

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: **2007.04.12**

(30) Prioridade(s): **2006.04.12 GB 0607402**

(43) Data de publicação do pedido: **2009.01.14**

(45) Data e BPI da concessão: **2013.09.04**
222/2013

(73) Titular(es):

**BARTS AND THE LONDON NATIONAL HEALTH
SERVICE TRUST
R & D OFFICE, ROYAL LONDON HOSPITAL, 4TH
FLOOR, ALEXANDER HOUSE WHITECHAPEL
LONDON E1 1BB GB
QUEEN MARY AND WESTFIELD COLLEGE GB**

(72) Inventor(es):

**ROBERT ALLAKER GB
CHARLES HINDS GB
ARTHUR TUDOR TUCKER GB**

(74) Mandatário:

**ÁLVARO ALBANO DUARTE CATANA
AVENIDA MARQUÊS DE TOMAR, Nº 44, 6º 1069-229 LISBOA
PT**

(54) Epígrafe: **COMPOSIÇÃO TERAPÊUTICA E UTILIZAÇÃO**

(57) Resumo:

O USO DE FORMULAÇÕES LÍQUIDAS NA PREPARAÇÃO DE UM MEDICAMENTO PARA PREVENÇÃO E TRATAMENTO DE INFECÇÕES ORAIS, GÁSTRICAS E DIGESTIVAS E EM PARTICULAR PARA A PREVENÇÃO DE PNEUMONIA ASSOCIADA A VENTILAÇÃO MECÂNICA, ASSIM COMO COMPOSIÇÕES LÍQUIDAS DE ALIMENTAÇÃO ARTIFICIAL ENTÉRICA E PARENTÉRICA. AS COMPOSIÇÕES DE ALIMENTAÇÃO ARTIFICIAL SÃO ADEQUADAS PARA USO NA PREVENÇÃO DA PNEUMONIA ASSOCIADA A VENTILAÇÃO MECÂNICA.

RESUMO

«COMPOSIÇÃO TERAPÊUTICA E UTILIZAÇÃO»

O uso de formulações líquidas na preparação de um medicamento para prevenção e tratamento de infecções orais, gástricas e digestivas e em particular para a prevenção de pneumonia associada a ventilação mecânica, assim como composições líquidas de alimentação artificial entérica e parentérica. As composições de alimentação artificial são adequadas para uso na prevenção da pneumonia associada a ventilação mecânica.

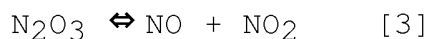
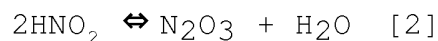
DESCRIÇÃO

«COMPOSIÇÃO TERAPÊUTICA E UTILIZAÇÃO»

[0001] A presente invenção refere-se ao uso de formulações líquidas na preparação de um medicamento para prevenção e tratamento de infecções orais, gástricas e digestivas e, em particular, para a prevenção de pneumonia associada a ventilação mecânica, assim como composições líquidas de alimentação artificial entérica e parentérica. As composições de alimentação são adequadas para uso na prevenção da pneumonia associada a ventilação mecânica.

[0002] O óxido nítrico é formado naturalmente no estômago a partir de uma reacção do nitrito presente na saliva em combinação com o ácido no estômago.

[0003] Considera-se que produção de NO a partir de nitrito ocorre através do seguinte mecanismo:



[0004] Pensa-se que o ácido gástrico no estômago pode não ser suficiente para destruir microrganismos e, assim, que a produção de NO no estômago pode ajudar a matar estes microrganismos (McKnight et al, Chemical synthesis of nitric oxide in the stomach from dietary nitrate in humans. Gut 1997;40(2):211-4).

[0005] Tem havido muito interesse nos últimos anos em aplicações farmacêuticas de óxido nítrico [NO] e precursores de óxido nítrico. O óxido nítrico revelou possuir propriedades antimicrobianas, revistas por F. C. Fang (1997) (J. Clin. Invest. 99 (12) 2818-2825 (1997)).

[0006] A publicação W003/032928 concluiu que é possível formular soluções nas quais uma quantidade clinicamente eficaz de óxido nítrico é dissolvida ou dispersa. Estas soluções são então nebulizadas para pulverização para os pulmões para tratamento de determinadas doenças respiratórias.

[0007] Existem várias outras divulgações que também abordam o fornecimento artificial de óxido nítrico.

[0008] A publicação WO 95/22335 (Benjamin & Dougal) divulga uma forma farmacêutica para o tratamento de doenças bacterianas, virais ou fúngicas que compreende um agente acidificante farmacêuticamente aceitável, uma fonte farmacêuticamente aceitável de iões nitrito ou um precursor de nitrato destes, e um veículo ou diluente farmacêuticamente aceitável, em que o agente acidificante é adaptado para reduzir o pH no ambiente em que é usado para menos de pH 4. Preferencialmente, o agente acidificante é um ácido orgânico, por exemplo, ácido salicílico ou ácido ascórbico. O precursor para o ião nitrito pode ser um metal alcalino ou metal alcalino-terroso capaz de conversão para nitrato por acção enzimática. Numa forma particularmente preferida da invenção, o agente acidificante e a fonte de iões nitrito ou precursor são, assim, dispostos separadamente no

referido creme ou pomada para a mistura libertar iões nitrito no ambiente de utilização. Em alternativa, uma composição ácida pode ser apresentada para administração sob a forma líquida ou comprimida.

[0009] A publicação US-A-5648101 (Tawashi) divulga um método para administrar gás de NO a um local pretendido ou ao organismo de um animal senciente, e.g. um humano, compreendendo combinar e pôr em reacção um sal solúvel redutor, de preferência sulfato de ferro, e um nitrito, de preferência nitrito de sódio, na presença de humidade *in situ* ou adjacente a esse local. Os meios para essa administração incluem composições como comprimidos, cápsulas, pomadas, cremes, loções e *sprays* contendo misturas de partículas ou grânulos dos dois reagentes, adesivos transdérmicos e bombas osmóticas para combinar soluções de reagente ou reagentes *in situ*.

[0010] Wink *et al*, The role of nitric oxide chemistry in cancer treatment, (Biochemistry (Moscow) 802-809;63(7):1998) divulga o efeito do óxido nítrico em tumores de mamíferos. Divulgações actuais no campo do tratamento oncológico referem a produção endógena de óxido nítrico. As tentativas de aumentar a disponibilidade local têm-se limitado a intervenções não directas, como por exemplo, administração de precursores do óxido nítrico (L-arginina) e manobras para aumentar a semivida/biodisponibilidade do óxido nítrico endógeno através da modulação temporária das vias de degradação.

[0011] Outros métodos clínicos envolvendo a utilização de precursores de NO são divulgados na publicação WO-A-

99/02148, WO-A-95/09612 e Chemical Abstracts; 127:130755, B.H. Cuthbertson *et al*, British Journal of Anaesthesia, (1977), 78(6), 714-717.

[0012] O uso tópico de óxido nítrico gasoso e precursores de óxido nítrico como antimicrobianos também é conhecido. A publicação WO-A-01/53193 divulga o uso de nitrito acidificado para produzir óxido nítrico topicamente na superfície da pele. O tratamento é útil no tratamento da isquemia e doenças associadas.

[0013] Em aplicações tópicas à pele de nitrito em concentrações até 20% num creme ou pomada veículo inerte, o nitrito, quando misturado com um ácido orgânico como o ácido ascórbico (vitamina C), reage para produzir óxidos de nitrogénio que causam a libertação de óxidos nítricos conduzindo a vasodilatação prolongada dos vasos sanguíneos micro-circulatórios, sem inflamação significativa.

[0014] Revisões úteis do uso de NO na terapêutica são fornecidas nos seguintes artigos: 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.

[0015] A pneumonia associada a ventilação mecânica (PAV) é uma infecção nosocomial que ocorre em doentes sujeitos a ventilação mecânica durante mais de 48 horas (Young *et al*. 1999). A PAV de início precoce ocorre entre as 48 e as 72 horas após instituir a ventilação mecânica e considera-se

ser resultante da aspiração durante o processo de entubação traqueal. A PAV que se desenvolve para lá deste período é considerada de início tardio. A incidência reportada de PAV varia de cerca de 10% a mais de 30%, dependendo da gravidade média das patologias (*case-mix*) e dos critérios de diagnóstico. A PAV é a infecção mais prevalente em unidades de cuidados intensivos europeus e é responsável por quase metade de todas infecções adquiridas na UCI. O desenvolvimento de PAV prolonga os cuidados intensivos e a permanência no hospital e aumento de custos. Em doentes com síndrome de dificuldade respiratória aguda (SDRA), por exemplo a ocorrência de PAV foi responsável por um aumento de aproximadamente três vezes na duração da ventilação mecânica (Markowicz et. al 2000). Embora seja controverso, muitos consideram que o desenvolvimento de PAV também aumenta de modo independente a mortalidade (a mortalidade directamente atribuível a PAV tem sido estimada em cerca de 27%). Assim, são urgentemente necessárias novas intervenções para reduzir a morbilidade e mortalidade consideráveis associadas à PAV, assim como para reduzir custos, particularmente em vista do aumento da resistência dos agentes patogénicos bacterianos ao tratamento antimicrobiano tradicional (Bonten et al: Bird's eye view of nosocomial infections in medical ICU: blue bugs, fungi, and device days. Crit Care Med 1999,27:853-854; Bonten: Prevention of the infection in the Intensive Care Unit. Current Opinion in Critical Care, 2004,10:364-368; Richards MJ, Edwards JR, Culver DH, et al: Nosocomial infections in medical intensive care units in the United States. National nosocomial infections surveillance system. Crit Care Med 1999, 27:887-892).

[0016] O desenvolvimento de PAV de início tardio é habitualmente uma consequência da aspiração de secreções infectadas do tracto aerodigestivo para dentro das vias aéreas distais. Enquanto uma orofaringe saudável é colonizada por bactérias não patogénicas e o estômago é estéril, durante uma doença grave o estômago, orofaringe, áreas periodontal e seios nasais são colonizados por organismos patogénicos, incluindo bactérias aeróbicas gram-negativas, *Staphylococcus spp.* e *Pseudomonas spp.* Subsequentemente, as secreções infectadas que se concentram na orofaringe e na glote vazam para além do balão do tubo endotraqueal e são dispersas distalmente. Considera-se que a presença quase invariável de um tubo nasogástrico predispõe os doentes a refluxo gástrico e aumenta o potencial de aspiração. Além disso, o lúmen interno do tubo endotraqueal rapidamente desenvolve uma camada viscosa adesiva de incrustações contendo microrganismos patogénicos ("biofilme"), cujas partículas se podem desalojar e ser impelidas mais profundamente para dentro dos pulmões. Por outro lado, a inoculação directa a partir do aparelho respiratório contaminado ou do circuito ventilador é considerada uma causa invulgar de PAV. A vulnerabilidade dos doentes sujeitos a ventilação mecânica para o desenvolvimento de pneumonia nosocomial é aumentada pelo compromisso de mecanismos de defesa como o mecanismo da tosse e a redução da desobstrução mucociliar. A lesão das mucosas ao nível do balão e da ponta do tubo endotraqueal (talvez exacerbada pela aspiração de bÍlis e fluido gástrico) e danos à mucosa por cateteres de sucção expõe a membrana basal, facilitando a adesão e colonização bacteriana. Finalmente, os danos alveolares e a perda de surfactante comprometem ainda mais as defesas do pulmão.

[0017] McMullin et al, The Antimicrobial Effect of Nitric Oxide on the Bacteria That cause Nosocomial Pneumonia in Mechanically Ventilated Patients in the Intensive Care Unit, (November 2005) Respiratory Care Vol. 50, N.º 11, pp1451-1456 divulgam que 200 ppm de NO gasoso actuam como um anti-microbiano contra várias estirpes de bactérias encontradas na pneumonia nosocomial.

[0018] Consequentemente, poderia ser vantajoso encontrar um novo método de prevenção do desenvolvimento de PAV. Num primeiro aspecto da presente invenção, é fornecida uma formulação líquida que compreende uma quantidade clinicamente eficaz de óxidos de nitrogénio dissolvida e/ou dispersa para uso na prevenção de pneumonia associada a ventilação mecânica, em que a formulação líquida contém de 10 a 40.000 partes por bilião dos óxidos de nitrogénio.

[0019] Concluiu-se que em doentes ventilados mecanicamente, há uma grande redução da produção de óxido nítrico gástrico. Embora não pretendamos ficar limitados pela teoria, consideramos que esta redução na produção de óxido nítrico gástrico permite um aumento na colonização bacteriana do conteúdo do estômago. Isto predispõe o doente à PAV, especialmente quando combinado com a alcalinização das secreções gástricas pelos antagonistas dos receptores de H2.

[0020] O que se descobriu agora é que uma formulação líquida que compreenda óxidos de nitrogénio dissolvidos e/ou dispersos é útil na prevenção da proliferação

das bactéria para os pulmões.

[0021] A maior parte dos doentes sujeitos a ventilação mecânica são alimentados usando uma sonda entérica. Assim, um método adequado para administrar ao estômago a formulação líquida que contém os óxidos de nitrogénio é por sonda entérica. Um método preferido de administração de óxidos de nitrogénio ao estômago é assim o uso de uma composição líquida de alimentação que compreende óxidos de nitrogénio.

[0022] Num segundo aspecto da presente invenção, é fornecida uma composição líquida de alimentação artificial entérica que compreende uma quantidade clinicamente eficaz de óxidos de nitrogénio dissolvidos e/ou dispersos e pelo menos um nutriente.

