agua, un aceite adecuado, una disolución salina, alcoholes inferiores y glicoles tales como propilenglicol o polietilenglicoles pueden ser vehículos adecuados para disoluciones. En un aspecto, las disoluciones contienen el ingrediente activo en una forma soluble en agua o en un medio acuoso, por ejemplo como una sal, junto con agentes estabilizantes adecuados, y si es necesario, sustancias amortiguadoras del pH. Además, las disoluciones pueden contener conservantes, tales como cloruro de benzalconio, metil o propilparabén, y clorobutanol. Vehículos farmacéuticos adecuados se describen en Remington: The Science and Practice of Pharmacy, el texto de referencia estándar en este campo anteriormente identificado.

Las composiciones pueden además comprender otros ingredientes activos, tales como HOCl u otros agentes antibacterianos en tanto y cuanto no interfieran con la estabilidad o función de los N,N-dihaloaminoácidos de la invención.



Las cantidades o concentraciones of N,N-dihaloaminoácido en las composiciones de la invención pueden variar en amplios intervalos. Por ejemplo, una composición puede contener de 0,001 a 100% en peso de la composición del N,N-dihaloaminoácido. En el caso de 100%, la composición puede aplicarse en la forma de un polvo sin ninguna sustancia vehículo. Un intervalo típico de la composición incluirá 0,1 a 95% en peso de la composición del N,N-dihaloaminoácido, por ejemplo, 0,1 a 50%, ó 0,1 a 10%, por ejemplo, 0,5 a 5%. En disoluciones, usualmente se aplicará una menor concentración del N,N-dihaloaminoácido. Por ejemplo, una concentración de 1 a 2% puede ser apropiada en el caso de un enjuague o de un nebulizador.

En el caso de aplicación nasofaríngea puede usarse un catéter para la aplicación nasal que contenga una disolución al 1% del N,N-dihaloaminoácido o su sal con un pH de 3,5 a 5 durante varias semanas usando aproximadamente 10 a 15 mL de la disolución en cada tratamiento. Después de cada tratamiento, la disolución de lavado se extraerá por succión.

#### Métodos específicos para usar las composiciones de la invención

En un aspecto, las composiciones de la invención se administran o usan tópicamente.

Las disoluciones ácidas de la presente invención pueden usarse para tratar varios pacientes con heridas profundas, que no responden a las medicaciones usuales y a tratamientos aplicados localmente. En un aspecto, la presente invención proporciona un método para el tratamiento de varias afecciones médicas tal como promoviendo el curado de las heridas, la reducción de patógenos en heridas abiertas, la descontaminación de las heridas, la desinfección o descontaminación ocular, la desinfección oral, la terapia antifúngica, aplicaciones oftálmicas, la reducción de patógenos en infecciones pulmonares, la reducción de patógenos en quemaduras, el lavado, la reducción de la carga infecciosa en órganos para trasplantar, la reducción de la carga bacteriana en el trasplante de tejidos autólogos o artificiales, la terapia antifúngica para la desinfección oral, el tratamiento de biopelículas para la fibrosis cística y enfermedades relacionadas, el tratamiento de infecciones víricas, el tratamiento de enfermedades de la piel, y la reparación y regeneración de tejidos, método que comprende usar la disolución de la presente invención aplicando la disolución al sitio en el que se requiere el tratamiento. Ejemplos no limitantes de una biopelícula que puede ser tratada usando las disoluciones de la presente invención incluyen los citados en el artículo de revisión titulado "Is there a role for quorum signals in bacterial biofilms?" de S. Kjelleberg y S. Molin, PMID: 12057677 (indexado por PubMed para MEDLINE).

Las disoluciones de la invención pueden ser efectivas en la reducción de la carga bacteriana mejorando así el curado de las heridas. Las disoluciones pudieron tolerarse bien, mejorar la granulación del tejido de la herida, reducir la necesidad de desbridamiento en comparación con las disoluciones de la técnica anterior, informando los pacientes de menor dolor durante su tratamiento.

#### Cuidado oral

La disolución ácida de la invención puede usarse para tratar úlceras bucales (úlceras en la boca) o herpes labial mediante el enjuagado del área afectada. Por ejemplo, la disolución puede usarse mojando el herpes labial 3-4 veces por día, cada vez con 2-3 aplicaciones, y poniendo la disolución en contacto con el herpes durante 20-30 segundos. La disolución también puede usarse como un enjuague bucal para la higiene dental y de la boca y para controlar la infección. En este caso, la disolución puede usarse como una disolución para combatir infecciones en la garganta. La disolución puede aplicarse a áreas más específicas con la ayuda de un bastoncillo de algodón. La disolución puede usarse una o varias veces por día según las necesidades y la afección del paciente.

#### Cuidado oftálmico

La disolución ácida fisiológicamente equilibrada de la invención puede usarse en lugar de una disolución salina para separar un cuerpo extraño de, para enjuagar, o para irrigar los ojos. También puede aplicarse tópicamente antes o después de la cirugía para desinfectar un ojo y los tejidos circundantes. La disolución puede usarse una o varias veces por día según las necesidades y la afección del paciente. La disolución puede aplicarse goteándola directamente en los ojos cuando sea necesario. También puede aplicarse mojando una gasa y aplicando la gasa saturada a los ojos durante 1 ó varios minutos. También puede usarse para limpiar los ojos frotando suavemente los ojos con la gasa saturada. La disolución también puede verterse en un pequeño recipiente lavador de ojos, a continuación el recipiente lavador de ojos se invierte sobre el ojo y el párpado se abre y cierra varias veces.

