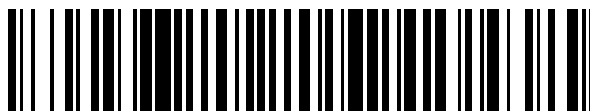


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 600 253**

51 Int. Cl.:

A23L 3/34 (2006.01)
A61M 1/16 (2006.01)
A61K 31/23 (2006.01)
A61K 31/4164 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)
A61P 31/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.11.2009** **PCT/EP2009/065524**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.05.2010** **WO10057966**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.11.2009** **E 09756735 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.09.2016** **EP 2346501**

54 Título: **Uso de tensioactivos catiónicos para la inactivación de toxinas**

30 Prioridad:

21.11.2008 US 116705 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
08.02.2017

73 Titular/es:

VEDEQSA INC. (100.0%)
11 Penn Plaza 5th Floor
New York, New York 10001, US

72 Inventor/es:

GAFFAR, ABDUL y
ROCABAYERA BONVILA, XAVIER

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 600 253 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

Uso de tensioactivos catiónicos para la inactivación de toxinas

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere al uso de agentes tensioactivos catiónicos con propiedades antimicrobianas como agentes para la inactivación de las toxinas

10 Técnica anterior

Las endotoxinas son macromoléculas complejas que contienen lípidos, hidratos de carbono y proteínas. Se encuentran principalmente en la superficie de los organismos gramnegativos y se refieren generalmente como lipopolisacáridos (LPS). Estas macromoléculas son tóxicas para el huésped y pueden ser fatales. Por ejemplo, pueden causar inflamación, shock hipotensor grave y provocar diversas reacciones tóxicas en el cuerpo. A veces se libera LPS a partir de bacterias que se están muriendo o bien a través de la acción del sistema de defensa natural del cuerpo o debido a la administración de antibióticos (Holzheimer, R. G., 2001: J. Chemother. 13:159-172).

Los agentes antimicrobianos todavía representan el tratamiento más importante de las reacciones tóxicas inducidas por endotoxinas, pero son insuficientes, ya que no hay tratamiento eficaz neutralizante de las endotoxinas que inactiven y secuestren el LPS.

Recientemente, las lipopoliaminas han demostrado resultados prometedores para la neutralización de endotoxinas. Las lipopoliaminas son moléculas anfifílicas policatiónicas utilizadas originalmente como agentes de transfección de ADN. Estos agentes se unen y neutralizan el LPS con afinidad comparable a la polimixina B, un antibiótico peptídico policatiónico de origen microbiano, que es uno de los neutralizantes de LPS más potentes, pero tiene una toxicidad significativa (David, S.A., 2001: J. Mol. Recognit. 14, 370-387; Jerala, R. & Porro, M., 2004. Curr.Top.Med.Chem. 4.1173-1184). La solicitud de patente de Estados Unidos 2007/0238655 describe el uso de la terapia de gelsolina para la prevención de la mortalidad inducida por LPS.

La solicitud de patente de Estados Unidos 2007/0287750 describe ciertas sulfonamidas policatiónicas lipofílicas que desactivan el LPS. Sin embargo, estos compuestos también inducen la lisis de los glóbulos rojos y tienen una utilidad limitada *in vivo*. Los lipopéptidos para endotoxinas neutralizantes se divulgan en la solicitud de patente de Eslovenia SI 20877A. Los péptidos antimicrobianos para endotoxinas neutralizantes se describen en el documento WO 2001/92290A2. Este documento se refiere al péptido gomesina con 18 residuos de 18 que posee actividad para lisar los glóbulos rojos. El uso de agentes antimicrobianos, tales como taurolidina, se describe en el documento WO 99/34805A2. Estas sustancias antimicrobianas desactivan endotoxinas mediante la liberación de formaldehído que es tóxico. Otros agentes de unión a endotoxinas basada en péptidos basados en protegrina se dan a conocer en el documento WO 97/18826A1. De manera similar, la protegrina de origen natural para neutralizar la endotoxina de bacterias gramnegativas se describen en Journal of Infección and Chemotherapy 1997, Vol. (1), pág. 27-32 de Sawada, H.

La técnica anterior describe agentes para la unión e inactivación de endotoxinas que tienen varias deficiencias para su uso en alimentos, cosméticos, bebidas y preparaciones farmacéuticas. La mayoría de ellos inducen la lisis de los glóbulos rojos, liberan subproductos tóxicos o son caros de fabricar. Por lo tanto, hay un gran interés en la obtención de nuevos agentes para inactivar endotoxinas que superen las desventajas de estas sustancias.

Otros productos tóxicos excretados por los microorganismos son exotoxinas y aflatoxinas. Con estos tipos de toxinas existe la misma situación insatisfactoria de no tener las herramientas para la inactivación de estos productos.

Una exotoxina es una proteína soluble excretada por un microorganismo, incluyendo bacterias, hongos, algas y protozoos. Una exotoxina puede causar daños en el huésped mediante la destrucción de células o la interrupción del metabolismo celular normal. Las bacterias gramnegativas, así como las bacterias grampositivas, producen exotoxinas. Son muy potentes y pueden causar daños importantes en el huésped. Las exotoxinas pueden ser secretadas, o, de forma similar a las endotoxinas, puede liberarse durante la lisis de la célula.

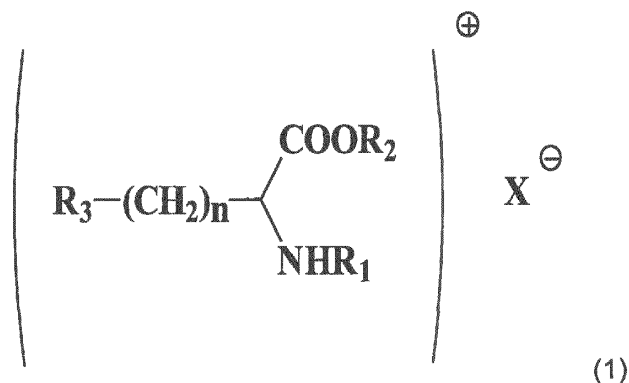
La mayoría de las exotoxinas se pueden destruir por calentamiento. Pueden ejercer su efecto localmente o producir efectos sistémicos. Las exotoxinas bien conocidas incluyen la toxina botulínica producida por *Clostridium botulinum* y la exotoxina de *Corynebacterium diphtheriae* que se produce durante los síntomas potencialmente mortales de difteria.

Las exotoxinas son susceptibles a los anticuerpos producidos por el sistema inmunológico, pero muchas exotoxinas son tan tóxicas que pueden ser mortales para el huésped antes de que el sistema inmunológico tenga la oportunidad de montar defensas contra ellas.