[0023] A composição de alimentação permite que os óxidos de nitrogénio sejam fornecidos directamente ao estômago. Adicionalmente, a composição de alimentação pode igualmente evitar a formação microbiana (bacteriana, fúngica, viral e de protozoários) dentro da sonda entérica. Essa formação de colónias pode facilmente ocorrer porque o preparado de nutrientes líquidos fornece um ambiente particularmente bom para este crescimento bacteriano.

[0024] A solução que contém nutrientes tem preferencialmente um teor calórico variável, proteína, glicose, gordura, água, electrólitos, elementos vestigiais e vitaminas; mas pode variar de acordo com a indicação clínica. A alimentação entérica pode ser classificada em

três categorias: dietas quimicamente definidas, dietas especificamente formuladas e dietas poliméricas padronizadas. Dietas elementares ou quimicamente definidas contêm nutrientes que requerem pouca ou nenhuma digestão e são, assim, facilmente absorvidos. Dietas especialmente formuladas são aquelas concebidas para ultrapassar um problema específico a nível da digestão, como a intolerância à lactose. A dieta polimérica padrão tem proteína inteira em vez de aminoácidos como fonte de nitrogénio e é apropriada quando a função gastrointestinal é normal ou quase normal. Preparações adequadas para alimentação artificial são habitualmente de um de três tipos: alimentos normais passados por uma misturadora e peneirados, preparações de pó reconstituídas que requerem a adição de água ou leite e produtos prontos a administrar. É particularmente preferido que o preparado alimentar seja uma composição líquida de alimentação entérica comercialmente disponível sob a designação comercial Osmolite®.

[0025] As formulações líquidas da presente invenção e, particularmente, a composição de alimentação podem adicionalmente incluir outros componentes. Através da adição destes componentes, a aderência, duração do contacto e a extensão da acção biológica pretendida das formulações líquidas podem ser reforçadas. Componentes adicionais preferidos incluem agentes espumantes (como sabão e detergentes), para reduzir o desvio do sistema descarregado *in situ*. Outros componentes adicionais preferidos incluem agentes gelificantes (para aumentar a viscosidade), espessantes (para aumentar o tamanho de gotícula), dispersantes (para melhorar o revestimento uniforme de uma superfície alvo), estabilizadores e

tampões (para manutenção da integridade do sistema e melhorar a combinação eficaz com agentes adicionais) e surfactantes (para melhorar a molhabilidade de uma superfície alvo).

[0026] Os óxidos de nitrogénio podem estar presentes nas formulações líquidas de acordo com a invenção na solução verdadeira, e/ou sob a forma de uma dispersão ou suspensão (por exemplo, em suspensão coloidal). Todas as formulações desse tipo são aqui designadas como "soluções".

[0027] Os óxidos de nitrogénio que estão presentes compreendem óxido nítrico. Contudo, outros óxidos de nitrogénio podem igualmente estar presentes na mistura. Uma série de óxidos de nitrogénio está habitualmente presente.

[0028] Nessas formulações líquidas, as composições eficazes geralmente contêm concentrações de NO disperso e/ou dissolvido no intervalo de 10 a 40.000 ppb (partes por bilião) por peso, de preferência de 100 a 10.000 ppb, mais preferencialmente de 1000 a 10.000 ppb.

[0029] As formulações líquidas empregues de acordo com a presente invenção podem ser preparadas através da utilização de um agente acidificante farmacologicamente aceitável, em conjunto com uma fonte farmacologicamente aceitável de iões nitrito ou um precursor de nitrito.

[0030] É preferido que o óxido nítrico seja dissolvido ou suspenso num líquido, quer passando o NO gasoso por um

líquido, quer gerando NO *in situ* no líquido.

[0031] É preferido que o NO seja gerado no líquido *in situ* pela reacção de pelo menos um nitrito e pelo menos um ácido. Por exemplo, o NO pode ser produzido em solução aquosa pela reacção de nitrito 0,5 molar com ácido cítrico 0,5 molar, que resulta numa concentração de NO disperso ou dissolvido na formulação líquida, após evolução de gás, na ordem de 1.500 ppb (1,5 ppm). Adicionalmente, a formulação líquida resultante permanece estável pelo período necessário para o uso na prevenção da pneumonia associada a ventilação mecânica (por exemplo, por períodos superiores a uma hora).

[0032] Um método preferido de geração de NO é a reacção de NaNO_2 e KNO_2 com ácido ascórbico. É particularmente preferido que sejam usadas quantidades equimolares de NaNO_2 e KNO_2 . Numa modalidade favorável, o NO é gerado por uma reacção de um volume de NaNO_2 1M e um volume igual de KNO_2 1M com duas vezes o volume de ácido ascórbico 1M.

[0033] O pH da formulação líquida resultante pode ser manipulado pela titulação do agente acidificante e/ou utilização subsequente de tampão químico usando técnicas padrão para criar uma formulação farmacêuticamente aceitável.

[0034] O agente acidificante pode incluir qualquer ácido orgânico adequado como ácido ascórbico (vitamina C), ácido salicílico, ácido acetilsalicílico, ácido acético ou um sal ou derivado deste, geralmente numa concentração até

20% p/v, de preferência de 0,25 a 10% p/v, mais preferencialmente 4 a 6% p/v. Uma concentração particularmente preferida é 4% ou 5% p/v. Outros agentes acidificantes incluem, mas não se limitam a, sais de amônio ou alumínio, fenol e ácido benzóico. Podem ser usados ácidos inorgânicos, como ácido clorídrico, se suficientemente diluídos e/ou adequadamente tamponados. O agente acidificante pode estar presente como sal dissolvido ou numa forma líquida.

[0035] A fonte farmacologicamente aceitável de iões de nitrito pode ser nitrito de metal alcalino ou nitrito de metal alcalino-terroso, por exemplo, LiNO_2 , NaNO_2 , KNO_2 , RbNO_2 , CsNO_2 , FrNO_2 , $\text{Be}(\text{NO}_2)_2$, $\text{Mg}(\text{NO}_2)_2$, $\text{Ca}(\text{NO}_2)_2$, $\text{Sr}(\text{NO}_2)_2$, $\text{Ba}(\text{NO}_2)_2$ ou $\text{Ra}(\text{NO}_2)_2$. Em alternativa, um precursor de nitrito pode ser usado como fonte dos iões nitrito na composição, como por exemplo uma solução diluída de ácido nítrico. Outras fontes de iões nitrito são iões nitrato derivados de sais de metais alcalinos ou sais de metais alcalino-terrosos capazes de conversão enzimática em nitrito, por exemplo, LiNO_3 , NaNO_3 , KNO_3 , RbNO_3 , CsNO_3 , FrNO_3 , $\text{Be}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Sr}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Ba}(\text{NO}_3)_2$ ou $\text{Ra}(\text{NO}_3)_2$. A concentração da fonte de ião nitrato antes da acidificação pode ser até 20% p/v, adequadamente 0,25 a 10%, de preferência 4 a 6%. Uma concentração particularmente preferida é 4% ou 5% p/v.

[0036] A formulação líquida empregue de acordo com a invenção é, de preferência, saturada com óxido nítrico em solução.

[0037] Características descritas em conexão com um

aspecto da invenção podem igualmente ser usadas em conexão com outros aspectos da invenção.

[0038] As modalidades preferidas da invenção serão agora descritas, em função das figuras que a acompanham, nas quais:

A Figura 1 mostra placas de agar contendo *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina tratadas com:

- A - ácido ascórbico
- B - ácido ascórbico, NaNO_2 e KNO_2 pré-misturados
- C - NaNO_2 seguido de ácido ascórbico e
- D - KNO_2 seguido de ácido ascórbico;

A Figura 2 mostra placas de agar contendo *Candida Albicans* tratadas com:

- A - ácido ascórbico
- B - ácido ascórbico, NaNO_2 e KNO_2 pré-misturados
- C - NaNO_2 seguido de ácido ascórbico e
- D - KNO_2 seguido de ácido ascórbico;

A Figura 3 mostra placas de agar contendo *Pseudomonas Aeruginosa* tratadas com:

- A - ácido ascórbico
- B - ácido ascórbico, NaNO_2 e KNO_2 pré-misturados
- C - NaNO_2 seguido de ácido ascórbico e
- D - KNO_2 seguido de ácido ascórbico;

A Figura 4 mostra placas de agar contendo estafilococos coagulase-negativos tratadas com:

- A - ácido ascórbico
- B - ácido ascórbico, NaNO_2 e KNO_2 pré-misturados
- C - NaNO_2 seguido de ácido ascórbico e
- D - KNO_2 seguido de ácido ascórbico;

A Figura 5 mostra uma placa de agar contendo *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina tratada com gás de óxido nítrico;

A Figura 6 mostra o efeito de um óxido de nitrogénio contendo uma mistura numa série de estirpes diferentes de bactérias;

A Figura 7 mostra o efeito de uma mistura de óxidos de nitrogénio em Osmolite® em *Pseudomonas Aeruginosa*;

A Figura 8 mostra o efeito de uma mistura de óxidos de nitrogénio em Osmolite® em estafilococos coagulase-negativos;

A Figura 9 mostra o efeito de uma mistura de óxidos de nitrogénio em Osmolite® em *Candida albicans*;

A Figura 10 mostra o efeito de uma mistura de óxidos de nitrogénio em Osmolite® sobre *Escherichia coli*; e

A Figura 11 mostra o efeito de uma mistura de óxidos de nitrogénio em Osmolite® em *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina.

A Figura 12 mostra o efeito no pH da adição incrementiva de ácido ao nitrito.

A Figura 13 mostra o efeito no pH da adição em bruto de ácido ao nitrito.

A Figura 14 mostra uma série de espectros Raman após a adição de ácido ao nitrito.

A Figura 15 mostra as propriedades bacteriostáticas e bactericidas de uma mistura de óxidos de nitrogénio em várias bactérias.

Exemplos

[0039] Foram preparados vários Exemplos para testar a eficácia de soluções contendo óxidos de nitrogénio como bactericidas.

Exemplos 1 a 4

[0040] Uma solução geradora de "óxidos de nitrogénio" pré-misturados foi preparada através da acidificação de nitrito de sódio (NaNO_2) e nitrito de potássio (KNO_2) com ácido ascórbico. Uma solução 1M de nitrito de sódio foi preparada dissolvendo 6,9g de NaNO_2 em 100 ml de água destilada. Uma solução 1M de nitrito de potássio foi preparada diluindo 8,51g de KNO_2 em 100ml de água destilada. 17,612g de ácido ascórbico foram diluídos em 100ml de água destilada para formar uma solução 1M. As três soluções stock foram preparadas alguns minutos antes das experiências.

[0041] Um volume de NaNO_2 e um volume igual de KNO_2 foram misturados com duas vezes o volume de ácido ascórbico num recipiente estéril para produzir uma solução contendo "óxidos de nitrogénio". Ocorreu instantaneamente uma reacção entre os nitritos e o ácido. O gás produzido foi libertado e foram adicionados 2 ml do líquido pré-misturado

(0,25M) a 20 ml de água destilada para obter uma concentração final da solução de 1,25mM.

[0042] Amostras separadas de NaNO_2 , KNO_2 e ácido ascórbico foram igualmente preparadas como descrito acima.

[0043] O efeito antibacteriano de:

- A) ácido ascórbico isoladamente,
- B) a solução geradora de "óxidos de nitrogénio" pré-misturados,
- C) uma combinação de NaNO_2 e ácido ascórbico adicionados separadamente e
- D) uma combinação de KNO_2 e ácido ascórbico adicionados separadamente

foram determinados sendo testados em:

- Exemplo 1 - *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA),
- Exemplo 2 - *Candida Albicans* (CA),
- Exemplo 3 - *Pseudomonas Aeruginosa* (PS), e
- Exemplo 4 - Estafilococos coagulase-negativos (ECN).

[0044] Foi preparada uma cultura de bactérias de um dia para o outro pela inoculação de 20 ml de meio líquido LB (Luria-Bertani 10g de Bacto-triptona, + 5g de extracto de Bacto-levedura, + 10g de cloreto de sódio por litro, a pH 7,5) com 2 a 3 colónias e incubando a 37°C de um dia para o outro. Foram produzidas culturas de meio líquido

contendo aproximadamente 109 organismos. As bactérias foram diluídas 1:1000 usando solução salina de tampão fosfato (PBS) e 100 ml de culturas de meio líquido diluído foram inoculadas nas placas com agar Cérebro-Coração. Antes de inocular bactérias na superfície das placas de agar, foi removido um pedaço de agar (aproximadamente 70mm de diâmetro) do centro das placas.

[0045] Em A), de modo a testar a potência bactericida do ácido ascórbico 0,25M, foram diluídos mais 50 ml de solução stock (1M). Foram adicionados 280 ml de ácido ascórbico 0,25M ao círculo oco das placas de agar inoculadas com as bactérias.

Em B), foram adicionados 280 ml da solução geradora de "óxido de nitrogénio" (concentração final 0,25M) aos círculos ocos nas placas de agar.

Em C) e D), o efeito antibacteriano do gás de NO foi testado adicionando agentes químicos separadamente em vez de pré-misturar as soluções. Em C), 140ml (0,5M) de NaNO₂ foram adicionados às placas de agar, seguidos de 140ml (0,5M) de ácido ascórbico. A reacção ocorreu e as placas de agar foram cobertas instantaneamente com a tampa. O mesmo procedimento foi repetido em D) usando KNO₂ e ácido ascórbico.

