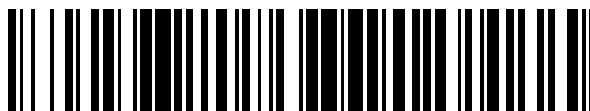


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 565 991**

51 Int. Cl.:

A61K 8/04 (2006.01)

A61K 8/19 (2006.01)

A61K 9/12 (2006.01)

A61Q 17/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.10.2002 E 02801425 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.12.2015 EP 1435924**

54 Título: **Composición terapéutica y uso**

30 Prioridad:

19.10.2001 GB 0125222

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

08.04.2016

73 Titular/es:

**BARTS AND THE LONDON NHS TRUST (50.0%)
THE ROYAL LONDON HOSPITAL, 4TH FLOOR,
ALEXANDER HOUSE
WHITECHAPEL, LONDON E1 1BB, GB y
QUEEN MARY & WESTFIELD COLLEGE (50.0%)**

72 Inventor/es:

**TUCKER, ARTHUR T;
BENJAMIN, NIGEL y
BARNES, NEIL**

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

ES 2 565 991 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

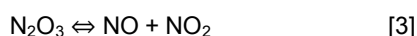
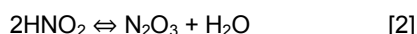
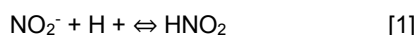
Composición terapéutica y uso

La presente invención se relaciona con el uso en la terapia de óxido nítrico.

No ha habido mucho interés en los últimos años en las aplicaciones farmacéuticas de óxido nítrico [NO] y precursores de óxido nítrico. El óxido nítrico es un vasodilatador potente que se sintetiza y se libera por las células endoteliales vasculares y juega un papel importante en la regulación de la resistencia vascular local y flujo sanguíneo. En células de mamíferos, NO se produce principalmente junto con la L-citrulina mediante la oxidación enzimática de L-arginina. El óxido nítrico también está involucrado en la inhibición tanto de las plaquetas y agregación de leucocitos y adhesión, la inhibición de la proliferación celular, la eliminación de radicales superóxido y la modulación de la permeabilidad de la capa endotelial. También se ha demostrado que el óxido nítrico posee propiedades antimicrobianas, revisadas por F. C. Fang (1997) (J. Clin. Invest. 99 (12) 2818-2825 (1997)).

Además de la producción mediada de célula interna, NO también se libera continuamente externamente desde la superficie de la piel por un mecanismo que parece ser independiente de la enzima sintasa de NO. El nitrato excretado en el sudor se reduce a nitrito mediante un mecanismo desconocido, que puede implicar enzimas nitrito reductasa que se expresan por bacterias comensales de la piel. Alternativamente las enzimas nitrito reductasa de mamíferos pueden estar presentes en la piel que podría reducir el nitrito rápidamente a NO sobre la superficie de la piel.

Se cree que la producción de NO a partir de nitrito es a través del siguiente mecanismo:



Existe una serie de revelaciones que se ocupan de la provisión artificial de NO. WO 95/22335 (Benjamin & Dougal) revela una forma de dosificación para el tratamiento de bacterias, virus, o condiciones de hongos que comprende un agente acidificante farmacéuticamente aceptable, una fuente farmacéuticamente aceptable de iones nitrito o un precursor de nitrato de los mismos, y un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable, en donde el agente acidificante se adapta para reducir el pH en el ambiente de uso por debajo de pH 4. Preferiblemente, el agente acidificante es un ácido orgánico, por ejemplo, ácido salicílico o ácido ascórbico. El precursor para el ion nitrito puede ser un metal alcalino o metal alcalinotérreo capaz de la conversión a un nitrato por acción enzimática. En una forma particularmente preferida de la invención, el agente acidificante y la fuente de iones nitrito o precursor, por lo tanto, están dispuestos por separado en dicha crema o ungüento para la mezcla para liberar iones nitrito en el ambiente de uso. Alternativamente, una composición de ácidos se puede presentar para la administración en forma de comprimidos o líquido.

US-A-5648101 (Tawashi) revela un método para administrar gas NO a un sitio deseado o en el cuerpo de un animal sensible, por ejemplo, seres humanos, que comprende combinar y causar la reacción de una sal reductora soluble, preferiblemente sulfato ferroso, y un nitrito, nitrito de sodio preferible en presencia de humedad *in situ* en, o adyacente a dicho sitio. Los medios para dicha administración incluyen composiciones tales como comprimidos, cápsulas, ungüentos, cremas, lociones y aerosoles que contienen mezclas de partículas o gránulos de los dos reactivos, parches transdérmicos y bombas osmóticas para combinar las soluciones de reactivo o reactivos *in situ*. Wink et al, El papel de la química de óxido nítrico en el tratamiento del cáncer, (Biochemistry (Moscú) 802-809; 63 (7): 1998) revela el efecto del óxido nítrico sobre los tumores de mamíferos. Las divulgaciones actuales en el campo del tratamiento del cáncer se refieren a la producción endógena de óxido nítrico. Los intentos para aumentar la disponibilidad local se han limitado a las intervenciones no directas tales como la dosificación con precursores de óxido nítrico (L-arginina) y maniobras para aumentar la vida media/biodisponibilidad de óxido nítrico endógeno mediante la modulación temporalmente de las vías de degradación.