Las aflatoxinas son micotoxinas de origen natural que son producidas por muchas especies de *Aspergillus*, un hongo, especialmente *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus*. Las aflatoxinas son tóxicas y se encuentran entre las sustancias más carcinogénicas conocidas. Después de entrar en el cuerpo, las aflatoxinas son metabolizadas por el hígado en un intermedio reactivo, la aflatoxina M₁, un epóxido.

Los tensioactivos catiónicos se conocen como conservantes utilizados en la industria alimentaria, cosmética y farmacéutica. Los tensioactivos catiónicos han resultado ser muy eficaces contra la proliferación microbiana y, al mismo tiempo, seguros para el consumo por seres humanos y mamíferos en general. Por todo esto, los tensioactivos catiónicos son una herramienta atractiva en la industria.

Se ha demostrado que los tensioactivos catiónicos según la fórmula (1) derivados de la condensación de ácidos grasos y aminoácidos dibásicos esterificados son sustancias protectoras altamente eficaces contra microorganismos.



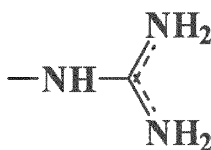
en la que:

X⁻ es un contraión derivado de un ácido orgánico o inorgánico, preferentemente Br⁻, Cl⁻ o HSO₄⁻, o un anión a partir de un compuesto fenólico.

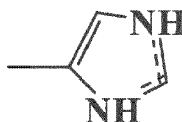
R₁: es una cadena de alquilo lineal de un ácido graso saturado o ácido hidroxílico que tiene de 8 a 14 átomos unidos al grupo α-aminoácido a través de un enlace amídico.

R₂: es una cadena de alquilo lineal o ramificada de 1 a 18 átomos de carbono o un grupo aromático;

R₃: es



o



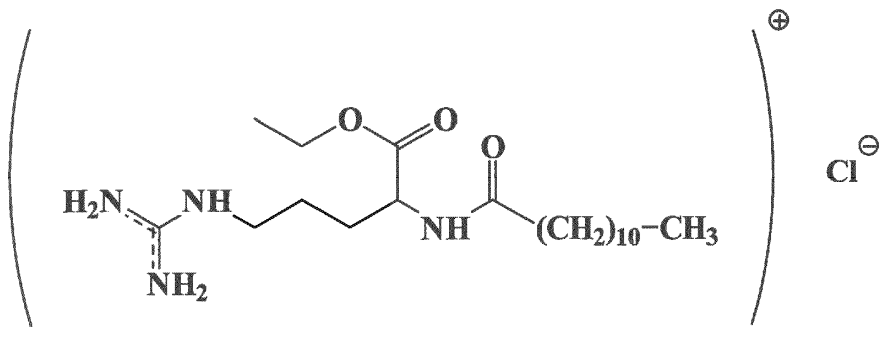
donde n es de 0 a 4.

Los ácidos orgánicos que pueden ser la fuente del contraión X⁻ puede ser ácido cítrico, ácido láctico, ácido acético, ácido fumárico, ácido maleico, ácido glucónico, ácido propiónico, ácido sórbico, ácido benzoico, ácido carbónico, ácido glutámico u otros aminoácidos, ácido láurico y ácidos grasos tales como ácido oleico y ácido linoleico, mientras que los ácidos inorgánicos pueden ser ácido fosfórico, ácido nítrico y ácido tiocianico.

El compuesto fenólico que puede ser la base del anión X⁻ es, por ejemplo, hidroxianisol butilado (BHA) y el hidroxitolueno butilado relacionado, hidroquinona de butilo terciario y parabenos, tales como metilparabeno, etilparabeno, propilparabeno y butilparabeno.

El compuesto más preferido de la clase anterior de compuestos es el éster etílico de la lauramida del monoclorhidrato de arginina, en lo sucesivo denominado LAE (n.º CAS 60372-77-2). Este compuesto es ahora bien

conocido por su uso como agente antimicrobiano. En el uso práctico, el LAE resultó ser bien tolerado y mostrar una toxicidad muy baja para los seres humanos. El LAE tiene la estructura química de fórmula (2) mostrada a continuación en el presente documento.



El compuesto LAE es notable por su actividad contra diferentes microorganismos, como bacterias, mohos y levaduras, que pueden estar presentes en los productos alimentarios (documento WO 03/034842) y también en formulaciones y preparaciones cosméticas (documentos WO 03/013453, WO 03/013454 y WO 03/043593). El compuesto se ha descrito, además, por su efecto sobre los parásitos en los peces, tales como en las larvas de Anisakis o de otras especies (solicitud europea 07 382 004,5). Su acción conservante es particularmente pronunciada en una combinación con un fungicida de polieno, tal como natamicina (PCT/EP2007/060598). Además, se ha demostrado que es eficaz para matar las endosporas y que tiene un efecto en las infecciones por virus (solicitud europea 08 382 025,8). Se ha descrito el uso específico para la protección de los dientes contra la erosión dental (solicitud europea 08 382 007,6).

La preparación general de los tensioactivos catiónicos se describe en la patente española ES 512.643 y las solicitudes de patente internacional WO 96/21642, WO 01/94292 y WO 03/064669.

LAE, también conocido como arginato láurico, está fabricado por Laboratorios Miret, S.A. (LAMIRSA, España). El arginato láurico aparece en las listas de la FDA (Food and Drug Administration) como una sustancia GRAS (generalmente reconocida como segura) como GRN 000164. El USDA (Departamento de Agricultura de los Estados Unidos) ha aprobado su uso en productos cárnicos y avícolas (Directiva del FSIS 7120.1) y también como ayuda del procesamiento para productos cárnicos y avícolas frescos.

Se ha estudiado el metabolismo del tensioactivo catiónico anterior de fórmula (2) en ratas; estos estudios han demostrado una rápida absorción y metabolización en aminoácidos de origen natural y el ácido láurico ácido graso, que, finalmente, son excretados como dióxido de carbono y urea. Los estudios toxicológicos han demostrado que el LAE es completamente inofensivo para los animales y los seres humanos.

Por lo tanto, el LAE y los compuestos relacionados son particularmente adecuados para su uso en la conservación de todos los productos alimenticios perecederos. El LAE y los compuestos relacionados son igualmente adecuados para su uso en productos cosméticos o médicos y en dispositivos médicos, en los que el crecimiento de microorganismos es frecuente.

Como se ha señalado anteriormente, los tensioactivos catiónicos son notables por su acción inhibitoria sobre la proliferación de diferentes microorganismos, tales como bacterias, hongos y levaduras. Las concentraciones inhibitorias mínimas de LAE se muestran en la tabla 1 siguiente.