[0046] Os resultados estão apresentados nas Figuras 1 a 4. Pode observar-se que para cada um dos Exemplos 1 a 4, há uma grande quantidade de bactérias quando o ácido ascórbico apenas é usado em A). Contudo, em B, C e D, a maior parte das colónias de bactérias foram destruídas.

Exemplo 5

[0047] Uma cultura de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) foi produzida do mesmo modo que para os Exemplos 1 a 4. A placa de agar foi colocada numa caixa de poliestireno. Foi produzido NO gasoso colocando em reacção 10ml de ácido ascórbico 1M com 5ml de NaNO₂ 1M e 5ml de KNO₂ 1M na caixa e a tampa da caixa é substituída imediatamente, seguindo-se incubação da cultura de um dia para o outro.

[0048] Os resultados estão apresentados na Figura 5. Como pode ser observado, não há culturas bacterianas visíveis remanescentes.

Exemplos 6 a 10

[0049] O efeito bactericida da solução geradora de óxidos de nitrogénio foi testado sob condições que simulam o estômago. A Figura 6 mostra que a exposição de bactérias à solução geradora de óxidos de nitrogénio durante 1 hora resultou em 97% de morte em média para cinco bactérias diferentes testadas, nomeadamente *Pseudomonas Aeruginosa*; estafilococo coagulase-negativo; *Candida albicans*; *Escherichia coli*; e *Staphylococcus Aureus*. O design experimental foi idêntico ao descrito nos Exemplos 1 a 4.

Exemplos 11 a 15

[0050] A solução geradora de óxidos de nitrogénio usada nos Exemplos 1 a 4 foi usada para testar a sua actividade anti-microbiana em Osmolite® para alimentação entérica comercialmente disponível usado para nutrição de doentes

em UCI. O efeito da mistura foi testado em *Pseudomonas Aeruginosa* (PS), estafilococo coagulase-negativo (ECN), *Escherichia coli* (*E. Coli*) *Candida Albicans* e *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina.

[0051] Foram preparadas culturas de bactérias pela inoculação de 20 ml de meio líquido LB (Luria-Bertani 10g de Bacto-triptona, + 5g de extracto de Bacto-levedura, + 10g de cloreto de sódio por litro, a pH 7,5) com 2-3 colónias e incubando a 37°C de um dia para o outro. Foram produzidas culturas de meio líquido contendo aproximadamente 10⁹ organismos. Bactérias foram diluídas 1:1000 em solução salina de tampão fosfato (PBS) e 100 ml de culturas de meio líquido diluído foram colocadas em 20 ml de Osmolite® para alimentação entérica comercialmente disponível usada em UCI para nutrição de doentes.

[0052] Foram adicionados 2 ml da solução geradora de óxidos de nitrogénio pré-misturados a 20 ml das bactérias que contêm Osmolite®, dando uma concentração final da solução de 1,25mM. Foi usado o mesmo volume de água estéril como controlo. Foi realizada incubação de 20 ml de preparado contaminado contendo 2 ml de mistura geradora de óxidos de nitrogénio ou água estéril durante 1h a 37°C. Após 1h de incubação, amostras de preparado (100 ml) foram colocadas em placas de agar de sangue e espalhadas usando uma espátula estéril. As placas foram incubadas durante 20 h a 37°C. Os números de colónias foram contados e os dados expressos como percentagem de morte ou simplesmente como comparação de número de colónias visíveis no grupo tratado e grupo de controlo.

[0053] Os resultados estão apresentados na Figuras 7 a

11. A Figura 7 mostra o efeito em *Pseudomonas Aeruginosa*, a Figura 8 mostra o efeito em estafilococos coagulase-negativos (ECN), a Figura 9 mostra o efeito em *Candida Albicans*, a Figura 10 mostra o efeito em *Escherichia Coli* (*E. Coli*) e a Figura 11 mostra o efeito em *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA).

[0054] Os resultados demonstram claramente que o óxido de nitrogénio contendo a mistura destrói a maior parte das colónias bacterianas.

[0055] Os resultados mostram que as soluções que contêm óxido de nitrogénio podem ser usadas em segurança para higiene orofaríngea dos doentes.

[0056] Também se descobriu que quando o nitrito e o ácido não são pré-misturados, o nitrito pode reagir com o preparado alimentar produzindo um precipitado. Por exemplo, nitrito seguido da adição de ácido ascórbico ocasiona precipitação significativa das proteínas, o que aumenta a viscosidade do preparado alimentar. Por este motivo, os componentes devem ser pré-misturados para produzir a solução geradora de óxidos de nitrogénio. O aumento da viscosidade do preparado aumenta substancialmente os riscos conhecidos de bloqueio do cateter.

[0057] Assim, a produção de nitrito acidificado pela adição de agentes químicos separadamente não é uma formulação de escolha em termos de desenvolvimento e prevenção de um tratamento potencial. Além disso, a menos que seja usada solução geradora de NO/NOx pré-misturada,

doentes já vulneráveis devido à ventilação mecânica, habitualmente recebendo inibidores de H₂, podem estar expostos a um risco maior de desenvolver uma ulcera gástrica.

[0058] Outro benefício da solução geradora de óxidos de nitrogénio pré-misturados é que o efeito antibacteriano é exibido numa gama mais ampla de níveis de pH, *i.e.* não apenas inferior a 5,0.

[0059] Assim, a solução pode ser usada em segurança para a higiene orofaríngea dos doentes.

[0060] Além disso, os componentes residuais das reacções de nitrito acidificado, em particular ácido ascórbico (Vitamina C), têm um papel individual nutricional e protector. A vitamina C é um antioxidante poderoso solúvel em água, que protege as lipoproteínas de baixa densidade da oxidação, reduzindo os oxidantes nocivos no estômago (por exemplo, radicais livres de peroxinitrito) e promove a absorção do ferro.

Exemplos 16 e 17

[0061] A alteração de pH foi medida quando o ácido L-ascórbico foi adicionado incrementalmente a nitrito de sódio e como uma única adição. Foram usados nitrito de sódio (NaNO₂) e ácido L-ascórbico (C₆H₈O₆) de qualidade analítica (pureza >99%) da Sigma-Aldrich, UK. Foi igualmente usada solução salina (0,9 % p/v de NaCl) da Baxter Healthcare-UK.

[0062] Solução salina normal foi usada como solvente na preparação das soluções de nitrito de sódio e ácido ascórbico. Todas as soluções foram preparadas à temperatura ambiente (22-25 °C) em lotes de 25 ou 50 ml e foram usadas no prazo de 10-20 dias. As soluções armazenadas foram mantidas em recipientes estanques protegidos da luz.

[0063] Todas as medições de pH das soluções foram realizadas com um medidor de pH Wissenschaftlich-Technische Werkstätten (WTW), modelo pH340i, em conjunto com um eléctrodo de pH combinado SenTix 20 que incorpora um termopar. O eléctrodo foi calibrado com soluções de calibração tampão recém-preparadas (pH 7,00 e 4,00 $\pm 0,002$). As soluções de calibração foram preparadas a partir de cápsulas de tampão Tri-check ALDRICH, da Aldrich, USA.

[0064] O pH das soluções foi determinado com a adição de um agitador magnético standard operando a 60 rpm. Foram usados pelo menos 12 ml de solução para assegurar que o eléctrodo estava completamente imerso. Foram preparadas soluções 1M de nitrito de sódio e ácido ascórbico usando solução salina normal como solvente. No Exemplo 16, foi adicionado 1 ml de ácido ao nitrito a cada 10 minutos. No Exemplo 17, foram adicionados 5ml de ácido ascórbico 1M a 12ml de solução de nitrito de sódio 1M.

[0065] Os resultados podem ser observados nas Figuras 12 e 13.

[0066] No Exemplo 16, o pH inicial da solução de nitrito

de sódio foi determinado em aproximadamente 7,35. O pH cai abruptamente para um nível entre 4,2 e 4,7 e então recupera rapidamente (em 4-5 minutos) para um valor mais estável de ~6 após cada adição. Nalguns casos, a recuperação do pH é tão rápida que produz um excesso antes de regressar a um valor estável.

[0067] No Exemplo 17, o nível de pH estável que é conseguido após mistura dos reagentes durante 5 minutos está muito acima do nível fisiologicamente tolerável de 5,0 (o pH da solução salina) para administração oral-gástrica-digestiva.

Exemplo 18

[0068] Foram realizadas medições de espectroscopia Raman da reacção de 6ml de Ácido Ascórbico 1M com 12ml de Nitrito de Sódio 1M. Os reagentes e soluções foram os mesmos dos Exemplos 16 e 17.

[0069] As misturas reactivas e os produtos finais foram determinados usando um espectrómetro Raman dispersivo Nicolet Almega XR, equipado com entradas de macro e microscópio. Os espectros foram excitados com um díodo laser de infravermelho próximo (NIR 785nm) estabilizado externamente. As medições são efectuadas com uma largura de fenda de 25 mm e a resolução espectral é 4 cm⁻¹. Um sistema de software (Omnic, ver. 7.2a) foi usado para visualizar e recolher os dados. As amostras líquidas ou cristalinas a analisar foram colocadas num pequeno tubo de quartzo que encaixa num suporte de amostra e alinhadas com o feixe de laser.

[0070] O ácido foi adicionado à solução de nitrito enquanto a mistura foi agitada a uma velocidade constante de 60 rpm. Uma pequena quantidade (aproximadamente 0,07 ml) da mistura é retirada para análise espectroscópica em intervalos variáveis.

[0071] Os espectros foram colhidos a 10, 30, 60, 90 e 135 minutos a partir do momento em que os reagentes foram misturados, assim como após toda a reacção estar concluída. A Figura 14 mostra o espectro da solução de nitrito de sódio juntamente com o espectro obtido durante a reacção de 6 ml de ácido com 12 ml de solução de nitrito. O vestígio inferior pertence a uma solução apenas de nitrito de sódio.

[0072] A ausência de qualquer pico na região 2250-2050 cm^{-1} indica a ausência de quaisquer compostos perigosos de cianeto iónico (como NaCN), cianato (OCN) ou fulminato (CNO) na mistura. Por exemplo, a vibração de valência (CN) produz uma banda aguda localizada na região 2250-2050 cm^{-1} .

[0073] Medições da forte vibração de valência simétrica a 1325 cm^{-1} , ($V_S(\text{NO}_2)$ de nitrito de sódio), revelam que metade do nitrito é reduzido pelo ácido em menos de 10 minutos. A quantidade de nitrito na mistura foi observada revelando uma redução de mais 8 % durante as 2 horas de observação seguintes. Quando a reacção estava concluída apenas cerca de 31% da quantidade inicial de nitrito restava na mistura.

[0074] Isto demonstra que após uma reacção, uma solução com uma razão de nitrito para ácido em excesso retém nitrito suficiente para permitir outras reacções de geração de NO/NO_x *in vivo* caso o ambiente interno mantenha um pH baixo. Estas reacções irão aumentar a disponibilidade local dos produtos da reacção NO-NO_x e auxiliar na desacidificação local *in vivo* dos tecidos.

[0075] As bandas Raman de uma solução de nitrito acidificada são apresentadas na Tabela 1. A Tabela 2 mostra as áreas de pico de bandas Raman da solução de nitrito acidificada registadas nos tempos indicados.

Tabela 1

| Posição da banda | Atribuição |
|-----------------------|---|
| 1791 cm ⁻¹ | Vas(NO ₂) |
| 1704 cm ⁻¹ | V(HONO) |
| 1590 cm ⁻¹ | Vas(NO ₂) of HONO |
| 1467 cm ⁻¹ | V(N==O), Vs(NO ₂) |
| 1325 cm ⁻¹ | Vs(NO ₂) de NaNO ₂ |
| 1041 cm ⁻¹ | V(NO) de NO ₃ - de HNO ₃ ou |
| 827 cm ⁻¹ | NaNO ₃ d(ONO), Vas(NO ₃) |
| 600 cm ⁻¹ | in-plane bending of HONO |

Tabela 2

| Posição da banda | Área de pico | | | | | |
|-----------------------|--------------|--------|--------|-------|---------|-------------|
| | 10 min | 30 min | 60 min | 90min | 135 min | Prod. final |
| 1791 cm ⁻¹ | 1378 | 1159 | 766 | 606 | 374 | - |
| 1704 cm ⁻¹ | 903 | 828 | 449 | - | 495 | 256 |
| 1590 cm ⁻¹ | 5839 | 5416 | 4525 | 4739 | 4264 | 3934 |
| 1467 cm ⁻¹ | 934 | 855 | 720 | 632 | 659 | - |
| 1325 cm ⁻¹ | 6359 | 6161 | 5860 | 5944 | 5655 | 3967 |
| 1041 cm ⁻¹ | 2501 | 2109 | 2084 | 2122 | 2202 | 2113 |
| 827 cm ⁻¹ | 7693 | 7302 | 6628 | 6647 | 6170 | 4387 |
| 600 cm ⁻¹ | 2041 | 1842 | 1479 | 1334 | 923 | 921 |

[0076] Após mais de 2 horas de observação ainda havia uma quantidade considerável de bolhas de gás a sair da mistura. A agitação foi parada e a mistura foi mantida de um dia para o outro. Após 24 horas, já não se observavam bolhas de gás e os espectros Raman da solução restante (produto final) revelaram que a concentração de nitrito se tinha reduzido a dois terços da sua concentração aos 10 minutos (ou um terço da sua concentração inicial antes da reacção).

Exemplo 19

[0077] Um simples ensaio de viabilidade foi usado para determinar se uma estirpe laboratorial de *M. tuberculosis* era susceptível a morte mediada por NO/NOx.