Otros métodos clínicos que involucran el uso de precursores de NO se revelan en WO-A-99/02148, WO-A-95/09612 y Chemical Abstracts; 127:130755, B.H. Cuthbertson et al, British Journal of Anaesthesia, (1977), 78(6), 714-717.

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

En la aplicación tópica a la piel de nitrito en concentraciones de hasta 4% en una crema o ungüento de portador inerte, el nitrito, cuando se mezcla con un ácido orgánico tal como ácido ascórbico (vitamina C), reacciona para producir óxidos

de nitrógeno para provocar la liberación de óxidos nítricos que conducen a una vasodilatación sostenida de los vasos sanguíneos de la microcirculación, sin inflamación significativa.

US-A-5.536.241 (Zapol) revela un dispositivo para relajar el músculo liso de un órgano hueco con una fuente de óxido nítrico.

5 Reseñas útiles del uso de NO en la terapia se proporcionan en los siguientes artículos de revisión; 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.

10 Todas estas propuestas anteriores para la aplicación clínica de NO se han centrado en el uso de cualquiera de NO gaseoso, o bien de precursores de NO en solución, suspensión o preparaciones tópicas.

15 Se ha encontrado ahora que, sorprendentemente, cuando el óxido nítrico se disuelve o suspende en un líquido, ya sea haciendo pasar NO gaseoso a través de un líquido, o mediante la generación de NO *in situ* en el líquido, concentraciones clínicamente significativas se pueden establecer ya sea disueltas o dispersas dentro del líquido, a pesar de que una proporción significativa del NO generado en o pasado a través del gas líquido se libera inmediatamente a la atmósfera. Por ejemplo, cuando NO se produce en solución acuosa por la reacción de nitrito 0.5 molar con ácido cítrico 0.5 molar, la concentración de NO disperso o disuelto en la formulación líquida, después de la evolución de gas, se ha encontrado que es del orden de 1,500 ppb (1.5 ppm). Además, la formulación líquida resultante (denominada en este documento por simplicidad como simplemente una "solución" a pesar de que en la práctica el NO puede estar presente tanto en solución verdadera, y en la forma de una dispersión o suspensión) se mantiene estable dentro de un intervalo de tiempo requerido para realizar maniobras terapéuticas y suscitar acciones biológicas (por ejemplo, por periodos de más de una hora). De acuerdo con lo anterior, las formulaciones líquidas son eficaces para el tratamiento de una serie de condiciones clínicas, mediante la administración de un aerosol nebulizado de formulación líquida.

25 De acuerdo con lo anterior, en un primer aspecto de la invención, se proporciona un dispensador farmacéutico, que comprende una formulación líquida que comprende una concentración de óxido nítrico clínicamente eficaz, o medio para formar dicha formulación líquida de una fuente de óxido nítrico, y medio para formar una niebla nebulizada de la formulación líquida, en donde la formulación líquida es una solución acuosa, en donde la formulación líquida contiene de 10 a 40,000 partes por mil millones en peso de NO.

30 El óxido nítrico puede estar presente en las formulaciones líquidas de acuerdo con la invención en solución verdadera, y/o en forma de una dispersión o suspensión (por ejemplo, en suspensión coloidal). Todos estos tipos de formulaciones se denominan en este documento como "soluciones".

35 Por "niebla nebulizada" como se usa en este documento se entiende cualquier forma en la cual la formulación líquida se puede pulverizar como una niebla de gotitas para la aplicación, tal como las producidas convencionalmente mediante pulverizadores nasales o aplicadores manuales utilizados para el tratamiento de condiciones respiratorias tales como el asma.

En tales formulaciones líquidas, las composiciones eficaces contendrán concentraciones de NO disperso y/o disuelto en el intervalo desde 10 a 40,000 ppb (partes por mil millones) en peso, preferiblemente desde 100 a 10,000 ppb, más preferiblemente de 1,000 a 10,000 ppb.

40 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.

45 De acuerdo con la presente invención las formulaciones líquidas activas de óxido nítrico como se ha descrito anteriormente se pueden administrar por medio de un nebulizador y emplear como composiciones terapéuticas para el tratamiento de una enfermedad respiratoria, por ejemplo, bronquiectasia, aspergilosis broncopulmonar alérgica, *Chlamydia pneumoniae*, enfermedad pulmonar obstructiva, *Bacillus anthracis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, síndrome de dificultad respiratoria aguda, enfermedad pulmonar ocupacional, enfermedad pulmonar alérgica, o alteración de la función respiratoria, bronquiolitis por RSV, precipitar las exacerbaciones del asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), neumonía vírica, neumonía, tuberculosis, síndrome de dificultad respiratoria aguda (ARDS), lesión pulmonar aguda, insuficiencia respiratoria hipoxémica y asma.

En un aspecto particular de la invención, la solución de óxido nítrico se puede emplear para el tratamiento de ántrax.

En particular, la composición puede estar contenida dentro de un sistema de suministro que permite la producción de una neblina nebulizada de la formulación líquida de óxido nítrico que se puede pasar a los pulmones de un paciente humano o animal.