Tabla 1

Tipo	Microorganismo	CMI (ppm)
Bacterias Gram+	<i>Arthrobacter oxydans</i> ATCC 8010	64
	<i>Bacillus cereus</i> var <i>mycoide</i> ATCC 11778	32
	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	16
	<i>Clostridium perfringens</i> ATCC 77454	16
	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644	10
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	32
	<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9631	128
	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp <i>lactis</i> CECT 372	16
	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> CETC 912	32
	<i>Alcaligenes faecalis</i> ATCC 8750	64
Bacterias Gram-	<i>Bordetella bronchiseptica</i> ATCC 4617	128
	<i>Citrobacter freundii</i> ATCC 22636	64
	<i>Enterobacter aerogenes</i> CECT 689	32

	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	32
	<i>Escherichia coli</i> 0157H7	20
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> var <i>pneumoniae</i> CECT	32
	178	64
	<i>Proteus mirabilis</i> CECT 170	32
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	32
	<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC16028	2
	<i>Serratia marcescens</i> CECT 274	
	<i>Mycobacterium phlei</i> ATCC 41423	
Hongos	<i>Aspergillus niger</i> ATCC14604	32
	<i>Aureobasidium pullulans</i> ATCC 9348	16
	<i>Gliocadium virens</i> ATCC 4645	32
	<i>Chaetonium globosum</i> ATCC 6205	16
	<i>Penicillium chrysogenum</i> CECT 2802	128
	<i>Penicillium funiculosum</i> CECT 2914	16
Levadura	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	16
	<i>Rhodotorula rubra</i> CECT 1158	16
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 9763	32

Se prefiere disolver el compuesto directamente antes de su uso en uno de los siguientes disolventes preferidos de calidad alimentaria: agua, etanol, propilenglicol, alcohol isopropílico, otros glicoles, mezclas de glicoles y mezclas de glicoles y agua, diacetina, triacetina, glicerol, sorbitol, manitol y xilitol. Si el tratamiento se lleva a cabo a un valor de pH específico, el uso de una solución tampón correspondiente puede ser recomendable. Por otro lado, el compuesto puede usarse fácilmente en su forma sólida o formularse con vehículos sólidos tales como sal, azúcar, maltodextrina, hidrocoloides y sorbitol.

Para los agentes tensioactivos catiónicos de la fórmula anterior (1), la actividad antibacteriana y la actividad biológica contra otros microorganismos tales como hongos y levaduras están bien documentadas.

Sumario de la invención

La materia sujeto que no está abarcada por el alcance de las reivindicaciones no forma parte de la invención reivindicada en el presente documento.

Es el objeto de la presente invención es proporcionar un nuevo método para la inactivación de los efectos de las toxinas en los productos alimentarios y bebidas y sobre las superficies de los equipos médicos.

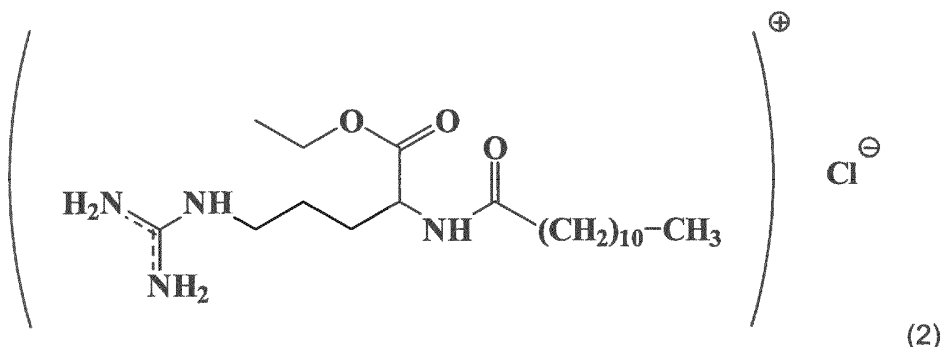
Más en particular, es el objeto de la presente invención proporcionar un nuevo método para la inhibición de endotoxinas (LPS) liberadas de bacterias Gramnegativas con el fin de reducir o mitigar los daños causados por LPS en los animales y los seres humanos que ingieren productos alimentarios o bebidas que están contaminadas con endotoxinas, o que han estado en contacto con las superficies de los equipos médicos que están contaminadas.

Es el objeto adicional de la presente invención es proporcionar un nuevo método para la inhibición de exotoxinas y aflatoxinas en los productos alimentarios y bebidas y sobre las superficies de los equipos médicos.

Los inventores de la presente invención han observado, sorprendentemente, que los objetos de la presente invención pueden resolverse mediante el uso de los tensioactivos catiónicos derivados de la condensación de ácidos grasos y aminoácidos dibásicos esterificados de la fórmula anterior (1). Se ha observado, que la adición directa de estos tensioactivos catiónicos derivados de la condensación de ácidos grasos y aminoácidos dibásicos esterificados de la fórmula anterior (1) para productos alimentarios y bebidas provoca la inactivación de las endotoxinas. Se ha observado que los tensioactivos catiónicos derivados de la condensación de ácidos grasos y aminoácidos dibásicos esterificados de la fórmula anterior (1) puede conducir a una reducción de la inflamación y a una mejora del shock hipotensor después del contacto con endotoxinas y, en consecuencia, los tensioactivos catiónicos son adecuados para su uso en un método de tratamiento médico para la inactivación in vivo de las endotoxinas que son liberadas a partir de bacterias gramnegativas. Se han observado efectos beneficiosos similares en la interacción con las exotoxinas y las aflatoxinas.

Descripción de las realizaciones preferidas

El compuesto más preferido de la clase anterior de compuestos es el éster etílico de la lauramida del monoclorhidrato de arginina, en lo sucesivo denominado LAE (n.º CAS 60372-77-2). Este compuesto es particularmente eficaz para la inactivación de las toxinas. El LAE tiene la estructura química de fórmula (2) mostrada a continuación en el presente documento.



Los tensioactivos catiónicos de la fórmula general (1) se han descrito como agentes antimicrobianos.

Los tensioactivos catiónicos se utilizan regularmente como agentes conservantes en productos tales como productos alimentarios y preparados médicos y cosméticos o para dispositivos médicos.

Se prefiere especialmente el uso de los tensioactivos catiónicos de fórmula general (1) para la conservación de productos cárnicos, como, por ejemplo carne, productos de aves de corral, pescado, crustáceos, vegetales, verduras, emulsiones, salsas, productos de confitería, panadería, productos lácteos, productos a base de huevos, mermeladas, gelatinas, bebidas, zumos, vinos y cervezas.