[0078] *M. tuberculosis* foi cultivado em 10 ml de meio padronizado (Middlebrook 7H9, 0,05% de Tween 80, 10% v/v de suplemento OADC). Para a exposição a NO/NOx, 1 ml de cultura foi inoculado em 10 ml da solução Middlebrook mais 0,1 ml de uma mistura de NaNO₂ 0,5M e ácido ascórbico 0,25M. Foi preparado um controlo sem a solução nitrito/ácido ascórbico.

[0079] As culturas foram incubadas a 37°C, repousando durante 24 horas. Diluições em série foram colocadas numa placa de meio sólido (Middle-brook 7H10, 10 % v/v de OADC) e as UFCs foram registadas após 3 semanas.

[0080] O pH do meio não foi significativamente reduzido pela adição da solução de nitrito/ácido ascórbico.

[0081] As contagens das unidades formadoras de colónias (UFC) a partir da cultura de controlo foram $1,5 \times 10^7$ por ml. Não havia bactérias viáveis nas culturas tratadas com NO na menor diluição em placa (limite de detecção 10 UFC/ml).

[0082] A solução de nitrito/ácido ascórbico geradora de NO foi eficaz na morte >6 logs de *M. tuberculosis* em 24 horas.

Exemplo 20

[0083] Um ensaio foi usado para determinar a susceptibilidade de uma série de bactérias diferentes à morte mediada por NO/NOx.

[0084] As experiências foram realizadas em placas de 96 micropoços. Um determinado número de micropoços foi enchido com 60 ml de nitrito de sódio para produzir concentrações finais de 0, 0,2, 0,5, 1, 2, 10, 15 e 30mM. Foram igualmente adicionados 60 ml de suspensão bacteriana (densidade de 2×10^7 unidades formadoras de colónias por ml) e 120 ml de meio líquido de Infusão de Coração-Cérebro (Oxoid, Basingstoke, UK) acidificados com ácido clorídrico para produzir valores de pH final de 2,0, 3,0, 4,0, 4,5, 5,0, 6,0 e 7,0.

[0085] As placas foram seladas e incubadas de um dia para o outro a 37°C. O efeito inibitório do nitrito acidificado no crescimento bacteriano foi determinado pela medição da densidade óptica (540 nm) dos poços usando um leitor de placas de micropoços (Anthos ht III,

Salzburg, Áustria).

[0086] Todas as experiências foram realizadas em triplicado.

[0087] Para determinar a actividade bactericida após exposição a nitrito acidificado, 60 ml da suspensão bacteriana foram transferidos para 180 ml de meio de recuperação (meio líquido de Infusão de Coração-Cérebro; pH 7,0). A avaliação de crescimento microbiano foi determinada com o leitor de placas de micropoços para medir a densidade óptica como acima.

[0088] O efeito desta mistura foi testado em microrganismos previamente isolados de doentes. Os resultados estão apresentados na Figura 15a-n.

[0089] Pode ser observado que a solução de nitrito acidificado tem um efeito bacteriostático, assim como bactericida em vários isolados bacterianos.

[0090] A solução pode ser usada para tratamento de várias condições clínicas, é activa contra microrganismos resistentes a antibióticos, não encoraja o surgimento de estirpes resistentes e é eficaz numa ampla gama de pH.

Lisboa,

REIVINDICAÇÕES

1. Uma formulação líquida compreendendo uma quantidade clinicamente eficaz de óxidos de nitrogénio dissolvida e/ou dispersa para uso na prevenção de pneumonia associada a ventilação mecânica, em que a formulação líquida contém de 10 a 40.000 partes por bilião dos óxidos de nitrogénio.
2. A formulação para uso conforme reivindicado na Reivindicação 1, em que a formulação líquida contém de 100 a 10.000 partes por bilião dos óxidos de nitrogénio.
3. A formulação para uso conforme reivindicado em qualquer uma das reivindicações anteriores, em que a formulação líquida é uma formulação aquosa.
4. A formulação para uso como reivindicado em qualquer uma das reivindicações anteriores, em que a formulação líquida compreende o produto da reacção de pelo menos um nitrito de metal alcalino e/ou nitrito de metal alcalino-terroso com pelo menos um ácido.
5. A formulação para uso como reivindicado na reivindicação 4, em que a formulação líquida compreende o produto da reacção de pelo menos um nitrito de metal alcalino com ácido ascórbico.
6. A formulação para uso conforme reivindicado em qualquer uma das reivindicações anteriores, em que a formulação líquida compreende adicionalmente pelo menos um nutriente.

7. Uma composição líquida de alimentação artificial entérica para prevenção da pneumonia associada a ventilação mecânica, a composição compreendendo uma quantidade clinicamente eficaz de óxidos de nitrogénio dissolvidos e/ou dispersos e pelo menos um nutriente.

8. A composição conforme reivindicado na Reivindicação 7, em que a composição contém de 10 a 40.000 partes por bilião de óxidos de nitrogénio.

9. A composição conforme reivindicado na Reivindicação 8, em que a formulação líquida contém de 10 a 10.000 partes por bilião de óxidos de nitrogénio.

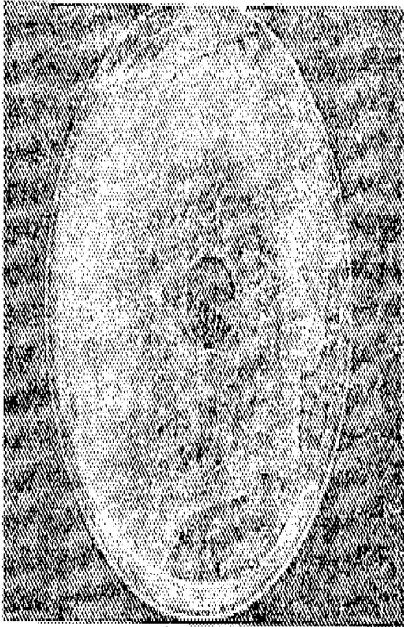
10. A composição como reivindicado em qualquer uma Reivindicações 7 a 9, em que a composição é uma composição aquosa.

11. A composição como reivindicado em qualquer uma das reivindicações 7 a 10, em que a composição compreende o produto da reacção de pelo menos um nitrito de metal alcalino e/ou pelo menos um nitrito de metal alcalino-terroso com pelo menos um ácido.

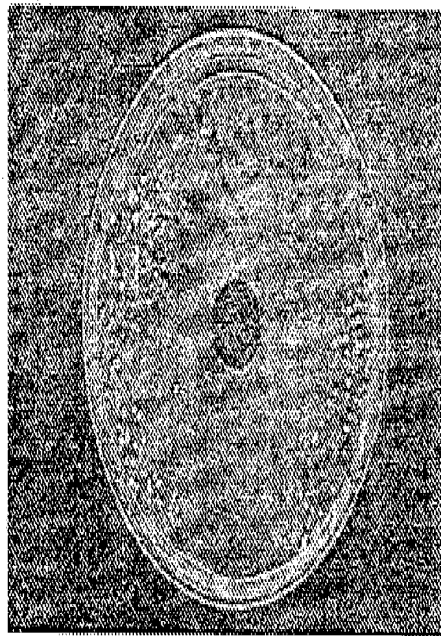
12. A composição para uso como reivindicado na reivindicação 11, em que a composição compreende o produto da reacção de pelo menos um nitrito de metal alcalino com ácido ascórbico.