- 5 Un aspecto adicional de la invención proporciona el uso de tales formulaciones líquidas de óxido nítrico en la preparación de una composición terapéutica para el tratamiento del cáncer, en donde la composición está adaptada para la administración por medio de un nebulizador.

La mezcla líquida se puede hacer por la combinación de nitrito con un ácido orgánico tal como ácido ascórbico en un medio líquido, tal como agua o, más preferiblemente, solución salina fisiológica. Alternativamente, se puede hacer por la transmisión de gas óxido nítrico puro a través del medio líquido con el fin de formar la formulación líquida.

- 10 El pH de la mezcla líquida resultante se puede manipular por la titulación del agente acidificante y/o posterior estandarización química utilizando técnicas estándar para crear una formulación farmacéuticamente aceptable para su aplicación al sistema respiratorio. El pH en los pulmones es de aproximadamente 7.4 y por lo tanto el pH de la mezcla líquida resultante es, preferiblemente, aproximadamente 7.4.

- 15 El nebulizador y el método de nebulización para ser utilizados de acuerdo con la presente invención puede ser cualquier método convencional utilizado en la práctica médica o veterinaria general, que es capaz de producir una pulverización nebulizada con un tamaño de partícula en el intervalo respiratorio, como se describe por ejemplo en J.Heyder et al., ("Deposition of particles in the human respiratory tract in the size range 0.0005 to 15 microns" Jnl. of Aerosol Science 1989 pp 1-21). El tamaño de partícula preferido de las partículas nebulizadas está en el intervalo desde 0.1 a 10 micrómetros, preferiblemente de 2 a 5 micrómetros. El tamaño de partícula se puede ajustar con el fin de apuntar a la
20 dosis a la región deseada del tracto respiratorio, como se revela en el documento Heyder et. al., mencionado anteriormente.

El nebulizador utilizado puede, por ejemplo, ser del tipo de dispensador a presión ampliamente utilizado para la administración oral o nasal de los fármacos anti-asma y similares.

- 25 El agente acidificante puede incluir cualquier ácido orgánico apropiado, tal como ácido ascórbico (vitamina C), ácido salicílico, ácido acetil salicílico, ácido acético o una sal o un derivado del mismo, generalmente en una concentración de hasta 20% p/v, preferiblemente 0.25 a 10% p/v, más preferiblemente de 4 a 6% p/v. Una concentración particularmente preferida es 4% o 5% p/v. Otros agentes acidificantes incluyen, pero no se limitan a, sales de amonio o aluminio, fenol y ácido benzoico. Los ácidos inorgánicos tales como, ácido clorhídrico pueden ser utilizados si se diluyen suficientemente y/o estandarizan adecuadamente. El agente acidificante puede estar presente como una sal disuelta o en una forma
30 líquida.

- La fuente farmacológicamente aceptable de iones nitrito puede ser un nitrito de metal alcalino o un nitrito de metal alcalinotérreo, por ejemplo, LiNO_2 , NaNO_2 , KNO_2 , RbNO_2 , CsNO_2 , FrNO_2 , $\text{Be(NO}_2)_2$, $\text{Mg(NO}_2)_2$, $\text{Ca(NO}_2)_2$, $\text{Sr(NO}_2)_2$, $\text{Ba(NO}_2)_2$, o $\text{Ra(NO}_2)_2$. Alternativamente, un precursor de nitrito se puede usar como la fuente de los iones nitrito en la
35 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 alcalinotérreos capaces de la conversión enzimática a nitrito, por ejemplo, LiNO_3 , NaNO_3 , KNO_3 , RbNO_3 , CsNO_3 , FrNO_3 , $\text{Be(NO}_3)_2$, $\text{Mg(NO}_3)_2$, $\text{Ca(NO}_3)_2$, $\text{Sr(NO}_3)_2$, $\text{Ba(NO}_3)_2$, o $\text{Ra(NO}_3)_2$. La concentración de la fuente de iones nitrato antes de la acidificación puede ser hasta 20% p/v, adecuadamente 0.25 a 10%, preferiblemente de 4 a 6%. Una concentración particularmente preferida es 4% o 5% p/v.

La composición empleada de acuerdo con la invención preferiblemente es saturada con el óxido nítrico en solución.

- 40 La composición farmacéutica se puede administrar a continuación por nebulizador, por ejemplo, como se describe por Heyder anteriormente.

Las dosis de óxido nítrico para los fines de la invención pueden variar dentro de amplios límites, dependiendo de la enfermedad o trastorno que se va a tratar, la gravedad de la condición, y la edad y salud del individuo que se va a tratar. Un médico será capaz de determinar fácilmente las dosificaciones apropiadas que se van a utilizar.

- 45 Esta dosis se puede repetir tantas veces como sea apropiado. Si se desarrollan efectos secundarios de la cantidad y/o frecuencia de la dosificación pueden ser reducidos o alterados de otro modo o modificados, de conformidad con la práctica clínica normal.

- Las composiciones se pueden formular de acuerdo con la invención para el hombre o para la medicina veterinaria. La presente solicitud debe interpretarse del mismo modo la aplicación a los seres humanos, así como a los animales, a
50 menos que el contexto exprese claramente lo contrario.