Sorprendentemente, ahora, los inventores han descubierto que el LAE (monoclorhidrato del éster etílico de N-alfa-lauroil-L-arginina etil) y sus homólogos se unen a LPS (lipopolisacáridos) y los neutralizan. Debido a la baja toxicidad de LAE para su uso en alimentos, bebidas, cosméticos y aplicaciones farmacéuticas, este sorprendente hallazgo tiene un gran valor práctico para la neutralización y destoxificación de las toxinas producidas por bacterias patógenas.

El LAE y sus homólogos descritos en el presente documento se pueden añadir directamente a alimentos, carnes, bebidas, productos de aves de corral, peces y crustáceos (gambas, mariscos) para inactivar las toxinas a la concentración de la concentración en el alimento de 0,1 mg/kg a 100.000 mg/kg, preferentemente a de 1 mg/kg a 10.000 mg/kg, y más preferentemente de 5 mg/kg a 1000 mg/kg.

El LAE y sus homólogos descritos en el presente documento se pueden administrar a animales o pacientes humanos por cualquier método convencional disponible para su uso, en combinación con excipientes, productos terapéuticos farmacéuticos, ya sea como agentes terapéuticos individuales o en una combinación de agentes terapéuticos.

a dosis administrada a un animal, particularmente a un ser humano, en el contexto de la presente invención debe ser suficiente para afectar a una respuesta terapéutica en el animal o el paciente humano durante un período de tiempo razonable. Un experto en la materia reconocerá que la dosificación dependerá de diversos factores, incluyendo una afección del animal, el peso corporal del animal, así como la afección que se esté analizando

Una dosis adecuada es la que dará como resultado una concentración del agente activo en un paciente que se sabe que afecta a la respuesta deseada.

El tamaño de la dosis estará determinado por la vía, el momento y la frecuencia de administración, así como la existencia, la naturaleza y la extensión de cualquier efecto secundario adverso que pueda acompañar la administración del compuesto y al efecto fisiológico deseado.

Formas de dosificación farmacéuticas útiles para administración de los compuestos de acuerdo con la presente invención se pueden ilustrar del siguiente modo:

Cápsulas de cubierta dura:

Se prepara un gran número de cápsulas unitarias cargando cápsulas de gelatina dura convencionales de dos piezas con 1.000 mg de principio activo en polvo, 150 mg de lactosa, 50 mg de celulosa y 6 mg de estearato de magnesio.

Cápsulas de gelatina blanda

Se prepara una mezcla de ingrediente activo en un aceite digerible, tal como aceite de soja, aceite de semilla de algodón o aceite de oliva y se inyecta por medio de una bomba de desplazamiento positivo en gelatina fundida, para formar cápsulas de gelatina blanda que contienen de 100 a 1.000 mg de principio activo. Las cápsulas se lavan y se

secan. Los tensioactivos catiónicos se pueden disolver en una mezcla de polietilenglicol, glicerina y sorbitol, para preparar una mezcla de medicina miscible en agua.

Los tensioactivos catiónicos de fórmula (1), más en particular LAE, como el tipo preferido de tensioactivo catiónico, se pueden administrar por vía oral en formas de dosificación sólidas, tales como cápsulas, comprimidos y polvos, o en formas de dosificación líquidas, tales como elixires, jarabes y suspensiones. También se puede administrar por vía parenteral, en formas de dosificación líquidas estériles. Los tensioactivos catiónicos de fórmula (1) también se pueden administrar por vía intranasal (gotas nasales) o por inhalación de una niebla de polvo de fármaco. Otras formas de dosificación son potencialmente posibles, tales como la administración transdérmica, a través de un mecanismo de parche o pomada. El principio activo puede administrarse empleando un sistema de administración de liberación sostenida o retardada o un sistema de administración de liberación inmediata.

La dosis administrada a los pacientes variará, por supuesto, en función de factores conocidos, tales como las características farmacodinámicas del agente concreto y su modo y vía de administración; la edad, el estado de salud y el peso del receptor; la naturaleza y extensión de los síntomas; el tipo de tratamiento concurrente; la frecuencia del tratamiento; y el efecto deseado. Una dosis diaria de principio activo de tensioactivo catiónico de fórmula (1) por administración oral se puede esperar que sea de aproximadamente 0,01 mg/kg de peso corporal a 900 mg/kilogramo de peso corporal, preferentemente de 0,05 mg/kg de peso corporal a 90 mg/kg de peso corporal y, más preferentemente, de 0,1 mg/kg de peso corporal a 9 mg/kg de peso corporal.

Las formas de dosificación para la administración oral (composiciones adecuadas para administración) contienen de 1 a 500 mg de principio activo del agente tensioactivo catiónico por unidad. En estas composiciones farmacéuticas, normalmente el principio activo estará presente en una cantidad de 0,05 % - 95 % en peso basado en el peso total de la composición.

Las formulaciones adecuadas para administración oral pueden consistir en (a) soluciones líquidas, tal como una cantidad eficaz del compuesto disuelta en diluyentes, tales como agua, solución salina, o zumo de naranja; (b) cápsulas, sobres, comprimidos, pastillas, y trociscos, conteniendo cada uno una cantidad predeterminada del ingrediente activo, como sólidos o gránulos; (c) polvos; (d) suspensiones en un líquido apropiado; y (e) emulsiones adecuadas. Las formulaciones líquidas pueden incluir diluyentes, tales como agua y alcoholes, por ejemplo, etanol, alcohol bencílico, propilenglicol, glicerina y los alcoholes de polietileno, con o sin la adición de un tensioactivo farmacéuticamente aceptable, agente de suspensión o agente emulsionante. Las formas de cápsula pueden ser del tipo de gelatina con recubrimiento duro o blando habitual que contiene, por ejemplo, tensioactivos, lubricantes y cargas inertes, tales como lactosa, sacarosa, fosfato de calcio, y almidón de maíz. Las formas de comprimidos pueden incluir una o más de las siguientes: lactosa, sacarosa, manitol, almidón de maíz, almidón de patata, ácido alginico, celulosa microcristalina, goma arábiga, gelatina, goma guar, dióxido de silicio coloidal, croscarmelosa sódica, talco, estearato de magnesio, estearato de calcio, estearato de cinc, ácido esteárico, y otros excipientes, colorantes, diluyentes, agentes tampón, agentes disgregantes, agentes humectantes, conservantes, agentes aromatizantes y vehículos farmacológicamente compatibles. Las formas de pastilla pueden comprender el principio activo de la presente divulgación en un sabor, habitualmente sacarosa y goma arábiga o tragacanto, así como pastillas que comprenden el principio activo de la presente divulgación en una base inerte, tal como gelatina y glicerina, o sacarosa y goma arábiga, emulsiones y geles, que contienen, además del ingrediente activo, vehículos tales como se conocen en la materia.