La disolución ácida fisiológicamente equilibrada de la invención puede usarse para el tratamiento de desinfección o descontaminación ocular. Además, puede usarse para reemplazar al nitrato de plata en la desinfección de los ojos de neonatos.

5 Las disoluciones de la presente invención pueden usarse para la limpieza de los ojos en adultos y en pediatría. Por ejemplo, varias infecciones víricas, infecciones fúngicas o bacterianas, o agentes patógenos pueden tratarse eficazmente con la disolución de la presente invención. Ejemplos no limitantes de agentes patógenos que podrían ser tratados con éxito con la disolución de la presente invención incluyen chlamydia trachomatis, gonorrea así como otras infecciones bacterianas, fúngicas y víricas.

10 El lector verá que la disolución de la invención tiene aplicaciones en el tratamiento de muchos tipos diferentes de heridas, que incluyen, sin limitación, úlceras diabéticas, gangrena, úlceras venosas, úlceras de decúbito, úlceras por presión, heridas debido a mordeduras, heridas traumáticas agudas, heridas quirúrgicas y quemaduras. La composición de la invención también es útil como una disolución de irrigación, por ejemplo, durante procedimientos dentales, periodontales, y oftálmicos. La composición de la invención también puede usarse para la limpieza pre y post-operatoria de sitios en los tejidos, y como una disolución para hacer gárgaras para el tratamiento de úlceras bucales.

Métodos de usar una disolución para la desinfección de la piel:

15 La disolución de la presente invención también puede usarse para tratar piel que está infectada. En una piel de un paciente que muestra signos médicos de infección, la disolución de la presente invención puede aplicarse directamente al área de la piel que está infectada. Las propiedades desinfectantes de la disolución pueden advertirse después de al menos una aplicación de la disolución sobre la piel infectada usando métodos estándar de aplicación conocidos en la técnica.

Reducción de patógenos en infecciones pulmonares:

20 La disolución de la presente invención puede usarse para la reducción de patógenos en infecciones pulmonares. Por ejemplo, varias infecciones víricas o bacterianas y fúngicas pueden tratarse eficazmente con la disolución de la presente invención. Ejemplos no limitantes de infecciones que pueden tratarse eficazmente usando la disolución de la presente invención incluyen esporas de ántrax presentes en los pulmones, y la reducción en los pulmones de las bacterias que provocan la neumonía, que incluyen las bacterias tipo estreptococos y similares.

25 Métodos de usar las disoluciones de la invención en ginecología:

30 La composición de la presente invención puede usarse para el tratamiento de infecciones ginecológicas, tales como infecciones del tracto urinario, y similares. Por ejemplo, varios microorganismos, levaduras (por ej., *Monilia*, *Candida albicans*, etc.), infecciones bacterianas, HSV-2, HIV u otros agentes patógenos pueden tratarse eficazmente con la disolución de la presente invención. Opcionalmente, la aplicación de las disoluciones de la presente invención puede usarse con otras medicaciones para el tratamiento de infecciones ginecológicas. Por ejemplo, el uso de un lavado del canal del parto en mujeres embarazadas que se sospecha que tienen enfermedades venéreas, y potencialmente como disolución de baño y limpieza de bebés justo después del nacimiento en las habitaciones de entrega de los hospitales o como desinfectantes de catéteres y derivaciones en la cámara de diálisis.

Método de uso como tratamiento de infecciones tópicas

35 Los compuestos de la presente invención pueden usarse para tratar infecciones tópicas incorporándolos en cremas, pomadas o lociones para uso en tales afecciones. Tales cremas, pomadas o lociones podrían usarse para una amplia variedad de afecciones de la piel y podrían incorporar reforzantes de la penetración con el fin de administrar la actividad antimicrobiana del compuesto a los microbios presentes debajo de las capas externas (epidermis) de la piel.

40 Método de uso para prevenir infecciones en sitios quirúrgicos

45 Las disoluciones isotónicas de la presente invención pueden usarse como irrigantes durante la cirugía para impedir el desarrollo de infecciones en sitios quirúrgicos, que frecuentemente conducen a prolongadas hospitalizaciones y, ocasionalmente, a la muerte. El uso de una disolución de la presente invención en lugar de una disolución salina podría reducir sustancialmente los riesgos de tales infecciones especialmente en el caso de cirugía gástrica y de operaciones prolongadas, en las que la tasa de infecciones puede ser tan alta como 10%.

Método de uso para la desinfección de dispositivos médicos e implementos quirúrgicos

La disolución de la presente invención puede usarse para la reducción de patógenos en las superficies de dispositivos médicos e implementos quirúrgicos para prevenir la infección del paciente sobre el que se usan los implementos y dispositivos, o en quien se implantan.

La disolución también puede usarse para la reducción o eliminación de infecciones que se producen en los puertos de entrada de catéteres y derivaciones que son particularmente susceptibles a tales infecciones.

Método de uso para la desinfección de superficies

- 5 La disolución de la presente invención puede aplicarse directamente por medio de la administración de un dispositivo que cree una neblina (aerosolización) en las superficies de una habitación, interior de un vehículo u otro espacio muy confinado con el fin de reducir o eliminar los patógenos infecciosos que se sospeche pudieran estar presentes. En tal aplicación, podría usarse para descontaminar catéteres de operación en los que se han detectado patógenos infecciosos, o habitaciones, vehículos y otras superficies en las que se han dispersado agentes de guerra biológica.