La composición tiene beneficios clínicos importantes, ya sea solos o en combinación con otra terapia anti-infecciosa en, por ejemplo, las siguientes condiciones:

1. Bronquiectasia: una condición pulmonar relativamente común en la que la sepsis crónica se produce en áreas del pulmón. Un ejemplo particular de esto es la enfermedad pulmonar hereditaria, fibrosis quística.
- 5 2. Aspergilosis broncopulmonar alérgica: una complicación del asma en la que los pacientes se vuelven alérgicos al hongo *Aspergillus*, que coloniza las vías respiratorias y causa daño a los pulmones y actisis en los bronquios.
3. *Chlamydia pneumoniae*; Se ha sugerido que algunos casos de aparición de asma tardía, pueden estar relacionados con la infección crónica de las vías respiratorias con *Chlamydia pneumoniae*.
- 10 4. Enfermedad pulmonar obstructiva; Aproximadamente 30% de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD) tienen la colonización bacteriana con *Streptococcus pneumoniae* y/o *Haemophilus influenzae*. Esta es difícil de erradicar y hay pruebas de que la colonización bacteriana conduce a las exacerbaciones de la COPD y empeora el pronóstico.
5. *Mycobacterium*; La infección crónica por micobacterias atípicas tales como *Mycobacterium xenopi*, *Mycobacterium chelonae* y *Mycobacterium fortuitum* se puede producir en los pulmones previamente dañados y es difícil de erradicar.
- 15 Además, la niebla nebulizada de formulación líquida de óxido nítrico, cuando se ingiere en los pulmones o el tracto nasal, es ventajoso en el tratamiento de, por ejemplo, *Bacillus anthracis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*; síndrome de dificultad respiratoria aguda; enfermedades laborales de los pulmones; enfermedades pulmonares alérgicas; alteración de la función respiratoria y condiciones asociadas.
- 20 Aunque no se desea estar ligado por ninguna teoría de operación, se cree que la presentación de óxido nítrico en forma de formulación líquida resulta en la absorción preferencial del óxido nítrico por los organismos infecciosos, en lugar de la absorción por la hemoglobina en la sangre que conduce a la inactivación.
- Existe una variedad de infecciones pulmonares agudas, que se puede reducir con la aplicación de la invención; éstos incluyen infecciones virales, que pueden causar enfermedad aguda por sí mismos, por ejemplo,
- 25 1. Bronquiolitis RSV en niños o exacerbaciones precipitadas de asma o enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD)
2. Neumonía viral tal como la neumonía de la gripe, por lo que en la actualidad no existe nada más que un tratamiento de apoyo.
3. Neumonía.
4. Tuberculosis
- 30 La formulación líquida de la presente invención se puede utilizar de forma aguda en combinación con otras terapias para ayudar a erradicar estas enfermedades o para prevenir la reinfección o disminuir la carga infecciosa. Alterando el tamaño de partícula, es posible dirigir el aerosol a las vías respiratorias grandes, vías respiratorias más pequeñas o alvéolos con el fin de ayudar a la eficacia en el tratamiento de la enfermedad.
- 35 El sistema de nebulizado es ventajoso en comparación con el uso de gas de óxido nítrico respiratorio. Por ejemplo, vasoconstricción pulmonar hipóxica, un fenómeno de protección que causa vasoconstricción de las unidades pulmonares mal ventiladas, es una respuesta normal al desequilibrio ventilación/perfusión. El uso de gas óxido nítrico inhalado se ha sugerido para modificar esta respuesta normal, lo que resulta en la vasodilatación de las zonas con poca ventilación, aumento de la derivación a través del pulmón y oxigenación deficiente. La administración de óxido nítrico en mezcla fluida mediante nebulización reducirá este riesgo ya que los elementos activos del sistema sólo se entregan a
- 40 funcionar las unidades pulmonares. También, debido a su vida media corta, el gas de NO inhalado debe ser administrado de manera continua y la retirada repentina del tratamiento puede estar asociada con la hipoxemia de rebote que pone en peligro la vida. Este sistema proporciona una forma de liberación acuosa, más lenta de NO a las diversas regiones del tracto respiratorio. Además, el sistema ofrece nuevas y significativas ventajas debido a la tecnología de administración simplificada e intermitente en lugar de terapia continua.
- 45 El sistema de nebulización tampoco tiene los problemas inherentes a los sistemas que implican la dosis, instilación o nebulización de aductos de nucleófilo/NO, S-nitrosotioles, complejos dietilamina-NO (DEA/NO) S-nitroso-N-acetilpenicilamina (SNAP), S-nitrosoglutatión (GSNO), SIN-1 y sistemas similares por lo que los portadores asociados, tales como nucleófilos y productos de degradación pueden estar asociados con potencial toxicidad local o sistémica.