Los compuestos de la presente divulgación, solos o en combinación con otros componentes adecuados, se pueden preparar en formulaciones en aerosol para administrarse por inhalación. Estas formulaciones en aerosol se pueden colocar en propelentes presurizados aceptables, tales como diclorodifluorometano, propano y nitrógeno. También se pueden formular como productos farmacéuticos para preparaciones no presurizadas, tal como en un nebulizador o un atomizador.

La dosificación en administración parenteral estará en el intervalo de 0,01 a 900 mg/kg de peso corporal, preferentemente de 0,05 a 90 mg/kg de peso corporal y, lo más preferentemente, de 0,1 a 9 mg/kg de peso corporal.

Las formulaciones adecuadas para la administración parenteral incluyen soluciones inyectables estériles isotónicas acuosas y no acuosas que pueden contener antioxidantes, tampones, bacterioestáticos y solutos, que hacen que la formulación sea isotónica con la sangre del receptor que se pretenda; y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión, solubilizantes, agentes espesantes, estabilizantes y conservantes. El compuesto se puede administrar en diluyentes fisiológicamente aceptables en un vehículo farmacéutico, tal como un líquido o mezcla de líquidos estériles, incluyendo agua, solución salina, dextrosa acuosa y soluciones de azúcares relacionados, un alcohol, tal como etanol, isopropanolol o alcohol hexadecílico, glicoles, tales como propilenglicol o polietilenglicol, tales como polietilenglicol 400, cetales de glicerol tales como 2,2-dimetil-1,3-dioxolano-4-metanol, éteres, un aceite, un ácido graso, un éster de ácido graso o glicérido o un glicérido de ácido graso acetilado con o sin la adición de un tensioactivo farmacéuticamente aceptable, tal como un jabón o un detergente, agente de suspensión, tales como pectina, carbómeros, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa o carboximetilcelulosa, o agentes emulsionantes y otros adyuvantes farmacéuticos. Los aceites que se pueden utilizar en formulaciones parenterales incluyen petróleo, aceites animales, vegetales o sintéticos. Los ejemplos específicos

de aceites incluyen de cacahuete, de soja, de sésamo, de semilla de algodón, de maíz, de oliva, vaselina, y mineral. Los ácidos grasos adecuados para su uso en formulaciones parenterales incluyen ácido oleico, ácido esteárico y ácido isoesteárico. El oleato de etilo y el miristato de isopropilo son ejemplos de ésteres de ácidos grasos adecuados. Los jabones adecuados, para su uso en formulaciones parenterales incluyen sales de metales alcalinos grasos, amonio, y trietanolamina, y detergentes adecuados incluyen (a) detergentes catiónicos tales como, por ejemplo haluros de dimetildialquilamonio y haluros de alquilpiridinio; (b) detergentes no iónicos, tales como, por ejemplo, óxidos de aminas grasas, alcanolamidas de ácidos grasos, y copolímeros de polioxietileno polipropileno; (c) detergentes anfóteros, tales como, por ejemplo, alquilbetaaaminopropionatos y sales de amonio cuaternario de 2-alquilimidazolina; y (d) mezclas de los mismos.

Las formulaciones parenterales contienen normalmente del 0,1 % al 25 % en peso del tensioactivo catiónico en la solución. En tales formulaciones se pueden usar conservantes y tampones adecuados. Con el fin de minimizar o eliminar la irritación en el sitio de inyección, tales composiciones pueden contener uno o más tensioactivos no iónicos que tienen un equilibrio hidrófilo-lipófilo (HLB) de aproximadamente 12 a 17. La cantidad de dichos tensioactivos en las formulaciones varía desde el 5 % al 15 % en peso. Los tensioactivos no iónicos adecuados que tienen un equilibrio hidrófilo-lipófilo (HLB) de 12 a 17 incluyen ésteres de ácidos grasos de sorbitano de polietilenglicol, tales como monooleato de sorbitano y aductos de alto peso molecular de óxido de etileno con una base hidrofóbica, formados mediante la condensación de óxido de propileno con propilenglicol.

Los excipientes farmacéuticamente aceptables son también bien conocidos por los expertos en la técnica. La elección del excipiente se determinará, en parte, mediante el compuesto en particular, así como por el método particular usado para administrar la composición. De acuerdo con lo anterior, existe una amplia variedad de formulaciones adecuadas de la composición farmacéutica de la presente invención. Los siguientes métodos y excipientes son meramente de ejemplo y no son en modo alguno limitativos. Los excipientes farmacéuticamente aceptables, preferentemente, no interfieren en la acción de los principios activos y no causan efectos secundarios adversos. Los vehículos y excipientes adecuados incluyen disolventes tales como agua, alcohol y propilenglicol, absorbentes sólidos y diluyentes, agentes de superficie activa agentes de suspensión, aglutinantes de comprimidos, lubricantes, sabores y agentes colorantes. Las formulaciones se pueden presentar en recipientes sellados de dosis unitaria o de dosis múltiple, tales como ampollas y viales sellados, y se pueden almacenar en estado de secado por congelación (liofilizada) que requiere únicamente la adición de los excipientes líquidos estériles, por ejemplo, agua para inyectables, inmediatamente antes de su uso. Las soluciones y suspensiones inyectables inmediatas pueden prepararse a partir de polvos, gránulos y comprimidos extemporáneas. Los requisitos para los vehículos farmacéuticos eficaces para las composiciones inyectables son bien conocidos para los expertos en la materia, véase, *Pharmaceutics and Pharmacy Practice*, J.B. Lippincott Co., Philadelphia, PA., Banker and Chalmers, Eds., 238-250 (1982) y *ASHP Handbook on Injectable Drugs*, Toissel, 4ª ed., 622-630 (1986). Las formulaciones adecuadas para administración tópica incluyen pastillas para chupar que comprenden el principio activo en un sabor, normalmente un edulcorante artificial tal como sucralosa y sacarina y goma arábica y goma de tragacanto; pastillas que comprenden el principio activo en una base inerte, tal como gelatina y glicerina, o sacarosa y goma arábica; y colutorios que comprenden el principio activo en un vehículo líquido adecuado; así como cremas, emulsiones y geles que contienen, además del ingrediente activo, vehículos tales como los conocidos en la técnica.

El LAE se puede aplicar como polvo seco o en forma líquida o formulación de crema con apósito para heridas en cantidades de 0,01 mg/kg de peso corporal a 2.000 mg/kg de peso corporal para prevenir la sepsis y estimular la curación, siendo las cantidades preferidas de 0,05 mg/kg de peso corporal a 500 mg/kg de peso corporal y, lo más preferido, de 0,1 mg/kg de peso corporal a 50 mg/kg de peso corporal.