Método de uso para mejorar la seguridad alimentaria

- 10 La disolución de la presente invención puede usarse para reducir patógenos en alimentos (que incluyen, sin limitación, carnes, frutas y vegetales). La disolución podría aplicarse como un lavado o nebulización sobre el alimento, o el alimento podría sumergirse en la disolución. La taurina sería el principal producto residual de tal aplicación y la taurina es un nutriente esencial que se considera es seguro en la alimentación de seres humanos.
- 15 La disolución de la presente invención también puede aplicarse a superficies e implementos usados en la preparación de alimentos para prevenir la transferencia de patógenos desde tales superficies e implementos al alimento.

Método de uso como un conservante antimicrobiano

- 20 Los compuestos de la presente invención pueden usarse como un medio de asegurar que los microbios no pueden sobrevivir en las disoluciones que se pretenden usar en inyección, infusión o para usar en el ojo por incorporación de una cantidad apropiada de tal compuesto en la disolución en el momento de fabricación.

Método de uso como agente antimicrobiano

- 25 La disolución de la presente invención puede usarse como un medio de desinfectar segura y rápidamente las manos de los cirujanos y enfermeras para reducir el riesgo de transportar agentes infecciosos al sitio de la operación. Adicionalmente, la disolución de la presente invención puede usarse para eliminar el agente infeccioso de la piel de pacientes (pre y post operatorio) en el área de una incisión quirúrgica.

Método de cuidado de heridas

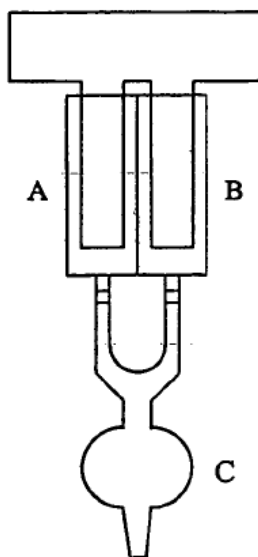
- Los pacientes que padecen de heridas duraderas que no sanan deben ser tratados con la composición ácida de la presente invención diariamente, típicamente aproximadamente una o dos veces por día.
- 30 La disolución de la invención puede usarse como sigue: se premoja un material con gasa o una gasa con bastante disolución para saturarla y a continuación se exprime para eliminar la disolución en exceso. Esto separa las especies presentes en la gasa que pudieran reaccionar con y reducir la efectividad de la disolución de la invención. Después de este procedimiento la gasa está humectada, pero no mojada. A continuación, se aplica disolución adicional para humectar completamente la gasa, la cual se aplica entonces inmediatamente a la herida. Alternativamente, la gasa puede aplicarse a la herida y luego aplicarse disolución adicional. Típicamente, el sitio de la herida es recubierto con
- 35 la gasa mojada con la disolución y, opcionalmente, puede aplicarse una gasa con vaselina en la parte superior de la herida recubierta para mantenerla húmeda y libre de gérmenes contaminantes. El sitio de la herida se envuelve a continuación con vendajes para heridas como es normal en la técnica. La disolución también puede usarse para limpiar una herida vertiéndola directamente sobre el sitio de la herida para eliminar cualquier tejido necrótico mediante un procedimiento mecánico, y también como limpiador o irrigante.
- 40 El paciente también puede hacer uso de un "kit para el cuidado de heridas", proporcionado por NovaCal, el cual permite que el paciente vierta periódicamente la disolución de la presente invención sobre el lugar de la herida sin tener que eliminar el vendaje. Este kit proporciona un uso fácil, portabilidad y reduce drásticamente la exposición de la herida a la reinfección. El kit para el cuidado de heridas incluye un envase que contiene la disolución de la invención y material para vendar. Con frecuencia, el kit contiene un envase que contiene la disolución de la invención
- 45 y una venda especializada para usar en combinación con la disolución. La venda especializada mantiene seca la piel que rodea a la herida mientras se trata la herida. Además, la venda puede aplicarse en la consulta del médico o en un hospital, continuando el paciente el cuidado en su hogar; puede aplicarse y usarse en casa bajo las instrucciones de un médico; o, para lesiones menores, el kit para el cuidado de heridas puede usarse como un tratamiento "sin receta" por el propio paciente.

Envasado para ciertos usos

En otro aspecto de la invención, las disoluciones de la presente invención pueden envasarse para que contengan la disolución en recipientes individuales de un único uso. Los recipientes de único uso pueden usarse, por ejemplo, para aplicar en un único cambio de vendaje o sus equivalentes. Los recipientes de un único uso de la presente invención pueden usarse junto con las vendas normalmente usadas. En otra realización de la invención, un kit para el cuidado de heridas puede comprender recipientes de un único uso de las disoluciones de la presente invención con vendas especializadas para varias aplicaciones.

En otro aspecto de la invención, las disoluciones de la presente invención pueden producirse *in situ* mediante el uso de un embalaje o aparato de doble cámara como se muestra en la imagen, con o sin una tercera cámara de mezclado.