Lisboa,

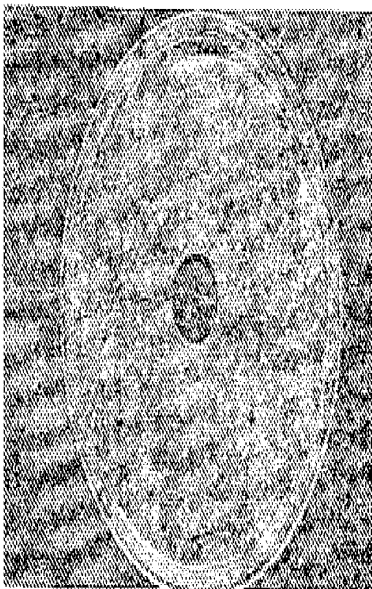
Figura 1



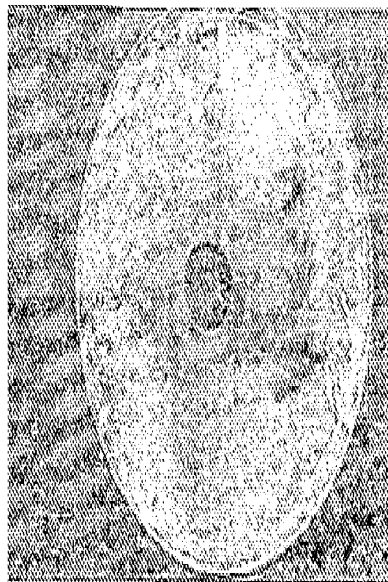
A



B

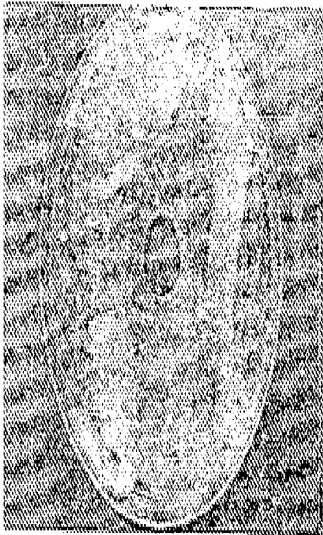


C



D

Figura 2



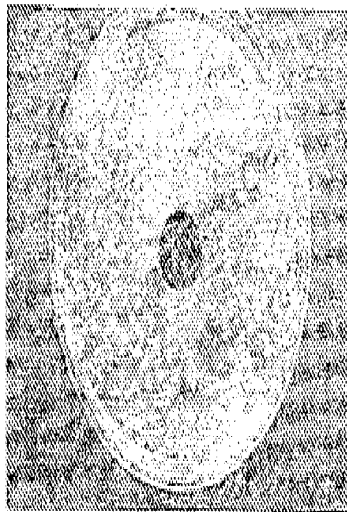
A



B



C



D

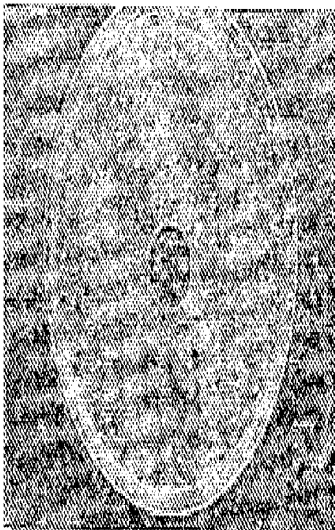
Figura 3



A



B

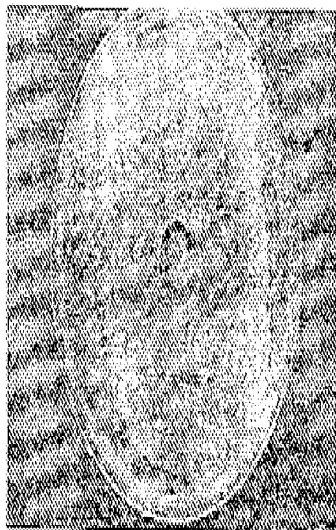


C

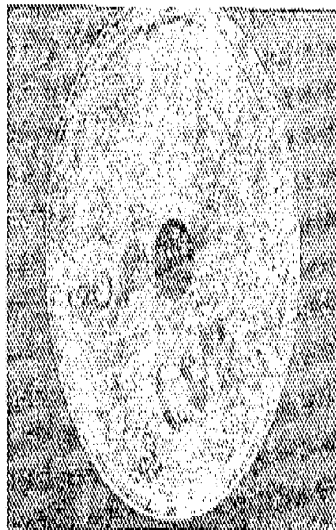


D