- Además de las funciones antimicrobianas de la invención, otras funciones biológicas conocidas de la molécula de óxido nítrico también pueden ser inducidas de forma variable por el sistema de nebulizado, por ejemplo, vasodilatación. Los efectos vasodilatadores se pueden utilizar en el tratamiento de enfermedades respiratorias, tales como, pero no limitado a, síndrome de dificultad respiratoria aguda (ARDS), lesión pulmonar aguda e insuficiencia respiratoria hipoxémica.
- 5 Cuando se aplica al tratamiento del asma (inflamación crónica conduce al uso clínico de los corticosteroides que reducen/eliminan producción de NO intrínseca que puede conducir a la vasoconstricción y aumento del riesgo de infección) el sistema de nebulizado se puede utilizar como una terapia de reemplazo de vasodilatador, ya sea solo o en combinación con otros tratamientos (por ejemplo, como la terapia de prostanoïdes).
- 10 Los efectos vasodilatadores en el sistema también se pueden utilizar en el tratamiento de la enfermedad cardiovascular (por ejemplo, pero no se limitan a la hipertensión pulmonar, angina y enfermedad coronaria) en ausencia de la vasodilatación sistémica significativa.
- La composición nebulizada también se puede usar en el tratamiento de la enfermedad de células falciformes. Las dos complicaciones más comunes son episodios de oclusión vascular y síndrome torácico agudo [ACS]. ACS es una causa principal de mortalidad y afecta al 50% de los pacientes al menos una vez en su vida. Aunque los factores de riesgo de
- 15 ACS no han sido bien definidos, pruebas de función pulmonar en pacientes con enfermedad de células falciformes identifican la hiperreactividad de las vías respiratorias como un factor de riesgo modificable. Las propiedades vasodilatadoras y antimicrobianas de la composición nebulizada son particularmente relevantes para la terapia de los pacientes. Además, el tratamiento concomitante de la adición de los corticosteroides tales como dexametasona a la composición nebulizada puede ser eficaz en algunos pacientes.
- 20 El óxido nítrico también modula la oxigenación de los tejidos a través de los cambios en la permeabilidad de la membrana.
- El óxido nítrico ejerce un potente efecto inhibitor sobre ambos la agregación y adhesión de plaquetas y de leucocitos.
- El aumento de la función ciliar es especialmente relevante en el tratamiento de la fibrosis quística y otras condiciones patológicas asociadas con la disquinesia de la función ciliar. Los cilios de las vías respiratorias han demostrado estimulación frecuencia-tiempo-ciliar de monofosfato de guanosa cíclica y prostaglandina E₂ endógena. La
- 25 administración nebulizada de óxido nítrico para el sistema respiratorio por el sistema revelado aumenta las concentraciones de monofosfato de guanosa y conduce a la liberación de prostaglandina E₂ y la acción directa.
- Además, el sistema, adicionalmente se puede combinar con productos farmacéuticos primarios tales como corticosteroides, surfactantes, hormonas (tales como insulina), antibióticos (tales como colomycin y tobramicina), prostanoïdes (tales como prostaciclina) y agentes citotóxicos para producir un aumento de la eficacia de la administración, absorción y acción.
- 30 El óxido nítrico administrado en una formulación líquida como se revela en este documento se puede utilizar terapéuticamente como un complemento a la quimioterapia mediante el aumento de la eficacia de la administración, absorción y acción de los agentes citotóxicos (por ejemplo, el cisplatino, melfalán, tamoxifeno, paxitaxol, y anastrozol) al sistema respiratorio y modulación directamente de la apoptosis. El aumento de la sensibilidad de las células tumorales está mediado por el óxido nítrico debido a la inhibición de las proteínas de reparación del ADN clave, tales como ligasas de ADN. Uno de los principales factores que limitan la eficacia de la radioterapia es la presencia de poblaciones de células tumorales hipóxicas radioresistentes. El óxido nítrico puede radiosensibilizar las poblaciones de células hipóxicas de mamíferos y es al menos tan eficaz como el oxígeno en este papel. Los radicales centrados de carbono se
- 40 generan inicialmente por la radiación ionizante en el ADN. En ausencia de óxido nítrico o de oxígeno, estos radicales reactivos eliminan átomos de hidrógeno de proteína cercanos, lo que limita el número de lesiones de ADN por fotón. El óxido nítrico reacciona con estos complejos de alta energía e inhibe el mecanismo de reparación de átomos de hidrógeno de proteínas de abstracción, que normalmente facilitaría la reparación del ADN. Los efectos de esta inhibición resultan en la radiosensibilización de las células hipóxicas. La fijación de daño inducido por la radiación aumenta el
- 45 número de lesiones por fotón. El óxido nítrico tiene un coeficiente de difusión más alto que el oxígeno y por lo tanto penetra más en los tejidos. Las funciones fisiológicas de moléculas de óxido nítrico, adicionalmente modulan la respuesta a la terapia.
- Tanto la radioterapia como la aplicación de administración de fármaco citotóxico se puede conseguir mediante la nebulización del sistema, infiltración o por inyección directa del tumor o locus circundante.
- 50 Además de la administración en el tracto respiratorio, la mezcla de fluido de óxido nítrico se puede administrar a cualquier parte del cuerpo humano o animal para tratar o prevenir la infección microbiana. Por ejemplo, la mezcla se puede pulverizar sobre la piel para tratar afecciones dermatológicas. Alternativamente, la mezcla se puede administrar por pulverización de los órganos internos del cuerpo, por ejemplo, durante y después de las operaciones, para prevenir la infección microbiana.