**Cámara doble para la preparación de NNDCT en el sitio**



La doble cámara puede consistir en dos jeringas o bolsas. Para obtener una disolución de NNDCT con una concentración de 3,2 mM a pH 3,5, por ejemplo, la cámara A se rellena con disolución de NaOCl 12,8 mM, la cámara B se rellena con taurina 3,3 mM disuelta en una disolución salina acidificada al 1,8%. La acidez de la disolución en la cámara B se ajusta con HCl 1 M para que cuando las disoluciones de las cámaras se mezclen en un tubo común de administración o en una cámara C de mezclado, la reacción dará la concentración deseada de NNDCT y el valor de pH deseado. Puesto que la taurina es estable en disolución ácida, y el NaOCl es estable a temperatura ambiente, el uso de un método de preparación en el sitio descrito anteriormente puede evitar el problema de la estabilidad de la disolución de NNDCT.

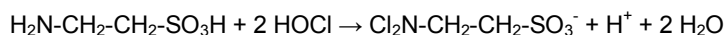
Ejemplo 1 (Referencia - no parte de la invención reivindicada)

Método de preparación

Reactivos: todas las disoluciones se hicieron con agua desionizada o Millipore. La disolución de NaOCl (6%) se adquirió en VWR. La Taurina se adquirió en Sigma. NaCl y HCl son grado reactivo.

Síntesis y caracterización of N,N-diclorotaurina (NNDCT)

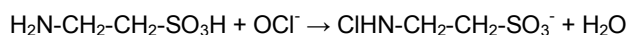
En este estudio, el compuesto NNDCT se preparó disolviendo taurina en polvo en disolución de HOCl (pH 3,5) en una relación HOCl/taurina de 2.



Para obtener 1 litro de NNDCT 1,6 mM en disolución de NaCl al 0,9% a pH 3,5, se añaden 8,6 g de NaCl en un matraz volumétrico de 1000 mL, a continuación se añaden 500 mL de agua Millipore al matraz para disolver la sal. Se

añaden 2 mL de HCl 1 M en la disolución de NaCl, seguido por la adición de 22 mL de NaOCl 0,158 M. La disolución se mezcla. A continuación, se añaden 0,267 g de taurina al matraz y se llena el matraz volumétrico hasta la marca con agua Millipore. La disolución se agita durante 5 minutos.

- 5 NNDCT tiene una absorbancia máxima a 300 nm con una absorptividad molar de  $370 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . Cuando se añade la disolución de  $\text{OCl}^-$  (pH 9,5) a la disolución de taurina, el único producto formado fue N-clorotaurina (NCT) ( $\text{ClHN-CH}_2\text{-CH}_2\text{-SO}_3^-$ ).



- 10 NNDCT y NCT son espectrofotométricamente distinguibles. NCT tiene una absorbancia máxima a 252 nm. El rendimiento de NNDCT se calculó a partir de su absorbancia a 300 nm. Este método de preparación da un rendimiento de NNDCT de 91%. La titulación yodométrica da una relación  $I_2/\text{NNDCT}$  de 2. Esto sugiere que NNDCT retiene los dos equivalentes oxidantes de HOCl. Ambos restos de cloro en NNDCT son capaces de oxidar al ion  $\text{I}^-$  a  $\text{I}_2$ . NNDCT se descompone en disolución, pero es más estable a baja temperatura. Se realizó un estudio de estabilidad de una disolución de NNDCT (pH 3,5) a tres temperaturas, 4 °C, temperatura ambiente y 40 °C. La disolución se selló en ampollas. La estabilidad de NNDCT a las tres temperaturas sigue el siguiente orden: 4 °C > temperatura ambiente > 40 °C. En 4 semanas, se pierde un 5,4% de NNDCT cuando se almacena en un frigorífico (4 °C) ( $[\text{NNDCT}]_{\text{inicial}} = 1,47 \text{ mM}$ ).

La N,N-diclorotaurina es muy soluble en agua en un intervalo de pH de 1 a 10. La N,N-diclorotaurina puede identificarse y determinarse cuantitativamente por espectroscopía UV. La N,N-diclorotaurina tiene una absorbancia UV máxima a 300 nm y una absorptividad molar de  $370 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .

- 20 La NNDCT no es volátil. Una disolución 1,47 mM en disolución salina al 0,9% a pH 3,5 se rellena en dos botellas de vidrio. Una botella se tapó herméticamente y otra sin apretar. No hubo ninguna diferencia en la concentración de NNDCT en las dos botellas después de 4 semanas a temperatura ambiente.

- 25 El aislamiento de la forma pura en polvo de NNDCT y el almacenamiento en atmósfera inerte proporciona una fuente más estable de NNDCT. Adicionalmente, la reformulación de la matriz sólida de NNDCT en un formato de píldora ayuda a la estabilización de NNDCT. Esta formulación en forma de píldoras ha sido seleccionada para prevenir la descomposición a la vez que proporciona facilidad de uso en la aplicación farmacéutica pretendida (desinfección de lentes de contacto, otras aplicaciones).