Adicionalmente, las formulaciones adecuadas para la administración rectal se pueden presentar como supositorios mezclando con diversas bases, tales como bases emulsionantes o bases solubles en agua. Las formulaciones adecuadas para administración vaginal pueden presentarse como pesarios, tampones, cremas, geles, pastas, espumas o formulaciones de pulverización que contienen además del ingrediente activo, transportadores como los conocidos en la técnica que son adecuados.

Los tensioactivos catiónicos de la fórmula (1), más en particular LAE de la fórmula (2), se pueden utilizar para el tratamiento de cualquier superficie que puede entrar en contacto con cualquiera de las toxinas descritas en la presente solicitud, tales como endotoxinas, exotoxinas y aflatoxinas. Este uso específico puede ser particularmente útil para tales superficies que forman parte de los equipos médicos, tales como, por ejemplo, catéteres u otro equipo de infusión. El tratamiento de las superficies de los catéteres y otros equipos de infusión con los tensioactivos catiónicos de la fórmula (1) conduce al efecto altamente favorable de inactivar cualquier endotoxina que pueden estar presentes en el medio que fluye a través del catéter u otro equipo de infusión. El nivel de dosis adecuada está entre el 0,2 % y el 1 % de tensioactivo catiónico unido a la superficie de los catéteres u otros dispositivos médicos. De la misma manera, puede inactivar cualquier exotoxina o aflatoxina que pueda estar presente. Esta es una realización particularmente preferida de la presente invención.

La utilidad de la presente invención será evidente a partir de los siguientes ejemplos ilustrativos. Cualquier gama de los valores dados en el presente documento se puede ampliar o modificar sin perder los efectos que se pretenden, como será evidente para el experto con una comprensión de la enseñanza en el presente documento.

Ejemplo 1**Efecto de diferentes concentraciones de LAE sobre endotoxinas producidas por *E. coli* 0113: H10****5 Objetivo:**

El primer objetivo de este experimento fue evaluar y comparar dos ensayos LAL (ensayo turbidimétrico y de pirocromo). El segundo objetivo de este experimento preliminar fue determinar el efecto del LAE sobre endotoxinas producidas por *E. coli* O113:H10 que se utiliza como patrón. La actividad de la endotoxina tratada con LAE se evaluó a través de ambos métodos.

Materiales y métodos:

El ensayo turbidimétrico LAL se llevó a cabo de acuerdo con las instrucciones proporcionadas por el fabricante (Pyrotell-T, The associates of Cape Cod, Inc.). La curva patrón se construyó sobre la base de 300, 30, 3, 0,3, 0,03 y 0,003 UE/ml. En el experimento se usó la misma endotoxina a concentraciones de 12,5 mg/ml.

El LAE se aplicó a concentraciones de 0, 5, 10, 20, 30, 50 µg/ml para evaluar la capacidad de este compuesto para desactivar endotoxinas. Se usó agua de reactivo LAL (LRW) para hacer todas las diluciones de endotoxinas, incluyendo los patrones. MIRENAT-CF es una solución del 10,5 % de LAE en propilenglicol, por lo que las diluciones de MIRENAT-CF se realizaron inicialmente en propilenglicol, por lo que la concentración de LAE se mantuvo como la única variable. Para el posible procedimiento de desactivación, la endotoxina se incubó junto con LAE durante dos horas a 37 °C. El ensayo turbidimétrico se llevó a cabo dos veces usando el tiempo de inicio de DO405 = 0,05. El ensayo de pirocromo se llevó a cabo vez utilizando la misma plantilla en placas.

Resultados:**Efecto de diferentes concentraciones de LAE sobre endotoxinas producidas por *E. coli* 0113: H10****Tabla 2**

CONCENTRACIÓN DE LAE (µg/ml)	CONCENTRACIÓN DE ENDOTOXINA (UE/ml x10E3)
0	120
10	80
50	61
LAE a 50 µg/ml redujo la actividad de la endotoxina en un 50 %	

Los resultados de los dos ensayos fueron similares, sin embargo, el ensayo de pirocromo no fue tan sensible a concentraciones más bajas de endotoxina.

35 Efecto del propilenglicol sobre la recuperación de endotoxinas mediante el ensayo de LAL**Objetivo:**

Se usa propilenglicol (PG) como disolvente para LAE en los productos MIRENAT. Este compuesto se utilizará como control negativo en los experimentos; pero que puede interferir con el proceso de recuperación de endotoxinas mediante el ensayo LAL. El soporte técnico en Associates of Cape Cod indicó que el PG se ha clasificado como sustancia interferente, sin embargo, a las concentraciones a las que se utiliza este compuesto dentro de la placa (1 µg/ml) no debe interferir con el ensayo. En este experimento se analiza el efecto de PG sobre la recuperación de endotoxinas.

Materiales y métodos:

500 µl del LPS de *S. typhimurium* LPS (intervalo 50-0,4 µg/ml) se mezclaron con 500 µl de la solución de 1 mg/ml del PG o con 500 µl de agua destilada estéril usada para hacer las diluciones. Cada mezcla se incubó durante dos horas a 37 °C y después se diluyó en serie dentro de los tubos de reacción de vidrio utilizando el agua de reactivo LAL. A continuación, se usó un ensayo turbidimétrico LAL para evaluar la recuperación de las endotoxinas después del tratamiento con PG. El experimento se repitió dos veces por duplicado.

Resultados

El propilenglicol, a las concentraciones utilizadas para el ensayo, no interfiere con la recuperación del LPS.

Ejemplo 2

Investigación de la respuesta de desactivación de endotoxinas en función de la concentración de LAE con *Salmonella typhimurium*.

Objetivo:

El objetivo de este experimento era construir la curva de respuesta a la dosis para las concentraciones de LAE en el intervalo de 5-50 µg/ml (50-500 ppm de la preparación MIRENAT-CF).

Materiales y métodos:

La solución madre de 1 mg/ml de LPS de *S. typhimurium* se preparó usando el LPS disponible comercialmente obtenido de List Biological Laboratories, Inc. (n.º cat. 225). La solución de 20 µg/ml de LPS se preparó diluyendo en serie la reserva. Todas las soluciones de LPS se mantuvieron a temperaturas de refrigeración de acuerdo con las instrucciones proporcionadas por el fabricante.