La formulación líquida de óxido nítrico descrita se puede utilizar, adicionalmente, en las áreas no médicas tales como cosméticos y tratamientos de belleza, en vista de sus efectos biológicos en el flujo sanguíneo de la piel y la oxigenación del tejido. Los campos de aplicación pueden incluir, pero no se limitan al tratamiento de la celulitis, estrías y manchas de la piel. Cuando se combina con agentes auxiliares, tales como minoxidil para el crecimiento del cabello, la penetración y la eficacia de los agentes es mayor.

El sistema de mezcla de fluido de óxido nítrico puede ejercer influencias biológicas positivas y fundamentales sobre las funciones fisiológicas normales de espermatozoides (incluyendo la motilidad, progresión, capacitación, reacción del acrosoma y ligamento de zona), fertilización, desarrollo embrionario, implantación y desarrollo temprano. El sistema también puede tener implicaciones en la comprensión y la gestión de una amplia gama de sistemas ginecológicos tales como menstruación y condiciones patológicas. Las influencias del NO sobre la ginecología y la fertilidad se ejercen en una función dependiente de la dosis bifásica.

La mezcla de fluido de óxido nítrico, adicionalmente, puede ser aplicada a los objetos inanimados para los fines de esterilización, y con el fin de prevenir la colonización por microorganismos.

Un modificador de la viscosidad, por ejemplo, propilenglicol u otra sustancia conocida farmacéuticamente aceptable con propiedades que modifican la viscosidad se pueden emplear con el fin de aumentar la adherencia de la composición a una superficie que se va a tratar.

A continuación, se describirá la invención, solamente a modo de ilustración con referencia a los siguientes ejemplos y figuras que se proporcionan a efectos de ilustración.

La figura 1 muestra las propiedades antimicrobianas del gel generador de NO a diferentes concentraciones de iones nitrito contra *Staphylococcus aureus* NCTC9353 y *Escherichia coli* NCTC10148 a veinticuatro horas de exposición. El eje vertical muestra la supervivencia microbiana como un porcentaje, y el eje horizontal muestra la concentración del gel de NO en mM.

La figura 2 muestra las propiedades anti-microbianas del gel generador de NO a diferentes concentraciones de iones nitrito contra MRSA (NCTC11561) a cuatro horas de exposición. El eje vertical muestra la supervivencia microbiana como un porcentaje y el eje horizontal muestra la concentración de nitrito en porcentaje. Tanto en la figura 1 como la 2, los valores mostrados son las medianas (n = 3).

Ejemplo 1

Una composición líquida que contiene óxido nítrico se preparó de la siguiente manera. Se adicionaron 10 ml de solución acuosa 0.5 M de nitrato de sodio a 10 ml de la solución acuosa 0.5 M de ácido ascórbico. La composición líquida se mezcló con el fin de liberar óxido nítrico. Después de la liberación de óxido nítrico, la composición líquida se diluyó en la proporción de 1: 5 con agua destilada. A continuación, la composición líquida resultante se ensayó utilizando un World Precision Instruments NO Nanosensor ISO-NOPNM. El sistema utiliza una punta de diámetro de 100 nm con límite de detección óptimo de menos de 0.5 nm. El ensayo y calibración se llevaron a cabo de acuerdo con el manual de instrucciones de World Precision Instruments. Se encontró que la composición líquida tiene una concentración de óxido nítrico de aproximadamente 300 ppb en peso, y que es estable durante un periodo de más de una hora.

Mediante la variación de las condiciones de preparación, se encontró que se pueden conseguir otras concentraciones de NO en la solución final.

Los ejemplos 2 y 3 no son ejemplos de la invención, pero se incluyen para demostrar la eficacia de NO en el tratamiento de microorganismos.

Ejemplo 2: propiedades antimicrobianas transmembrana de gel generador de NO

Las propiedades antimicrobianas de gel generador de NO después de la difusión a través de una membrana de 10 µm SympatexTM se investigaron de la siguiente manera. Se generó el NO por una mezcla de nitrito de sodio y ácido ascórbico en gel de agar al 0.8%, utilizando cloruro de sodio al 1% como intermedio. La preparación se probó en *S. aureus* NCTC9353 y *E. coli* NCTC10148 utilizando un intervalo de concentraciones de nitrito de sodio y ácido ascórbico. Los cultivos de *S. aureus* y *E. coli* se prepararon mediante la inoculación de 20 ml de caldo LB (Luria-Bertani 10 g de Bacto-triptona, 5 g de extracto de Bacto-levadura y 10 g/l de cloruro de sodio a pH 7.5) con 2-3 colonias, y se incubaron a 37 °C durante la noche. 24 ml de agar al 1.5% en NaCl se inocularon con 1 ml de ya sea *S. aureus* o *E. coli* y se vertió en placas de Petri. Los discos de membrana (100 mm de diámetro) fueron esterilizadas en 70% de etanol y a continuación los discos se colocaron en una cabina de flujo laminar para permitir que el etanol se evapore. Se prepararon 5 ml de agar al 0.8% en 1% de NaCl, que contiene ya sea nitrito de sodio o ácido ascórbico a

concentraciones finales de 500 mM, 250 mM, 165 mM, 50 mM, 25 mM, 5 mM, 2.5 mM y 0.5 mM. Las concentraciones finales en uso están reducidas a la mitad.