Ejemplo 2 (Referencia - no parte de la invención reivindicada)

Actividad antimicrobiana

- 30 **Actividad bactericida:**

- Para determinar la actividad bactericida, los presentes inventores usaron *Escherichia coli* (ATCC 11229). El cultivo bacteriano se diluyó en disolución salina estéril para preparar inóculos. Se transfirieron varios artículos de ensayo a tubos individuales que ya contenían  $1,0 \times 10^5$  a  $2,0 \times 10^5$  Unidades Formadoras de Colonias (CFU)/mL de bacterias y se mezclaron formando suavemente un vórtice y a continuación se incubaron a 37°C durante 1 ó 24 horas. En un intento de mimetizar en la medida de lo posible las condiciones que pudieran producirse *in vivo* si los artículos de ensayo se usaran como antisépticos, se realizó la extensión bacteriana en una placa Petri inmediatamente después del tiempo de exposición designado sin la adición de un agente de neutralización, e independientemente con la adición de un agente de neutralización (como control). Así, se separaron 0,1 mL después de tiempos de exposición de 1 ó 24 horas y se extendieron en placas. Las placas se incubaron a 37°C, y se contó el número de bacterias mediante el recuento directo de colonias para numerar las bacterias supervivientes como CFU/mL. Se obtuvieron 35 controls positivos de crecimiento con disolución salina estéril al 0,9%. Todos los artículos de ensayo se ensayaron tres veces. Los resultados se tabularon para mostrar la comparación del intervalo de efectividad antimicrobiana de HOCl,  $\text{OCl}^-$ , NNDCT y disolución salina al 0,9% a varios valores de pH. A pH 3,5, NNDCT mostró un intervalo de 40 concentraciones antimicrobianas efectivas entre 0,0149 y 1,49 mM en 60 min, y un intervalo de concentraciones antimicrobianas efectivas entre 0,000149 y 1,49 mM en 24 h, mientras que el intervalo de concentraciones antimicrobianas efectivas de HOCl comenzó en 0,016 en 60 min y en 0,0016 mM en 24 h. A pH 3,5, NNDCT fue 45 mejor o tan efectivo como HOCl contra *E. coli*.

- En estos estudios, para el primer tiempo los presentes inventores han demostrado (en paralelo) los perfiles bactericidas y de toxicidad celular de las N-cloraminas en comparación con varios artículos de ensayo. Tanto N-clorotaurina (NCT) como N,N-diclorotaurina (NNDCT) se sintetizaron a una concentración fisiológica de NaCl de 50 0,9% con pH controlado según procedimientos descritos anteriormente. Estas disoluciones se ensayaron respecto a

sus propiedades fisicoquímicas antes de analizar sus actividades biológicas. Las disoluciones diluidas de NCT y NNDCT son incoloras e isotónicas y exhiben una actividad antimicrobiana excepcionalmente rápida. La producción de estos oxidantes parece que es dependiente del pH. NCT se forma exclusivamente a pH alcalino, mientras que NNDCT se forma a pH ácido.

- 5 Ensayos comparativos antimicrobianos usando NNDCT en la disolución de la presente invención a pH 5,0 y 3,5 y NCT a pH 9,5 demostraron una eficiencia para matar bacterias (*E. coli*) de aproximadamente 300 veces más para NNDCT a pH 3,5 que para NNDCT a pH 5,0 y una eficiencia para matar de 1000 veces más para NNDCT a pH 3,5 en comparación con NCT a pH 9,5 dentro de un tiempo de exposición de 60 min a 37 °C (Tabla 1).

Tabla 1. Sumario de productos

Producto	Color	pH	Tonicidad	Estado físico	MBC (µg/mL)
NCT	Transparente	9,5	Isotónica	Disolución	142,5
NNDCT	Transparente	5,0	Isotónica	Disolución	38,0
NNDCT	Transparente	3,5	Isotónica	Disolución	0,136
MBC es la concentración bactericida mínima					

10

La actividad antimicrobiana y el tiempo de muerte no sólo fueron dependientes de la concentración sino que también aumentaron marcadamente disminuyendo el pH. NCT es menos antimicrobiana que NNDCT para la misma concentración por un factor de 1000 veces.

Ejemplo 3 (Referencia - no parte de la invención reivindicada)

15 **Ensayo de citotoxicidad:**

La citotoxicidad se evaluó mediante un sistema de ensayo colorimétrico, inicialmente descrito por Scudiero *et al.*, usando ácido 3'-(fenilamino-carbonil)-3,4-tetrazolio-bis(4-metoxi-6-nitro)bencenosulfónico hidrato (XTT), ensayo de viabilidad celular ProCheck™ (Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines, descrito por Scudiero DA, Shoemaker RAH, Paul KD, Monks A, Tierney S, Nofziger TH, Currens MJ, Seniff D, Boyd MR. Cancer Res. 1988 Sep 1;48(17):4827-33). Enfoques similares para determinar la viabilidad celular son usados por otros investigadores. Se usaron tres tipos de células: células epiteliales de pulmón de ratón (L929), células primarias tipo fibroblastos de piel de ser humano y células primarias tipo queratinocitos de ser humano cultivadas en medio Eagle modificado de Dulbecco y medio definido de queratinocitos con los factores de crecimiento correspondientes más antibióticos. La células se tripsinizaron y se contaron en un microscopio y se sembraron en una placa de fondo plano de 96 pocillos a razón de 1000 a 2000 células por pocillo. Se dejó que las células crecieran durante la noche a 37°C. El día siguiente, el medio de cultivo de tejidos se separó y las células se enjuagaron con medio recién preparado 1X y luego se dejaron en 50 µL de medio de cultivo de tejidos. Se prepararon artículos de ensayo como diluciones de 2 veces y se añadieron 200 µL a cada serie de 4 pocillos (volumen total por pocillo = 250 µL). Las células se expusieron a los artículos de ensayo durante 60 min a temperatura ambiente. Inmediatamente después del tiempo de exposición, el artículo de ensayo de cada pocillo se separó y las células fueron alimentadas con 250 µL de medio recién preparado. Las placas se incubaron a 37°C durante 18-20 horas. Al día siguiente se separó el medio de nuevo y se reemplazó con 100 µL/pocillo of medio recién preparado que contenía 10/100 µL de reactivo XTT. Las células se incubaron en condiciones de crecimiento (incubadora humidificada, CO<sub>2</sub> al 5% a 37°C), protegidas de la luz, hasta que se consiguió el desarrollo del color. La absorbancia se leyó a 450 nm con una longitud de onda de referencia de 750 nm usando un lector Molecular Device ThermoMax Plate, siendo el blanco la placa del medio sólo con los pocillos de ensayo blanco. Las células sin tratar que recibieron sólo reactivos XTT sirvieron como control positivo de proliferación celular.