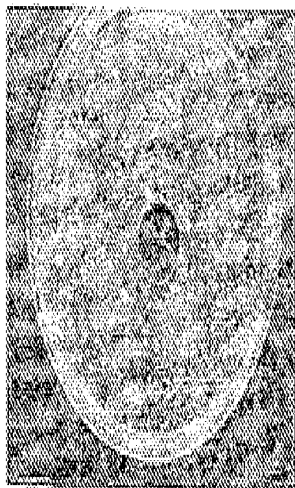
Figura 4



A



B



C



D

Figura 5

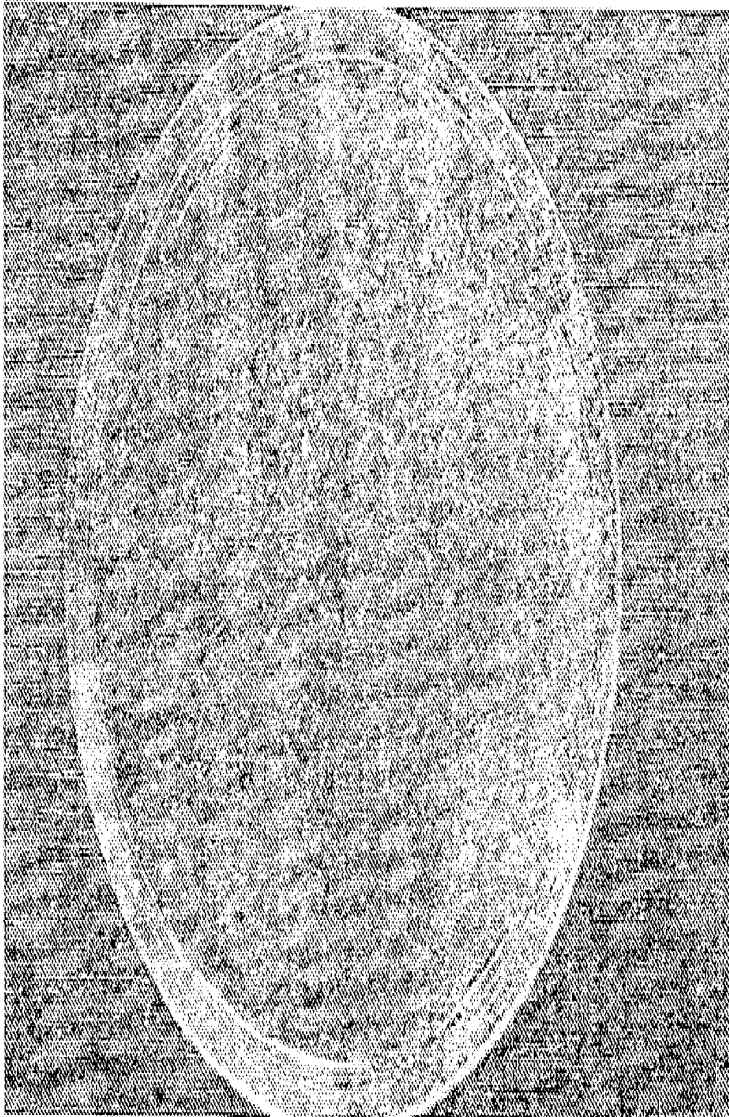


Figura 6

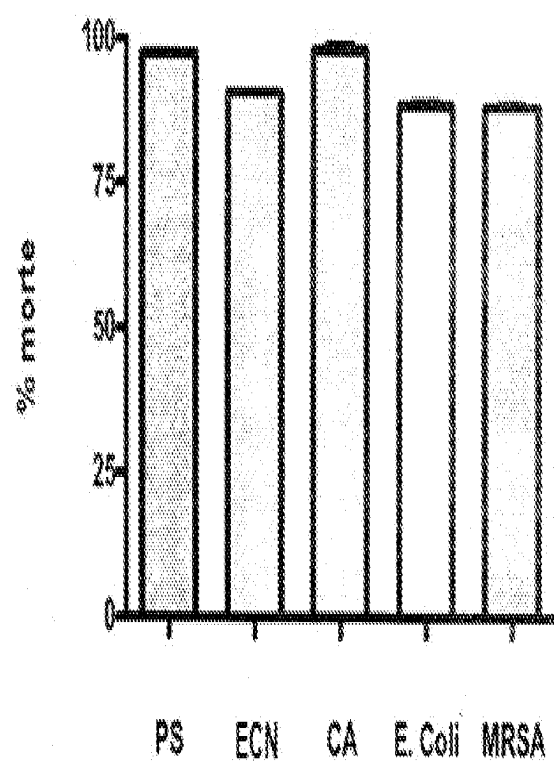


Figura 7

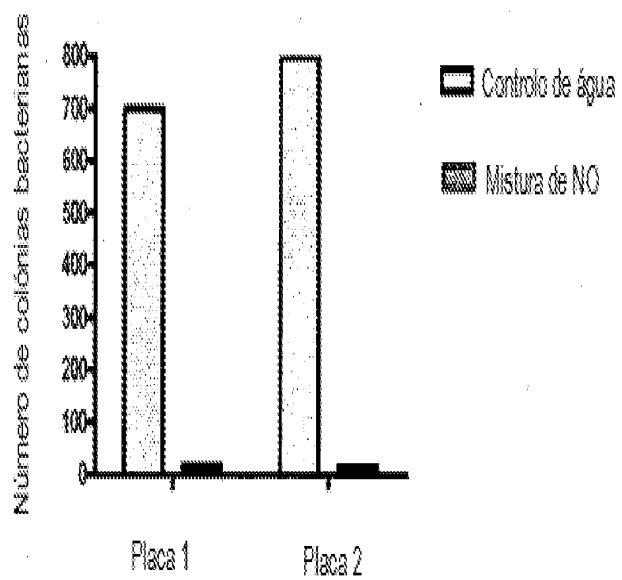


Figura 8

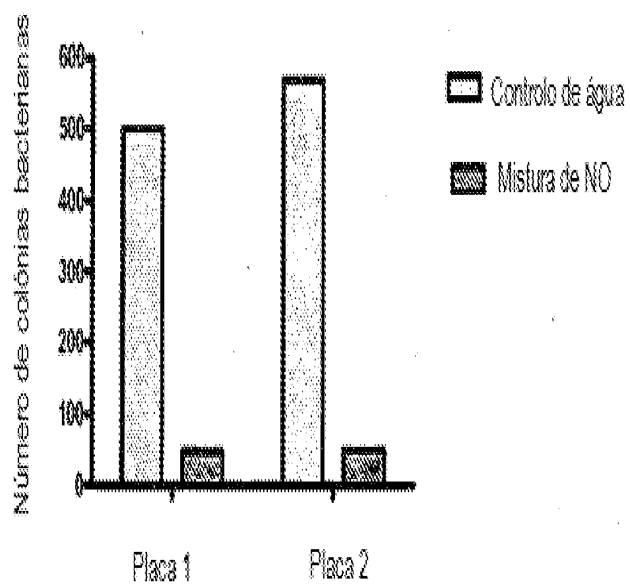


Figura 9

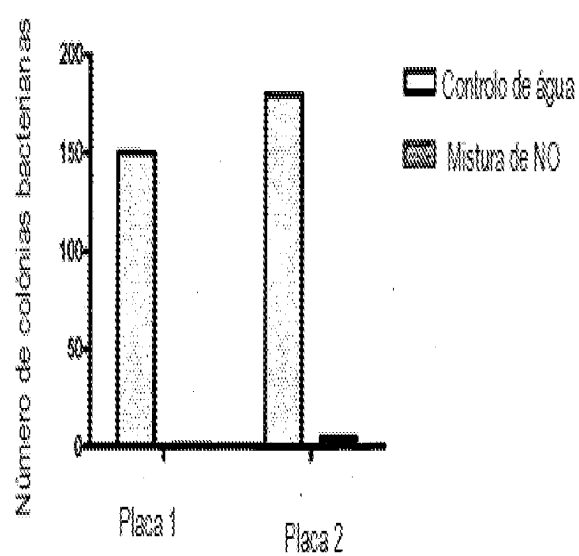


Figura 10

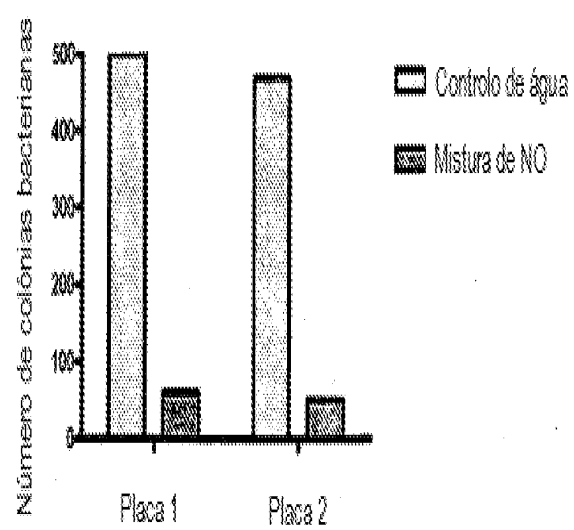


Figura 11