Las soluciones de LAE preparadas se usaron en el experimento. Para el procedimiento, 500 µl de 20 µg/ml de endotoxinas se mezclaron con 500 µl de la solución de LAE (10, 20, 40, 60 y 100 µg/ml) en tubos de reacción de vidrio, dando la concentración final de LPS, 10 µg/ml y el intervalo de concentración de LAE, 5-50 µg/ml. Como control negativo, el LPS se mezcló con una solución acuosa de 1 mg/ml de propilenglicol. La mezcla se incubó durante 2 horas a 37 °C. Cada muestra se diluyó en serie utilizando el agua de reactivo LAL que se va a analizar para la actividad de la endotoxina.

Resultados y discusión:

Las tres diluciones de cada muestra usada en la placa (1000X, 10.000X, 100.000X) estaban dentro del intervalo de la curva patrón. Los resultados se ajustaron usando el factor de dilución apropiado. La misma curva patrón siguió una buena tendencia.

LAE a concentraciones de 5 a 50 µg/ml disminuyó significativamente la actividad de las endotoxinas de *S. typhimurium*.

Los resultados indicaron que LAE en forma de MIRENAT-CF disminuyó la actividad de las endotoxinas de *S. typhimurium*, tal como se detectan mediante el ensayo LAL.

Tabla 3

CONCENTRACIÓN DE LAE (µg/ml)	CONCENTRACIÓN DE ENDOTOXINA (UE/ml x10E3)
0	17000
5	4000
10	3995
20	3000
30	4000
50	2500

Este efecto de desactivación, sin embargo, no sigue una respuesta a la dosis para el intervalo de concentración investigada del LAE (5-50 µg/ml).

Los resultados obtenidos en los ejemplos 1 y 2 demuestran claramente la sorprendente capacidad de LAE en concentraciones muy bajas para inactivar las endotoxinas de *Salmonella* y *E. coli*.

Ejemplo 3**Efecto de LAE sobre la actividad de LPS sobre los sistemas de cultivo celular humanos**

Para evaluar si LAE es capaz de unirse a las endotoxinas y neutraliza su efecto citotóxico, se realizó el siguiente experimento. La toxicidad de las endotoxinas se midió usando células humanas.

Las líneas de células epiteliales humanas (KB) se obtuvieron de la Colección Americana de Cultivos Tipo y se cultivaron en medio BGJ (Gibco, Buffalo, NY) a 37 °C con 5 % de CO₂. El medio se suplementó con suero de ternera caliente al 5 %. Las células se colocaron en placas de 24 pocillos con 0,5 ml de medio por pocillo. La liberación de peptidasas de las líneas celulares humanas en respuesta a LPS se midió por un sustrato fluorogénico basado en cumarina utilizada para estudiar enzimas eucariotas que degradan las proteínas de la matriz extracelular (colágeno y fibronectina) y se inactivó mediante inhibidores de las metaloproteasas de la matriz (Yang et al. Resumen105 en el

105 Congreso general de la ASM).

Resultados y discusión

- 5 Cuando las células humanas se exponen a LPS, las células liberan peptidasas, lo que indica que no hay daño celular. La liberación de peptidasa se midió mediante la prueba de fluorescencia sensible.

Los resultados representados a continuación en la tabla 4 indican el efecto dependiente de la dosis de LPS sobre la inducción de peptidasa.

10

La liberación de peptidasa de una muestra no tratada fue de 400 unidades de fluorescencia.

La adición de LAE a una concentración de 2 µg/ml al LPS dio lugar a una reducción significativa de la respuesta de peptidasa a ambas dosis de LPS analizadas.

15

Tabla 4

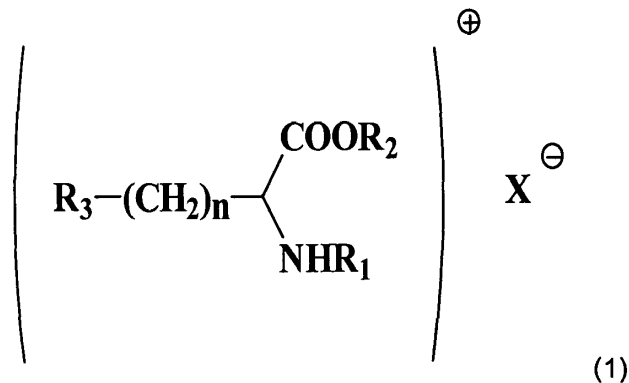
Conc. de LAE (µg/ml)	Conc. de LPS (µg/ml)	Peptidasa liberada (unidades de fluorescencia)
0 (muestra blanco)	0	400
2	0	296
0	10	900
2	10	580
0	20	1200
2	20	655

- 20 La exposición de las células a 10 µg/ml o 20 µg/ml de LPS provocó la liberación de peptidasa. Cuando el LPS se mezcló previamente con 2 µg/ml de LAE, la toxicidad de LPS (medida mediante la liberación de fluorescencia) se redujo sorprendentemente en un 35,6 % para la premezcla con 10 µg/ml de LPS y en un 45,4 % para la premezcla con 20 µg/ml de LPS.

- 25 A una concentración muy baja, 2 µg de LAE/ml fueron eficaces en la reducción de la toxicidad de la endotoxina a las células humanas. Esta baja concentración se eligió para asegurar que el LAE *per se* no provocó la liberación de las enzimas, dado que a 2 µg de LAE/ml dieron lugar a la liberación de peptidasa de menos de 300 unidades, similar al blanco. Por lo tanto, el efecto se debe a la unión de LAE a LPS para reducir la toxicidad.

REIVINDICACIONES

1. Uso de un tensioactivo catiónico derivado de la condensación de ácidos grasos y aminoácidos dibásicos esterificados, de acuerdo con la siguiente fórmula (1):



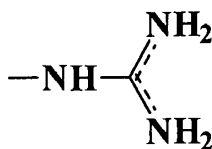
en la que

X⁻ es un contraión derivado de un ácido orgánico o inorgánico, preferentemente Br⁻, Cl⁻ o HSO₄⁻, o un anión a partir de un compuesto fenólico;

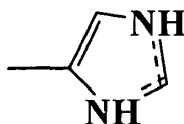
R₁: es una cadena de alquilo lineal de un ácido graso saturado o un ácido hidroxílico que tiene de 8 a 14 átomos de carbono unidos al grupo α-aminoácido a través de un enlace amídico;

R₂: es una cadena de alquilo lineal o ramificada de 1 a 18 átomos de carbono o un grupo aromático;

R₃: es



o

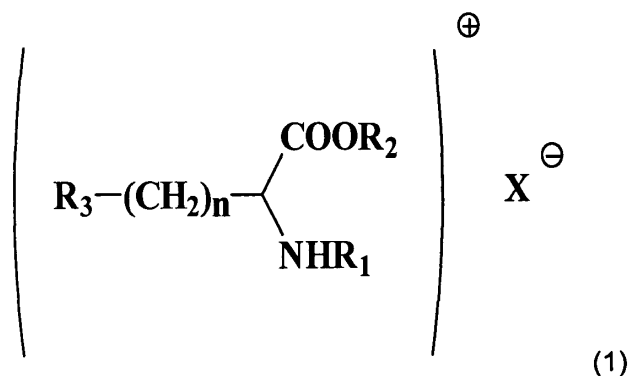


donde n es de 0 a 4,

para la inactivación de endotoxinas (lipopolisacáridos, LPS) liberadas por bacterias gramnegativas, exotoxinas o aflatoxinas en productos alimentarios y bebidas.