40 Cuando se determinó el índice de toxicidad de la concentración inhibidora (CCI<sub>50</sub>) (medida como 50% de células aún vivas), el CCI<sub>50</sub> de NNDCT fue 7 mM y mostró una viabilidad celular sustancialmente mayor de Fibroblastos Primarios de Piel de Ser Humano en el ensayo XTT que para el Cl<sub>50</sub> de HOCl (IC<sub>50</sub> = 0,8 mM), betadina (IC<sub>50</sub> = 0,01 mM) o OCl<sup>-</sup> (IC<sub>50</sub> = 0,66 mM). Resultados similares se obtuvieron en el Ensayo XTT realizado con células epiteliales de pulmón de ratón (L929) en el que se observó una viabilidad mayor que 90% para NNDCT a una concentración de 7 mM frente a una viabilidad sustancialmente menor que 50% para OCl<sup>-</sup> en concentraciones de 0,6 mM y betadina en concentraciones de 0,02 mM.

Citotoxicidad e índice terapéutico

La NNDCT ha sido sometida a un riguroso ensayo de seguridad *in vitro* usando el ensayo de células estándar de la United States Pharmacopoeia (células epiteliales de pulmón de ratón, L929), así como células primarias de piel de ser humano. Los presentes inventores descubrieron que NNDCT tiene un índice de toxicidad celular muy bajo en ambos tipos de células: fibroblastos primarios de ser humano y células L929, en comparación con otros artículos de ensayo antisépticos: HOCl y Povidona-Yodo (véase más adelante). Al contrario que Povidona-Yodo donde la toxicidad celular fue una preocupación principal, NNDCT demostró que era compatible con las células con un perfil de toxicidad mucho más seguro. De hecho, el índice terapéutico (TI), que se define como la relación de una concentración tolerada por las células ensayadas (citotoxicidad o  $IC_{50}$  *in vitro*) sobre la Mínima Concentración Bactericida (MBC) para NNDCT fue aproximadamente 5.000 en comparación con aproximadamente 300 y 7 para HOCl y Povidona-Yodo, respectivamente (Tabla 2).

Tabla 2. Sumario de datos de Mínima Concentración Bactericida (MBC) e Índice Terapéutico

Producto	pH	MBC <sup>a</sup> (µg/mL)	IC <sub>50</sub> (µg/mL)	T.I. <sup>b</sup> en HF <sup>c</sup>
NNDCT	3,5	0,29	1442	4972
HOCl	3,5	0,16	47	297
Povidona-Yodo	4,2	0,38	2,5	7

<sup>a</sup>Mínima Concentración Bactericida (MBC)  
<sup>b</sup>Índice terapéutico y <sup>c</sup>Células primarias de fibroblastos de ser humano

La aplicación de NNDCT como desinfectante tópico más seguro, particularmente en pacientes quemados y con heridas oftálmicas crónicas que no sanan podría ser una gran ventaja, porque el uso de otros desinfectantes con mayores efectos secundarios tóxicos es muy descorazonador para las autoridades sanitarias. Puesto que la seguridad alimentaria es también un tema sanitario principal, la aplicación de NNDCT como un desinfectante de amplio espectro puede extenderse a la industria alimentaria.

Ejemplo 4

Como ejemplo, se describe el procedimiento para la preparación de ácido N,N-dicloro-2-amino-2-metilpropanosulfónico como sigue:

Etapa 1. Síntesis de ácido 2-amino-2-metilpropanosulfónico (Braghiroli, D.; Bella, M. D. Tetrahedron Letters, 1996, 37, 7319-7322).

Se prepara ácido 2-amino-2-metilpropanosulfónico por reducción de 2-hidroxiisobutironitrilo (acetona cianohidrina) a 1-amino-2-metil-2-propanol, seguida por protección con (Boc)<sub>2</sub>O. Después de mesilación y separación del grupo protector, se dejó que el hidrocloreto obtenido reaccionara con sulfito de sodio para dar ácido 1,1-dimetiletanosulfónico.

Etapa 2. Cloración de ácido 2-amino-2-metilpropanosulfónico.

Para obtener 1 litro de N,N-dicloro (NNDC-DMESA) 1,6 mM en disolución de NaCl al 0,9% a pH 3,5, se añaden 8,6 g de NaCl a un matraz volumétrico de 1000 mL, a continuación se añaden 500 mL de agua Millipore al matraz para disolver la sal. Se añaden 2 mL de HCl 1 M a la disolución de NaCl, seguido por la adición de 22 mL de NaOCl 0,158 M. La disolución se mezcla. A continuación, se añaden 0,355 g de ácido 2-amino-2-metilpropanosulfónico al matraz y se llena el matraz volumétrico hasta la marca con agua Millipore. La disolución se agita hasta que la reacción finaliza como, por ejemplo, se indica por UV o RMN. Los presentes inventores han preparado ornitina N,N-clorada, N,N-dicloro-homotaurina y N,N-dicloro-alanina. Todos estos dicloro compuestos tienen espectros UV ( $\lambda_{max} \sim 300$  nm) y absorvidades molares muy similares.