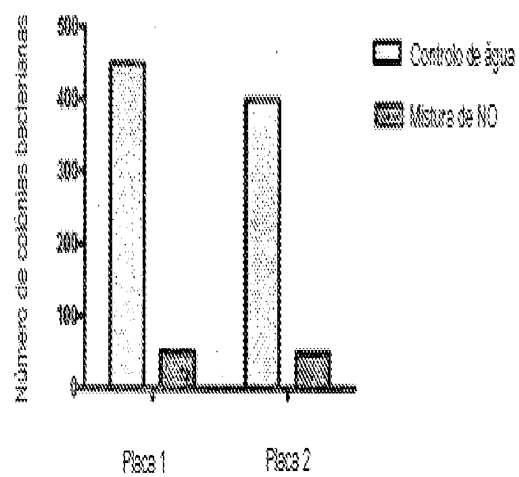


Figura 12

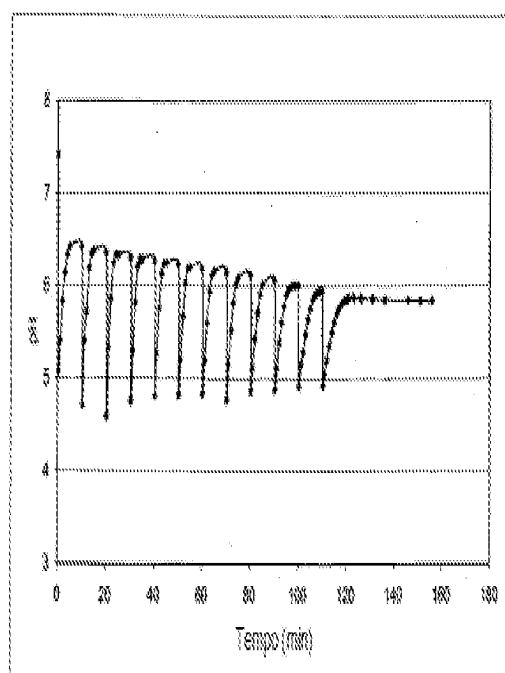


Figura 13

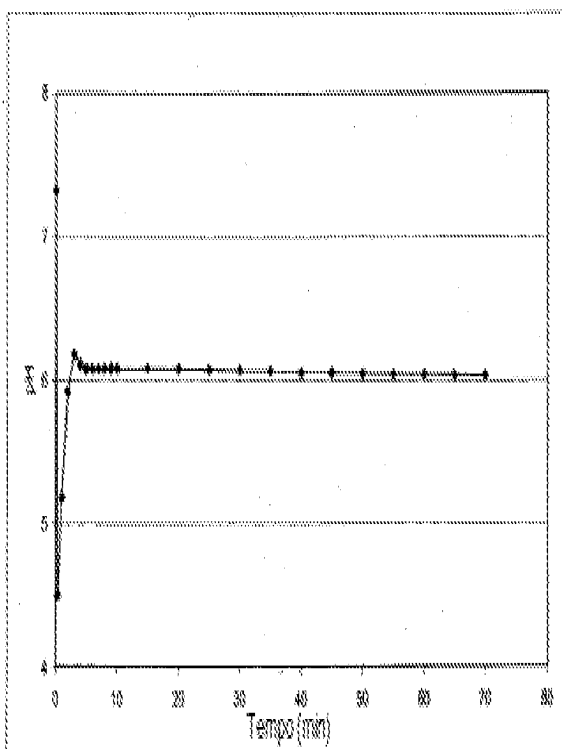


Figura 14

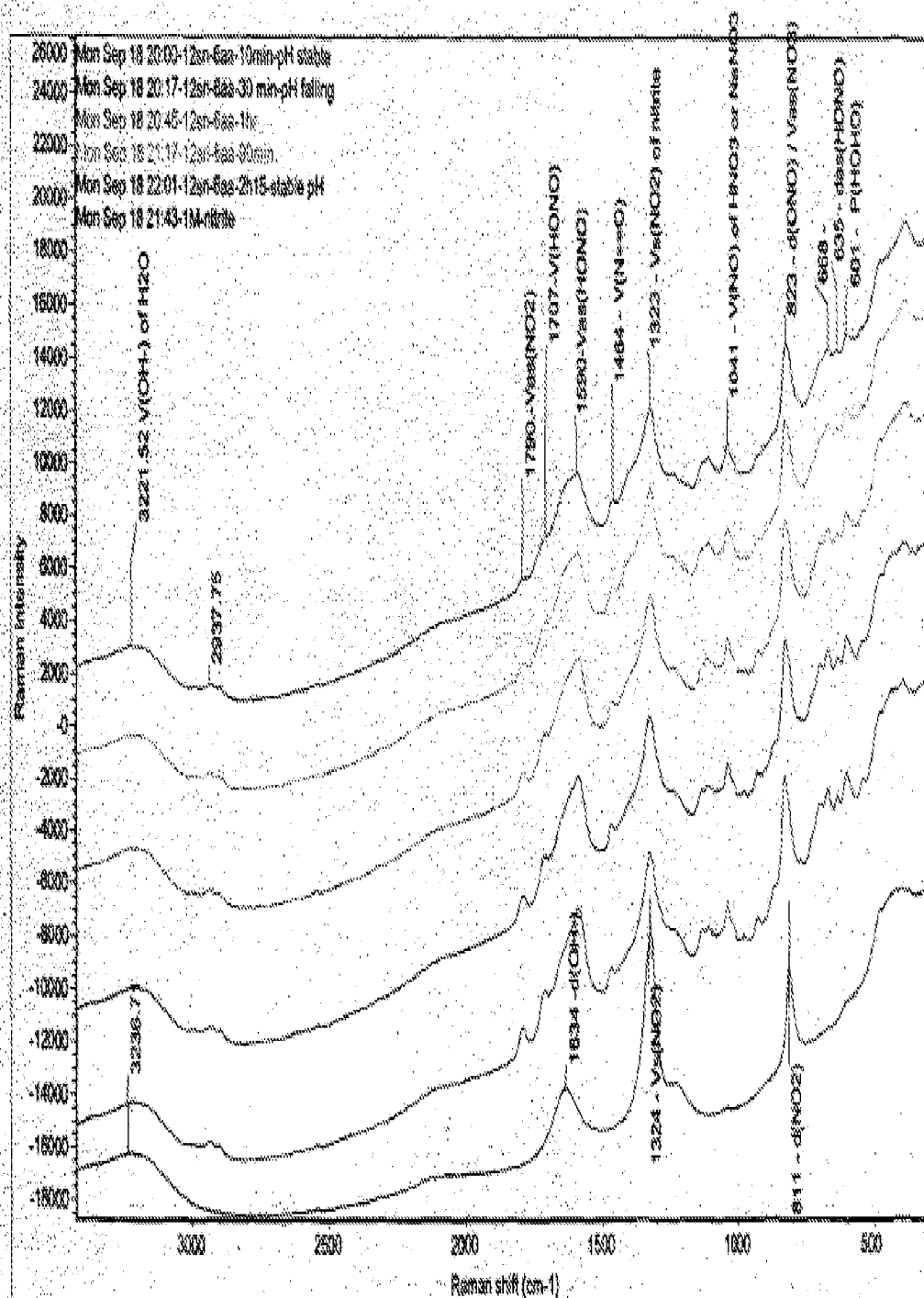


Figura 15A

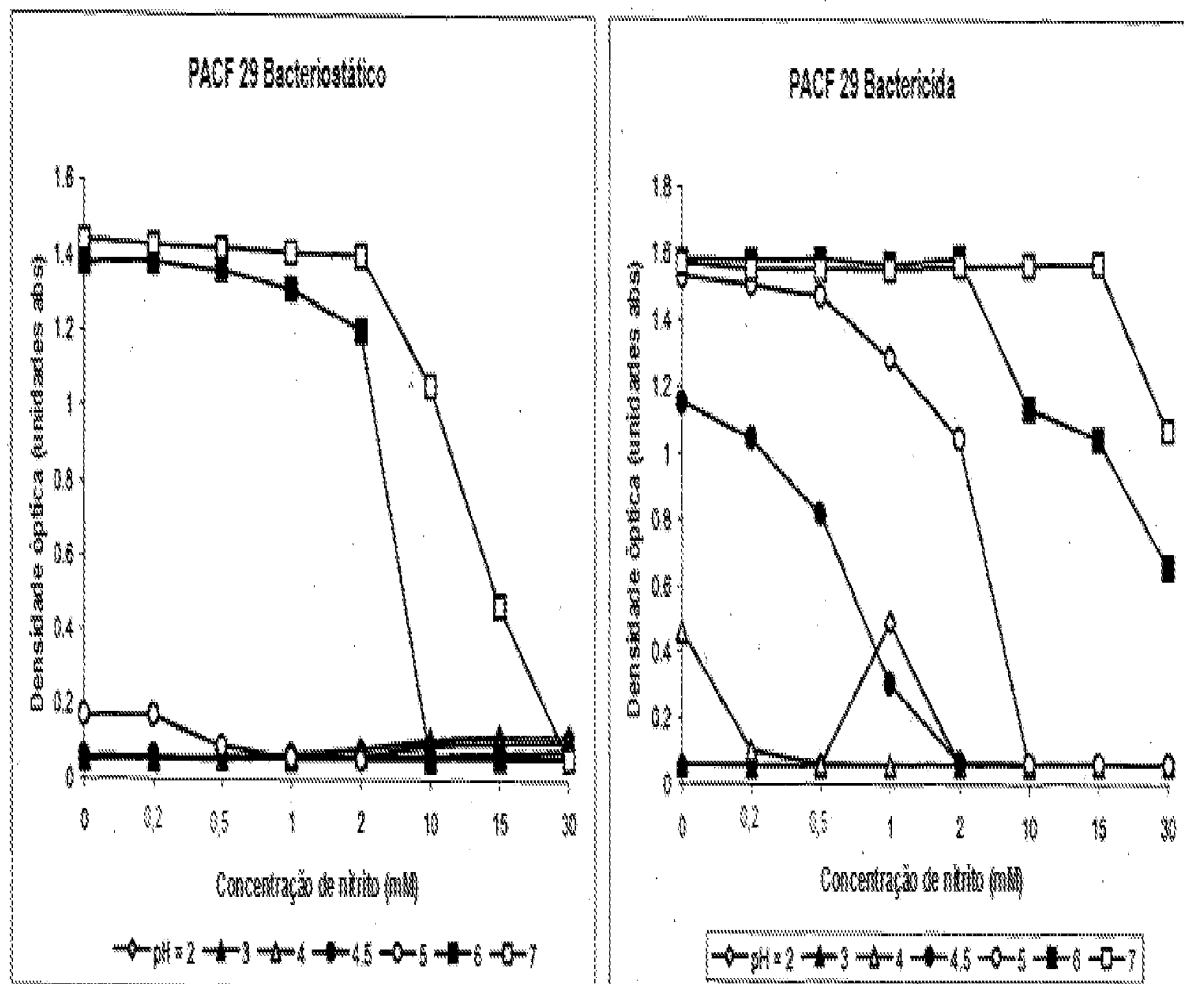


Figura 15B

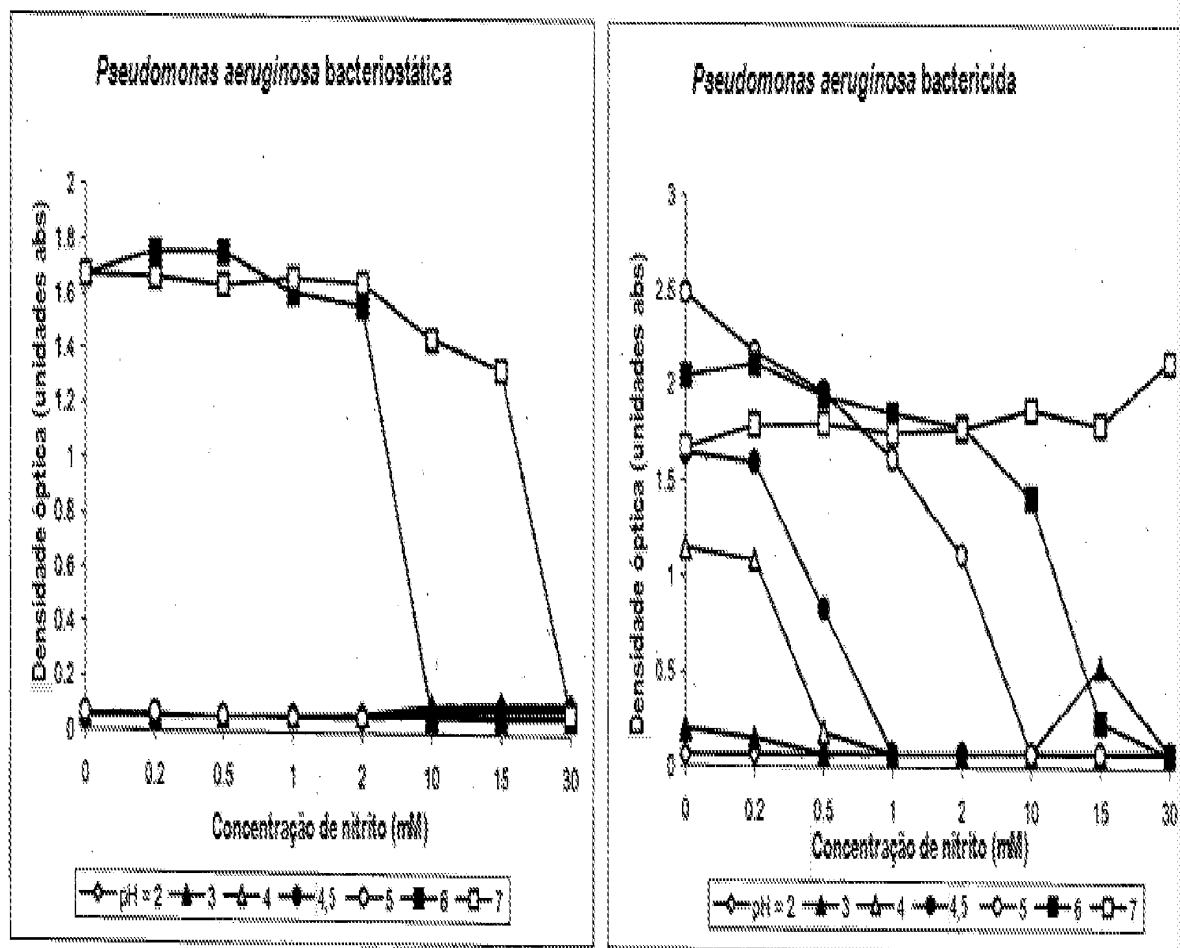


Figura 15C

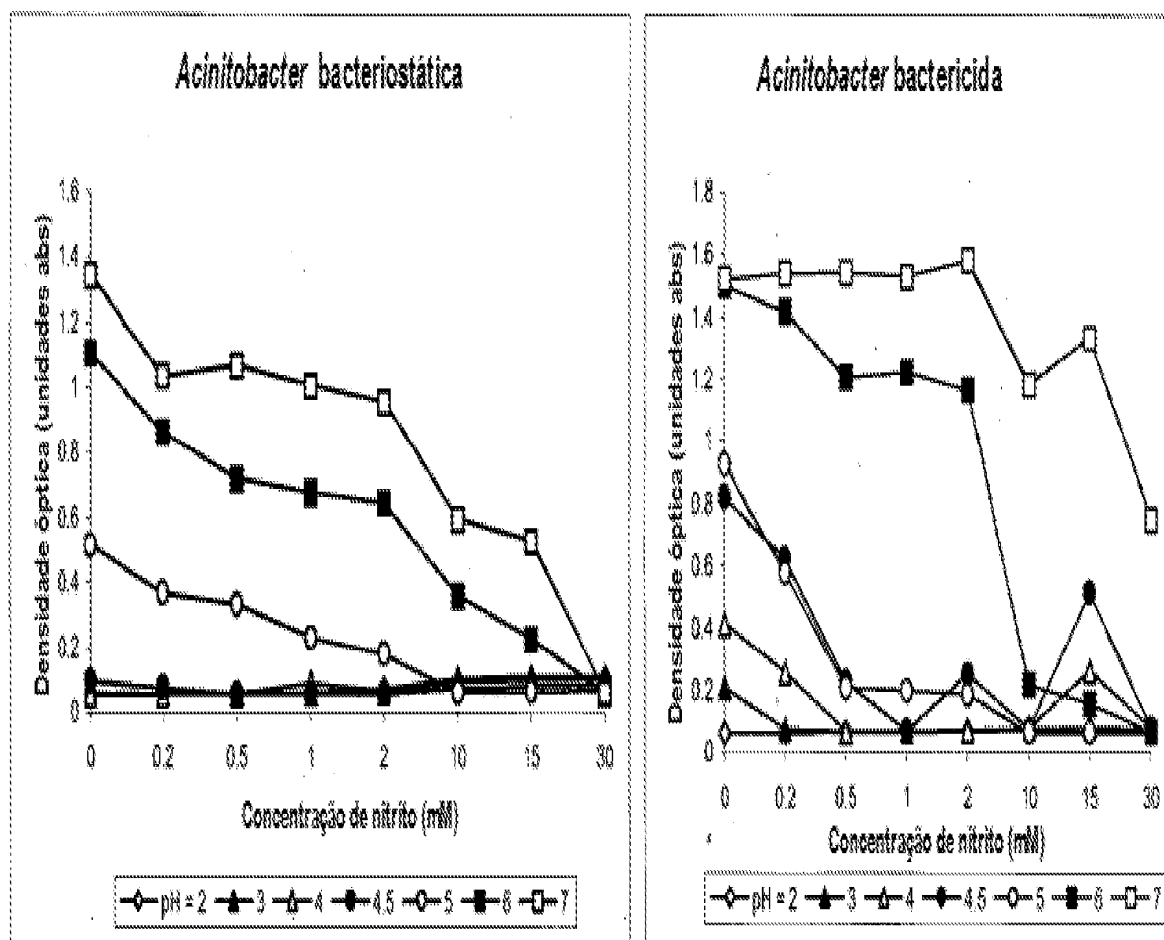


Figura 15D

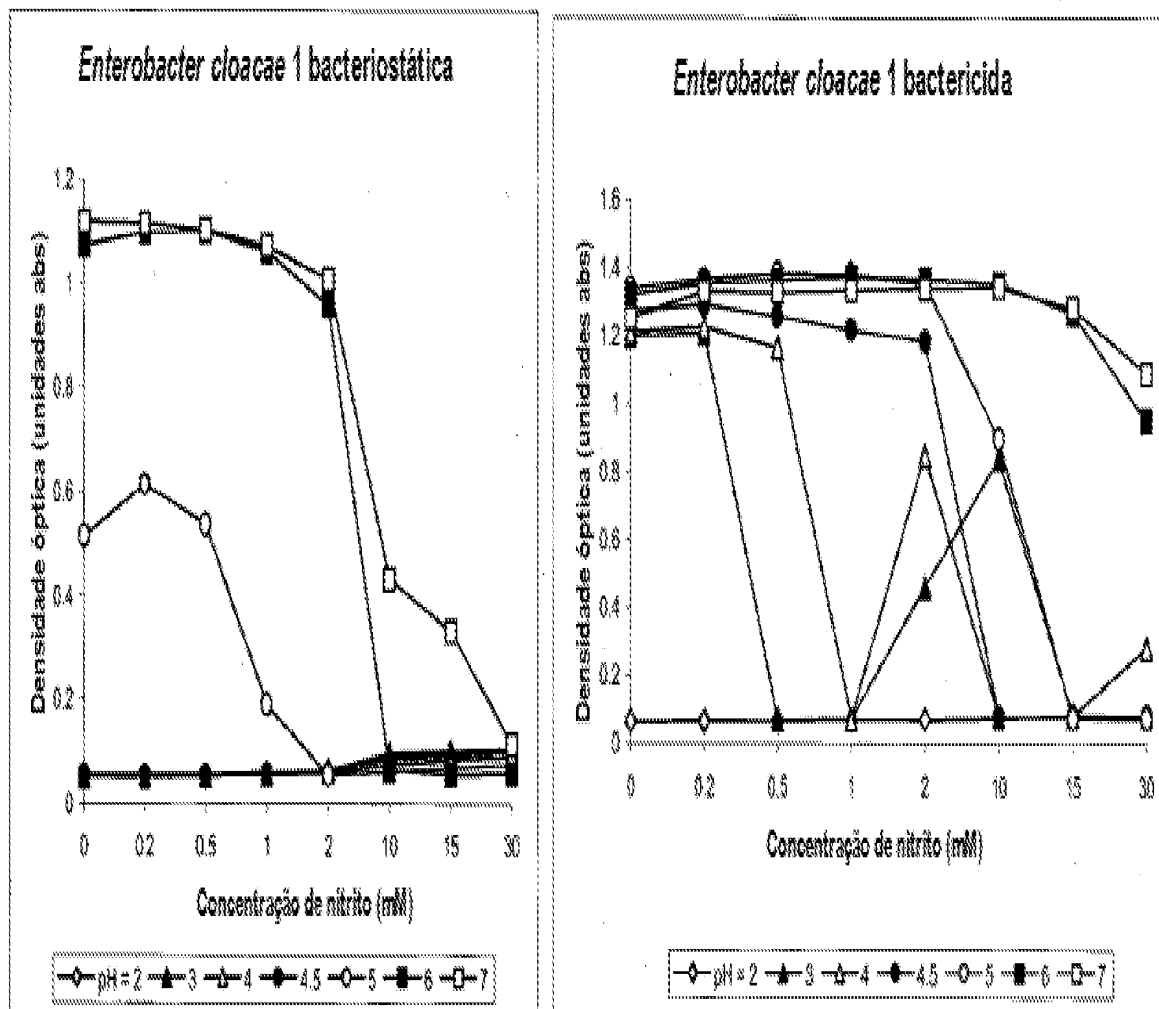