5 En el centro de las tapas de placas de Petri invertidas estériles, se adicionó 1 ml de cada concentración de nitrito de sodio y ácido ascórbico y se mezcla. A continuación, la membrana desinfectada se colocó sobre la parte superior de esta inmediatamente, utilizando pinzas esterilizadas. La membrana se colocó con cuidado de manera que colgaba sobre el borde de la tapa por igual en todas las direcciones. A continuación, la base de la placa de Petri se colocó al revés en la parte superior de la disposición de tapa/mezcla/membrana asegurando que una brecha de 2-3 mm se dejó entre la membrana y el agar inoculado invertido.

10 El aparato se incubó durante la noche a 37 °C después de lo cual se retiró. La base de la placa de Petri (al revés) se retiró y se tomó una muestra de la zona central de agar mediante el corte de un círculo utilizando una taza de medición de plástico estéril. A continuación, el agar se maceró en 10 ml de caldo LB y 5 ml de perlas de vidrio estériles. Se llevaron a cabo diluciones en serie y las muestras se colocaron en placas de agar de sangre que se incubaron durante 24 horas a 37 °C. Las colonias supervivientes se contaron.

15 Las propiedades anti-microbianas de óxido nítrico se observaron a concentraciones de nitrito por encima de 50 mM. Por debajo de esta concentración se observó actividad anti-microbiana parcial o ninguna. Por encima de esta concentración, la lisis celular se completó resultando en la muerte completa de las bacterias. Los resultados mostrados en la figura 1 ilustran el efecto antimicrobiano de concentraciones variables de gel de generación de NO y dando como resultado la difusión a través de la membrana de 10 µm Sympatex™.

20 Experimentos similares han demostrado la eficacia de las composiciones que contienen bajas concentraciones de NO frente a *Bacillus anthracis*.

Ejemplo 3: Propiedades anti-microbianas de transmembrana de gel generador de NO

25 Las propiedades antimicrobianas de gel generador de NO después de la difusión a través de una membrana de 10 µm Sympatex™ se investigaron de la siguiente manera. El NO se generó por una mezcla de nitrito de sodio y ácido ascórbico en gel de agar al 0.8%, utilizando cloruro de sodio al 1% como intermedio. La preparación se probó en MRSA (NCTC11561) utilizando un intervalo de concentraciones de nitrito de sodio y ácido ascórbico. Los cultivos de MRSA (NCTC11561) se prepararon mediante la inoculación de 20 ml de caldo LB (Luria-Bertani 10 g de Bacto-triptona, 5 g de extracto de Bacto-levadura y 10 g/l de cloruro de sodio a pH 7.5) con 2-3 colonias, y se incubaron a 37 °C durante la noche. 25 ml de agar al 1.25% en 0.8% de NaCl se inocularon con 1 ml de suspensión bacteriana y se vertió en placas de Petri. Los discos de membrana (100 mm de diámetro) fueron esterilizados en 70% de etanol y los discos se colocaron en una cabina de flujo laminar para permitir que el etanol se evapore. Se prepararon 5 ml de agar al 0.8% en 30 1% de NaCl, que contiene nitrito de sodio o ácido ascórbico a un intervalo de concentraciones.

35 En el centro de las tapas de placas de Petri invertidas estériles, se adicionó 1 ml de cada concentración de ácido ascórbico y nitrito de sodio y se mezcla la producción de un rango de concentración final (1500mM, 725mM, 362mM, 181M, 91mM, 45mM, y 23mM). A continuación, la membrana desinfectada se colocó sobre la parte superior de esta inmediatamente, utilizando pinzas esterilizadas. La membrana se colocó con cuidado de manera que colgaba sobre el borde de la tapa por igual en todas las direcciones. A continuación, la base de la placa de Petri se colocó al revés en la parte superior de la disposición de tapa/mezcla/membrana asegurando que una brecha de 2-3 mm se dejó entre la membrana y el agar inoculado invertido.

40 El aparato se incubó durante cuatro horas a 37 °C, después de lo cual se retiró. La base de la placa de Petri (al revés) se retiró y se tomó la muestra de la zona central de agar, mediante el corte de un círculo utilizando una taza de medición de plástico estéril. A continuación, el agar se maceró en 5 ml de solución reguladora de fosfato y perlas de vidrio estériles. Las diluciones en serie se llevaron a cabo y las muestras se sembraron en placas de agar CLED (cisteína lactosa deficiente en electrolitos), que se incubaron durante 24 horas a 37 °C. Las colonias supervivientes se contaron.

45 Se observaron propiedades anti-microbianas de óxido nítrico a concentraciones de nitrito por encima de la concentración de nitrito 1.5%. Por debajo de esta concentración se observó actividad anti-microbiana parcial o ninguna. Por encima de esta concentración, la lisis celular se completó resultando en la muerte completa de las bacterias. Los resultados mostrados en la figura 2 ilustran el efecto antimicrobiano de concentraciones variables de gel generador de NO y la difusión resultante a través de la membrana de 10 µm Sympatex™.