**Procedimiento para preparar los compuestos dicloro-aminoácidos**

Se añade una cantidad estequiométrica de aminoácido o de sus sales (polvo) a una disolución ácida de HOCl (relación molar de HOCl:aminoácido = 2:1). A continuación, la disolución resultante de la mezcla se agita durante

aproximadamente 15 minutos. El pH de la disolución resultante es más bajo que el pH de la disolución de HOCl de partida. El producto se identifica y la finalización de la reacción se sigue mediante un espectrofotómetro de UV-vis. El pH de la disolución se ajusta con disolución de ácido clorhídrico o hidróxido de sodio hasta el valor de pH deseado. La concentración de la disolución se determina en el espectrofotómetro UV usando la absorptividad molar correspondiente a la  $\lambda_{\max}$ . Un procedimiento más detallado se describe en el siguiente ejemplo.

Ejemplo: Preparación de 1 litro de disolución de dicloro-homotaurina 0,05 M.

Etapa 1. Se prepara 1 litro de disolución de HOCl 0,1 M con un pH < 5.

Etapa 2. Se añaden 8,06 g de homotaurina de sodio (3-amino-1-propanosulfonato de sodio, MW = 161,13) a la disolución de HOCl de la etapa 1. La disolución se agita durante aproximadamente 15 minutos.

Etapa 3. Se toma una parte alícuota de disolución de la etapa 2 y se lleva a cabo una dilución de 100 veces. Se registra el espectro UV de la disolución diluida para identificar el producto, el cual tiene una  $\lambda_{\max}$  a 303 nm (véase la tabla adjunta).

Etapa 4. Se ajusta el pH de la disolución resultante de la etapa 2 al pH deseado con NaOH o HCl.

Etapa 5. Se repite el procedimiento de la etapa 3 para medir la concentración de la dicloro-homotaurina (la absorptividad molar es  $329,0 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ , véase la tabla adjunta).

Tabla

Absorptividades molares de compuestos N,N-dicloro- y N,N-dibromo-aminoácidos		
Compuestos	$\lambda_{\max}$ (nm)	$\epsilon$ ( $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ )
N,N-diclorotaurina	302	332,9 <sup>a</sup>
N,N-diclorohomotaurina	303	329,0 <sup>c</sup>
N,N-dicloro- $\beta$ -alanina	301	327,6 <sup>c</sup>
N,N,N',N'-tetracloro-ornitina	300 <sup>c,d</sup>	241 <sup>c,d</sup>
N,N-diclorotaurina	302	332,9 <sup>a</sup>
N,N-dibromotaurina	241	2713 <sup>b</sup> , 2708 <sup>c</sup>

<sup>a</sup> Gottardi, W.; Nagl, M. Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem. 2002, 9, 411-421.  
<sup>b</sup> Thomas, E.; Bozeman, P.; Jefferson, M.; King, C. J. Bio. Chem. 1995, 7, 2906-2913.  
<sup>c</sup> Determinada en este estudio.  
<sup>d</sup> Basada en una relación molar 4:1 de agente clorante a ornitina.

Ejemplo 5 (Referencia - no parte de la invención reivindicada)

Los resultados del descubrimiento de los presentes inventores proporcionan soporte a la actividad antimicrobiana de NNDCT en disolución salina al 0,9% a pH 3,5. Se determinó que estas actividades antimicrobianas eran considerables en un intervalo  $\mu\text{M}$  y aumentaron significativamente mediante el aumento de la concentración y/o el tiempo de exposición. En contraste, la toxicidad celular se vio a un intervalo 1000 veces mayor en el intervalo mM. Los presentes inventores mostraron que en nuestro ensayo XTT las células tratadas con NNDCT eran capaces de tolerar el tratamiento y de pasar a través de ciclos normales de proliferación celular en comparación con células control no tratadas.

Ejemplo 6 (Referencia - no parte de la invención reivindicada)

Se prepararon disoluciones de NNDCT con una concentración de 1,49 mM a pH 3,0, 3,5, 4,0, y 5,0. Los espectros y las concentraciones de las disoluciones se midieron en el espectrómetro UV-vis. Los resultados mostraron que el espectro y la concentración de la disolución de NNDCT no cambiaron en el intervalo de pH de 3,0 a 5,0.