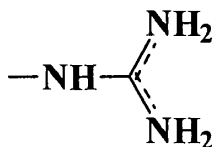
2. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el tensioactivo catiónico se añade a un producto alimentario a una concentración de 0,1 a 100.000 mg/kg del producto alimentario, preferentemente de 1 a 10.000 mg/kg de producto alimentario y, lo más preferentemente, de 5 a 1.000 mg/kg de producto alimentario

3. Uso de un tensioactivo catiónico derivado de la condensación de ácidos grasos y aminoácidos dibásicos esterificados, de acuerdo con la siguiente fórmula (1):

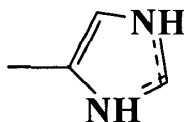


en la que

- 5 X^- es un contraión derivado de un ácido orgánico o inorgánico, preferentemente Br^- , Cl^- o HSO_4^- , o un anión a partir de un compuesto fenólico;
 R_1 : es una cadena de alquilo lineal de un ácido graso saturado o un ácido hidroxiácido que tiene de 8 a 14 átomos de carbono unidos al grupo α -aminoácido a través de un enlace amídico;
 R_2 : es una cadena de alquilo lineal o ramificada de 1 a 18 átomos de carbono o un grupo aromático;
 R_3 : es



o



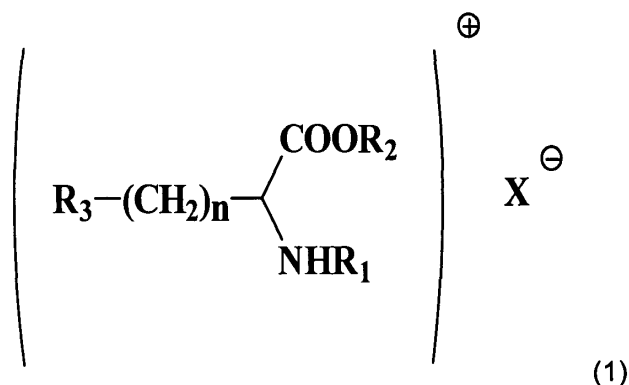
20 donde n es de 0 a 4,

para la inactivación de endotoxinas (lipopolisacáridos, LPS) liberadas por bacterias gramnegativas, exotoxinas o aflatoxinas en superficies de equipos médicos.

25 4. El uso de acuerdo con la reivindicación 3 en un método para el tratamiento de dispositivos médicos mediante recubrimiento con tensioactivos catiónicos unidos a sus superficies a niveles de dosis de entre el 0,2 % y el 1 %.

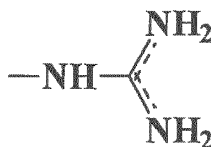
5. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el compuesto es el éster etílico de la lauramida del clorhidrato de arginina (LAE).

30 6. Un tensioactivo catiónico derivado de la condensación de ácidos grasos y aminoácidos dibásicos esterificados, de acuerdo con la siguiente fórmula (1):

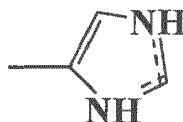


en la que

- 5 X⁻ es un contraión derivado de un ácido orgánico o inorgánico, preferentemente Br⁻, Cl⁻ o HSO₄⁻, o un anión a partir de un compuesto fenólico;
 R₁: es una cadena de alquilo lineal de un ácido graso saturado o un ácido hidroxílico que tiene de 8 a 14 átomos de carbono unidos al grupo α-aminoácido a través de un enlace amídico;
 R₂: es una cadena de alquilo lineal o ramificada de 1 a 18 átomos de carbono o un grupo aromático;
 10 R₃: es



- 15 o



- 20 donde n es de 0 a 4,

para su uso en un método de tratamiento médico para la inactivación *in vivo* de endotoxinas (lipopolisacáridos, LPS) liberadas por bacterias gramnegativas, exotoxinas o aflatoxinas.

- 25 7. El tensioactivo catiónico para el uso de acuerdo con la reivindicación 6 en un método para el tratamiento del cuerpo humano o animal por administración oral, tópica y parenteral.

8. El tensioactivo catiónico para el uso de acuerdo con la reivindicación 6 en un método para el tratamiento del cuerpo humano o animal por administración rectal o vaginal o mediante inhalación.

- 30 9. El tensioactivo catiónico para el uso de acuerdo con la reivindicación 7, en el que el tensioactivo catiónico se administra por vía oral a una dosis de 0,01 a 900 mg/kg de peso corporal, preferentemente de 0,05 a 90 mg/kg de peso corporal y, más preferentemente, de 0,1 a 9 mg/kg de peso corporal.

- 35 10. El tensioactivo catiónico para su uso de acuerdo con la reivindicación 7, en el que la administración oral puede consistir en una suspensión, una emulsión, una forma líquida, tales como elixires y jarabes, o una forma sólida, tales como cápsulas, comprimidos, sobres, pastillas para chupar, polvo o trociscos.

- 40 11. El tensioactivo catiónico para su uso de acuerdo con la reivindicación 7, en donde el tensioactivo catiónico se administra por vía parenteral a una dosis de 0,01 a 900 mg/kg de peso corporal, preferentemente de 0,05 a 90 mg/kg de peso corporal y, más preferentemente, de 0,1 a 9 mg/kg de peso corporal.

12. El tensioactivo catiónico para su uso de acuerdo con la reivindicación 11, en donde la administración parenteral puede consistir en una forma líquida estéril.

- 45 13. El tensioactivo catiónico para el uso de acuerdo con la reivindicación 6, en donde el tensioactivo catiónico se

administra mediante aplicación dérmica a una dosis de 0,01 a 2.000 mg/kg de peso corporal, preferentemente de 0,05 a 500 mg/kg de peso corporal y, más preferentemente, de 0,1 a 50 mg/kg de peso corporal.

5 14. El tensioactivo catiónico para el uso de acuerdo con la reivindicación 13, en donde la administración dérmica puede consistir en un mecanismo de parche o una pomada.

15. El tensioactivo catiónico para el uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6 a 14, en el que el compuesto es el éster etílico de la lauramida de clorhidrato de arginina (LAE).