Reivindicaciones

1. Un dispensador farmacéutico, que comprende:
una formulación líquida que comprende una concentración clínicamente eficaz de óxido nítrico; o
medio para formar dicha formulación líquida de una fuente de óxido nítrico; y
- 5 2. Un dispensador farmacéutico como se reivindica en la reivindicación 1, en donde la formulación líquida es para la aplicación a los pulmones.
- 10 3. Un dispensador farmacéutico como se reivindica en la reivindicación 2, en donde la formulación líquida adicionalmente comprende una solución reguladora química.
4. Un dispensador, como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende una fuente de óxido nítrico, para la generación de la formulación líquida en el dispensador.
- 15 5. Un dispensador como se reivindica en la reivindicación 4, en donde la fuente de óxido nítrico comprende una fuente farmacológicamente aceptable de iones nitrito o un precursor de nitrito y un agente acidificante farmacológicamente aceptable.
6. Un dispensador como se reivindica en la reivindicación 1, en donde la formulación líquida contiene de 100 a 10,000 partes por mil millones en peso de NO.
7. Un dispensador como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la formulación líquida también comprende un componente farmacéuticamente activo adicional.
- 20 8. Un dispensador como se reivindica en la reivindicación 7, en donde el componente farmacéuticamente activo adicional comprende un corticosteroide, un surfactante, una hormona, un antibiótico, un prostanoide, o un agente citotóxico.
9. Un dispensador como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que está adaptado para facilitar la administración oral de la formulación líquida de óxido nítrico nebulizada.
- 25 10. El uso de óxido nítrico en la preparación de una composición terapéutica para la administración en forma nebulizada, la dicha composición que está en la forma de una formulación líquida que tiene una cantidad clínicamente eficaz de óxido nítrico disuelto y/o disperso en el mismo, en donde la formulación líquida es una solución acuosa y en donde la formulación líquida contiene de 10 a 40,000 ppb (partes por mil millones) en peso de NO.
11. El uso de acuerdo con la reivindicación 10, en donde la formulación líquida contiene de 100 a 10,000 ppb de NO.
- 30 12. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 11, en donde la composición es una composición para el tratamiento de una enfermedad respiratoria, que es bronquiectasia, aspergilosis broncopulmonar alérgica, *Chlamydia pneumonia*, enfermedad pulmonar obstructiva, *Bacillus anthracis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, síndrome de dificultad respiratoria aguda, enfermedad pulmonar ocupacional, enfermedad pulmonar alérgica, o alteración de la función respiratoria, bronquiolitis por RSV, precipitar las exacerbaciones de asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), neumonía vírica, neumonía, tuberculosis, síndrome de dificultad respiratoria aguda (ARDS), lesión pulmonar aguda, insuficiencia respiratoria hipoxémica o asma.
- 35 13. El uso de acuerdo con la reivindicación 10, en donde la composición es una composición para el tratamiento antimicrobiano.
14. El uso de acuerdo con la reivindicación 10, en donde la composición es una composición para vasodilatación.

40

Figura 1

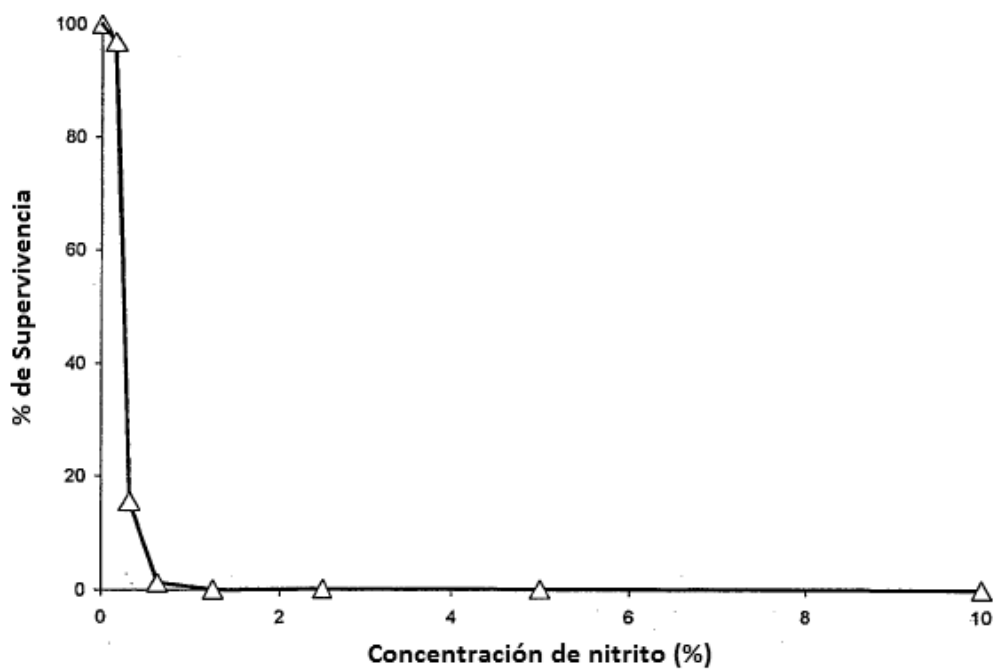


Figura 2