30



Preparación

- 5 Se añaden 8,8 g de NaCl, 2 mL de HCl 1,0 M, y 0,278 g de taurina a un matraz volumétrico de 1000 mL, seguido por la adición al matraz de aproximadamente 800 mL de agua desionizada. Se agita el matraz para disolver los polvos de NaCl y taurina. A continuación, se añaden al matraz 22 mL de la disolución de NaOCl 0,15 M. Se rellena el matraz hasta la marca con agua desionizada. Se agita la disolución con una barra de agitación magnética durante 5 minutos. Se midieron la concentración y el pH de la disolución resultante en un espectrómetro UV-vis y un pHímetro Beckman recientemente calibrado. Esta disolución tiene una concentración de 1,49 mM y un valor de pH de 3,85.
- 10 Se pipetearon 100 mL de la disolución de NNDCT anterior (pH = 3,85) en un vaso de precipitados de 250 mL, a esta disolución se añadieron 0,09 mL de disolución de HCl 1,0 M y se agitó. El pH final de esta disolución es 3,0.
- Se pipetearon 100 mL de la disolución de NNDCT con pH 3,85 en un vaso de precipitados de 250 mL, a esta disolución se añadieron 0,003 mL de disolución de NaOH 5,0 M y se agitó. El pH final de esta disolución es 4,85.
- Se prepararon disoluciones con valores de pH variables de una manera similar dentro de un intervalo de pH de 3 a 5. Todas las disoluciones mostraron estabilidad si se almacenaron apropiadamente como se mostró mediante sus espectros UV.

15

## REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Una composición con actividad bactericida, antibacteriana, anti-infecciosa, antimicrobiana, desinfectante, antifúngica, esporicida y antivírica, que comprende un N,N-dihalo-aminoácido seleccionado del grupo que consiste en N,N-dicloro-2,2-dimetiltaurina, N,N-dicloro-1,1,2,2-tetrametiltaurina, N,N-dibromo-2,2-dimetiltaurina, N,N-dibromo-1,1,2,2-tetrametiltaurina, N,N-dicloro-3,3-dimetilhomotaurina, o uno de sus derivados; seleccionándose dicho derivado del grupo que consiste en sales y ésteres con alcoholes de C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> farmacéuticamente aceptables.
- 2.** La composición según la reivindicación 1, donde la composición comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 10 **3.** La composición según la reivindicación 1, que tiene un intervalo de pH entre 2 y 7, ó 3,0 y 6,0, ó 3,0 y 5,0, ó 3,5.
- 4.** La composición según la reivindicación 1, siendo dicha composición isotónica y fisiológicamente equilibrada.
- 15 **5.** La composición según la reivindicación 1, donde el N,N-dihaloaminoácido es seleccionado del grupo que consiste en N,N-dicloro-2,2-dimetiltaurina, N,N-dicloro-1,1,2,2-tetrametiltaurina, N,N-dibromo-2,2-dimetiltaurina, N,N-dibromo-1,1,2,2-tetrametiltaurina, y N,N-dicloro-3,3-dimetilhomotaurina.
- 6.** Un N,N-dihaloaminoácido, seleccionado del grupo que consiste en N,N-dicloro-2,2-dimetiltaurina, N,N-dicloro-1,1,2,2-tetrametiltaurina, N,N-dibromo-2,2-dimetiltaurina, N,N-dibromo-1,1,2,2-tetrametiltaurina, N,N-dicloro-3,3-dimetilhomotaurina, o uno de sus derivados, donde el derivado es seleccionado del grupo que consiste en sales y ésteres con alcoholes de C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> farmacéuticamente aceptables.
- 20 **7.** El N,N-dihaloaminoácido según la reivindicación 6, que es N,N-dicloro-2,2-dimetiltaurina; o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.
- 8.** Una composición que comprende un N,N-dihalo-aminoácido según la reivindicación 6 ó uno de sus derivados, seleccionándose dicho derivado del grupo que consiste en sales y ésteres con alcoholes de C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> farmacéuticamente aceptables, para uso en medicina.
- 25 **9.** El uso de un N,N-dihalo-aminoácido según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, en la preparación de una composición bactericida, antibacteriana, anti-infecciosa, antimicrobiana, esporicida, desinfectante, antifúngica y antivírica o en la preparación de una composición medicamento para uso bactericida, antibacteriano, anti-infeccioso, antimicrobiano, esporicida, desinfectante, antifúngico y antivírico.
- 30 **10.** Un método para desinfectar controlando o previniendo el crecimiento de bacterias, microbios, esporas, hongos o virus, comprendiendo dicho método la aplicación de una cantidad efectiva de una composición según la reivindicación 1 a un área, espacio o material que requiere dicho control o prevención del crecimiento o proliferación, con la condición de que el método no se use como un método para el tratamiento del cuerpo humano o animal por terapia.
- 35 **11.** El método según la reivindicación 10, donde el pH de la composición está entre 2 y 7, 3,0 y 6,8, ó 3,0 y 6,0, ó 3,0 y 5,0, ó 3,5.
- 12.** El método según la reivindicación 10, donde dicho N,N-dihalo-aminoácido o derivado del mismo se prepara *in situ*.
- 13.** El método según la reivindicación 10, donde el material a tratar se selecciona de alimentos, alimentos para animales, instrumentos quirúrgicos, equipos quirúrgicos, dispositivos médicos y equipos usados para tales fines.
- 40 **14.** La composición según la reivindicación 8, que tiene una concentración del N,N-dihaloaminoácido o de su derivado entre 0,1 y 100 ó 0,3 y 50 mM y un intervalo de pH entre 2 y 7, 3 y 4,8, 3,0 y 4,5, ó 3,5 y 4,5, ó 3,5.
- 15.** La composición según la reivindicación 8 en forma estabilizada, teniendo dicha composición una concentración del N,N-dihaloaminoácido o de su derivado entre 0,1 y 100 ó 0,1 y 50 mM y un intervalo de pH entre 2 y 7, 3 y 6, 3 y 4,8, 3 y 4,5, ó 3,5 y 4,5, ó 3,5.