Figura 15E

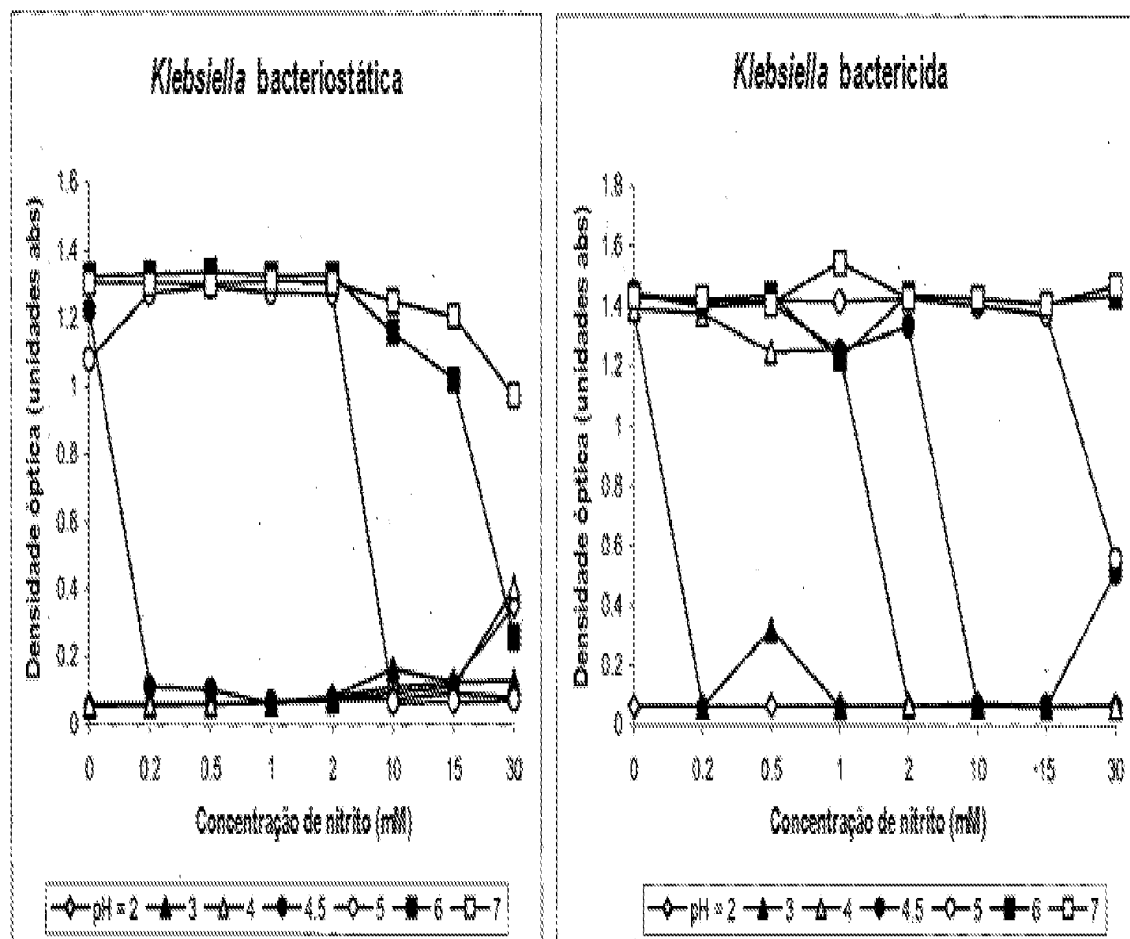


Figura 15F

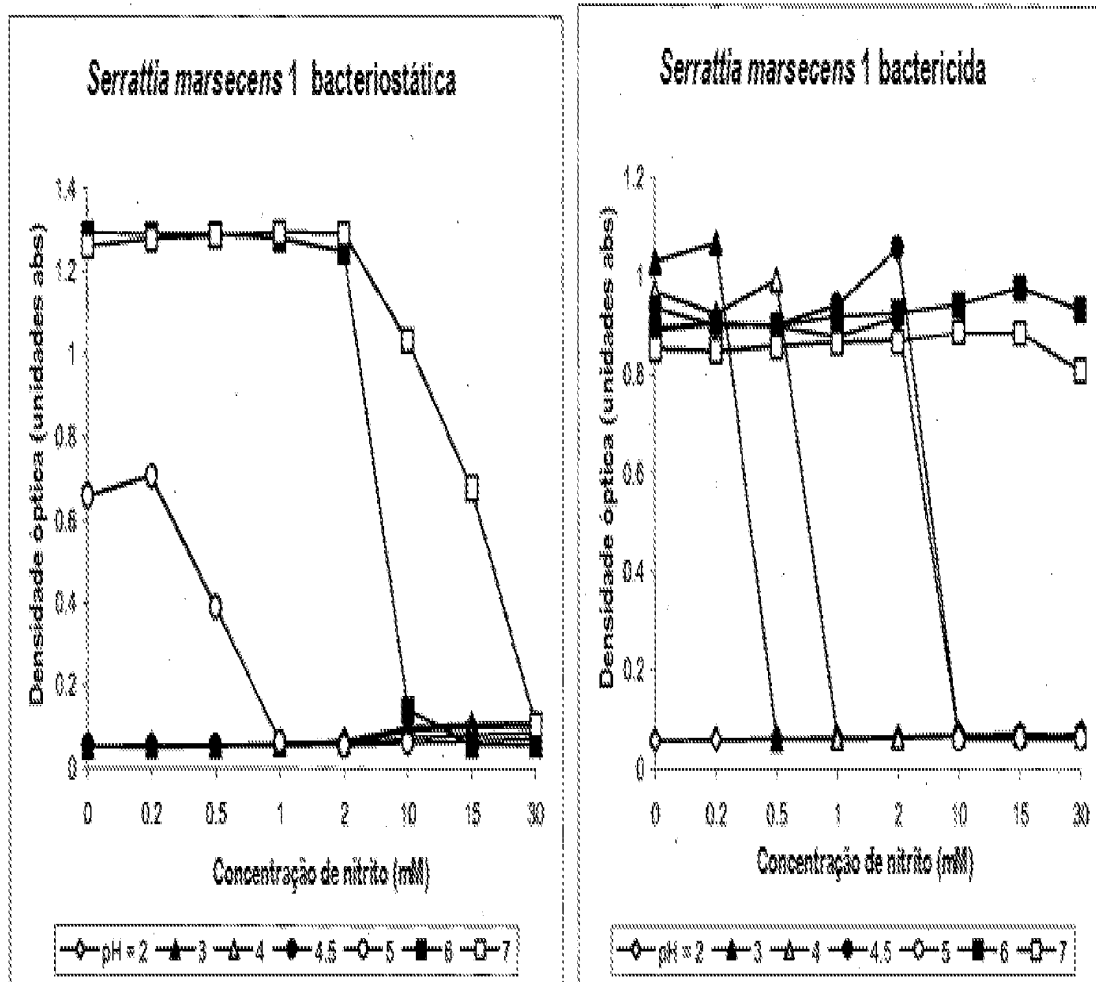


Figura 15G

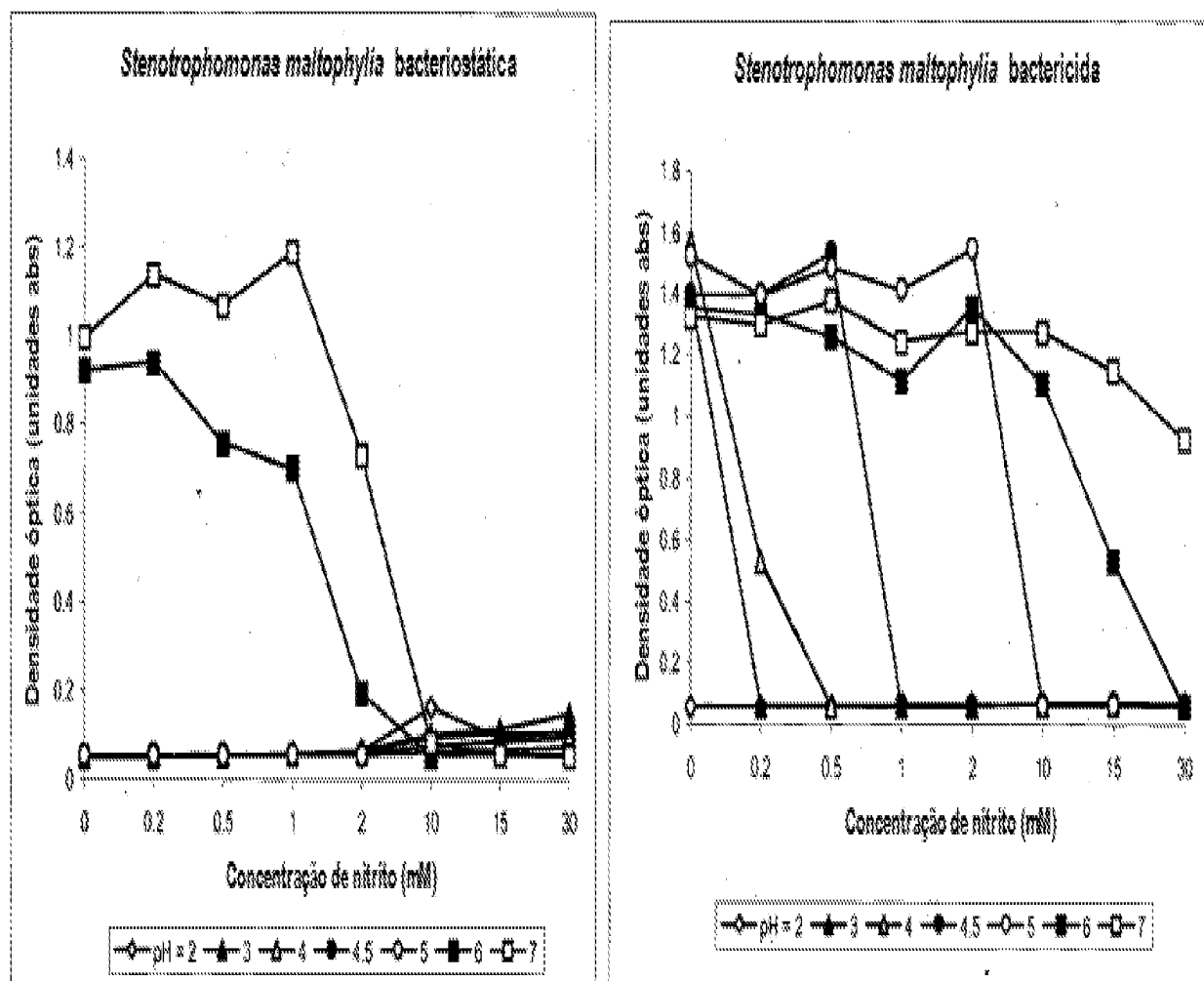


Figura 15H

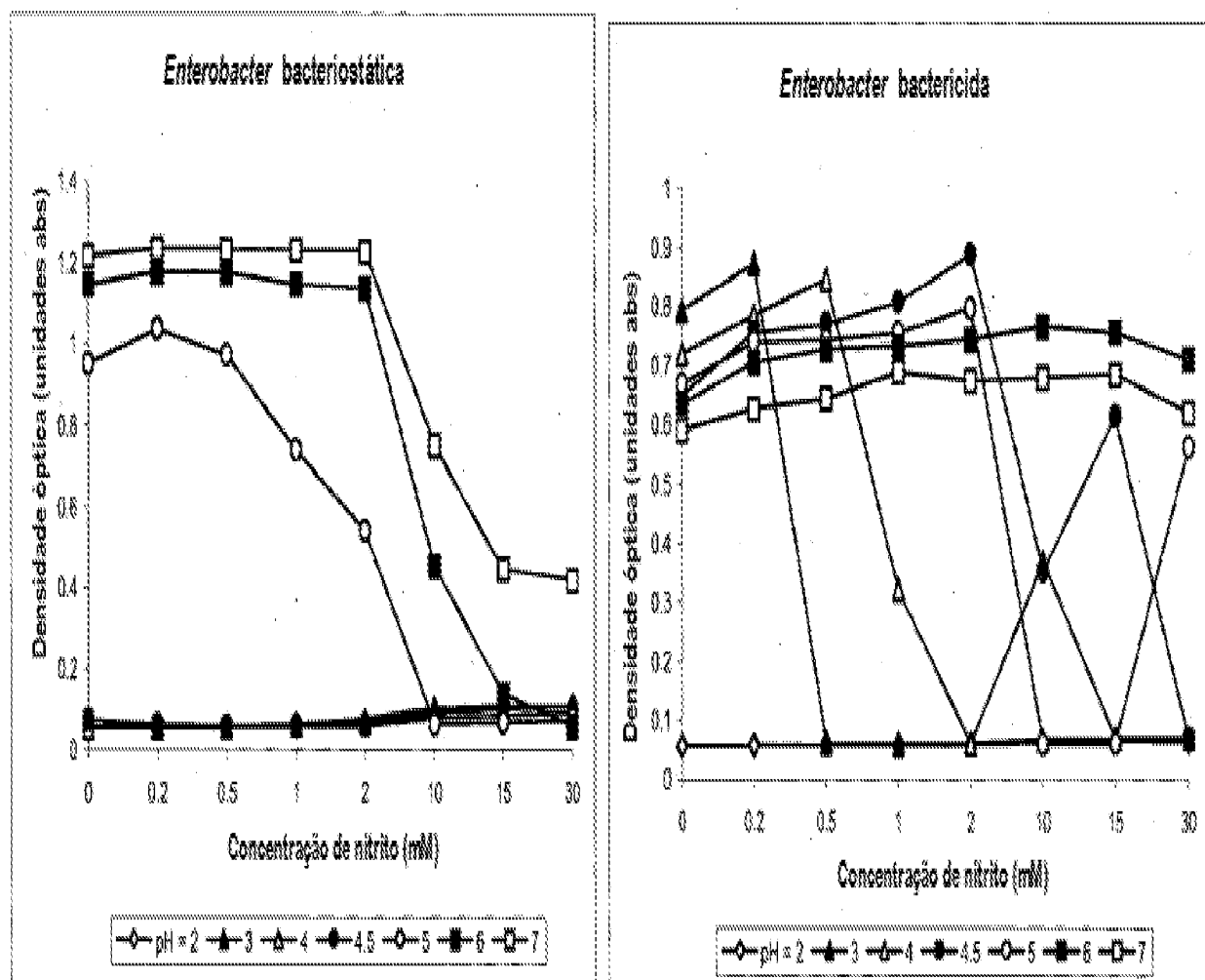


Figura 151

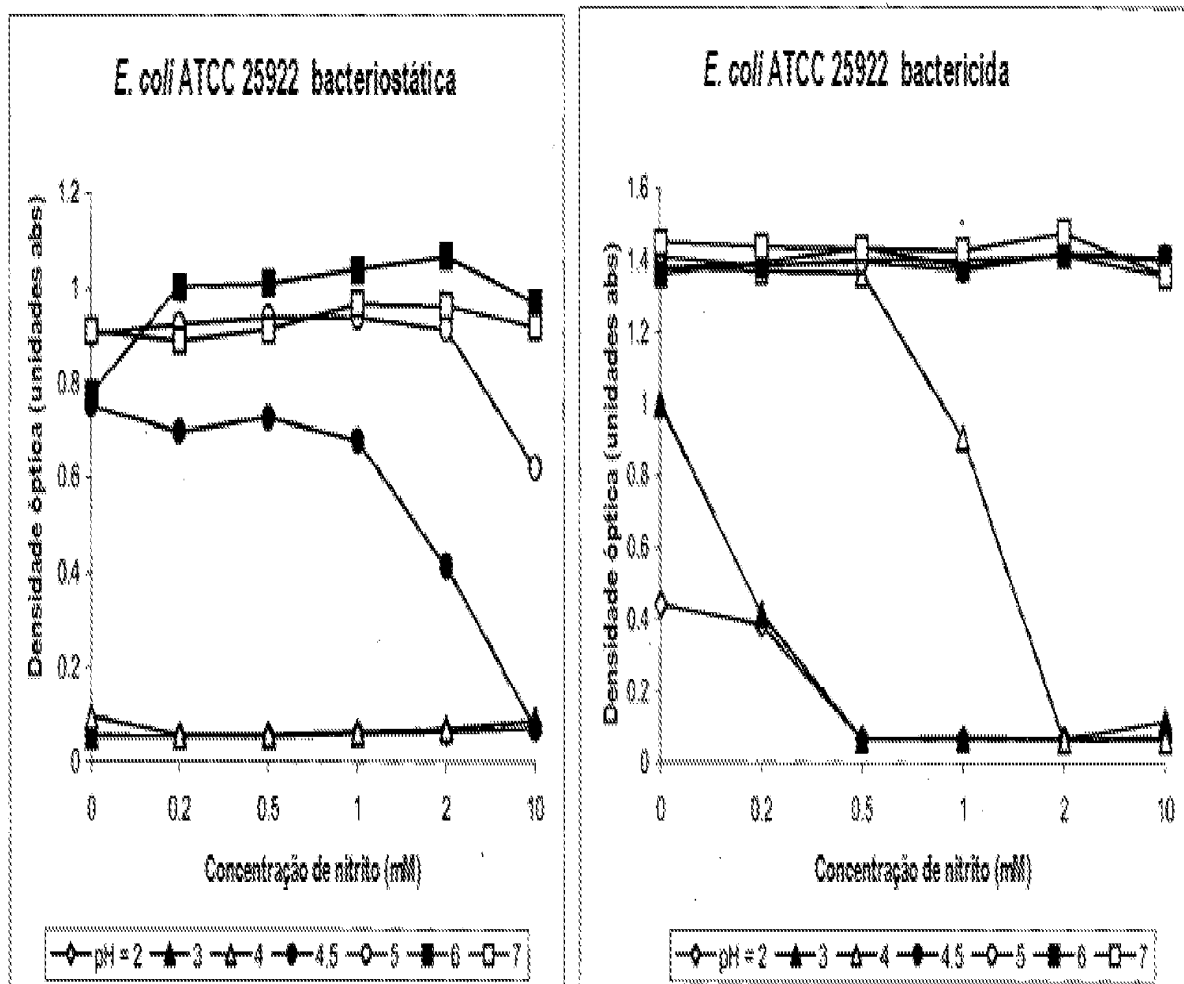


Figura 15 J

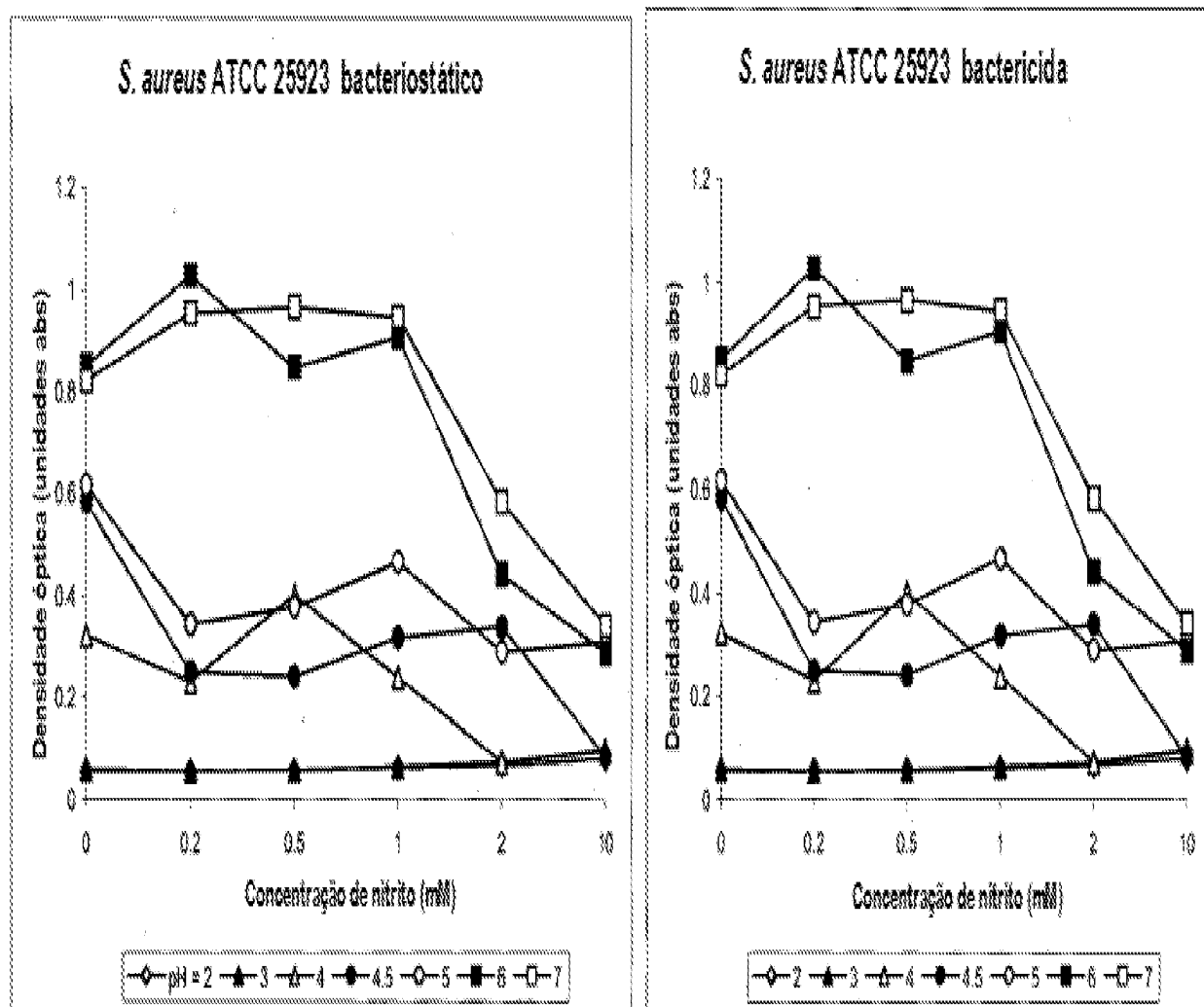


Figura 15 K

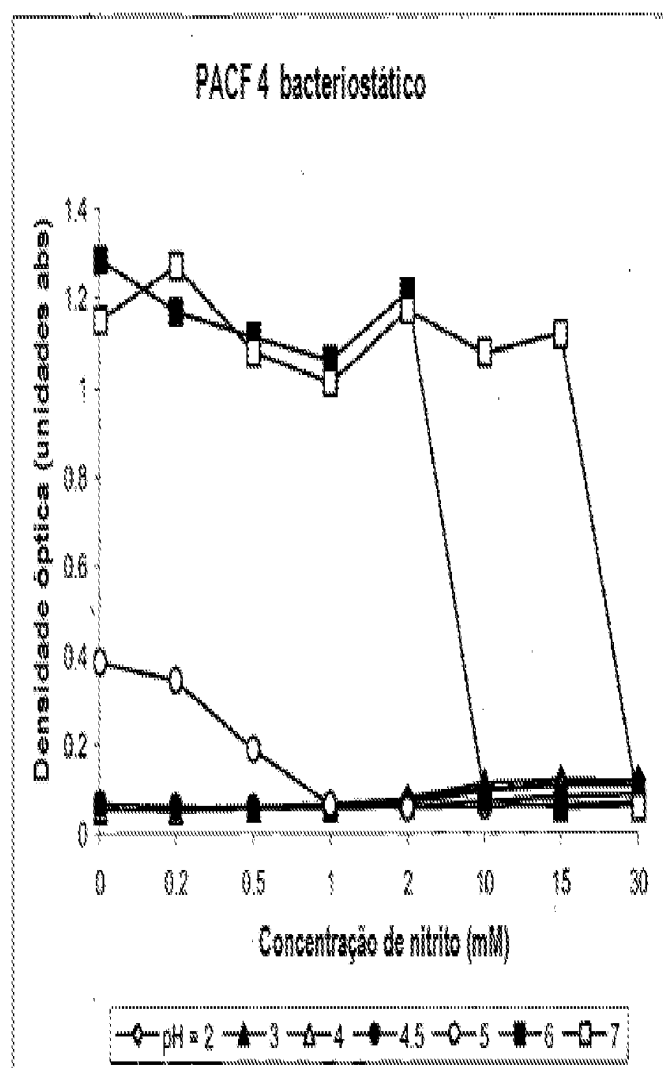


Figura 15 L

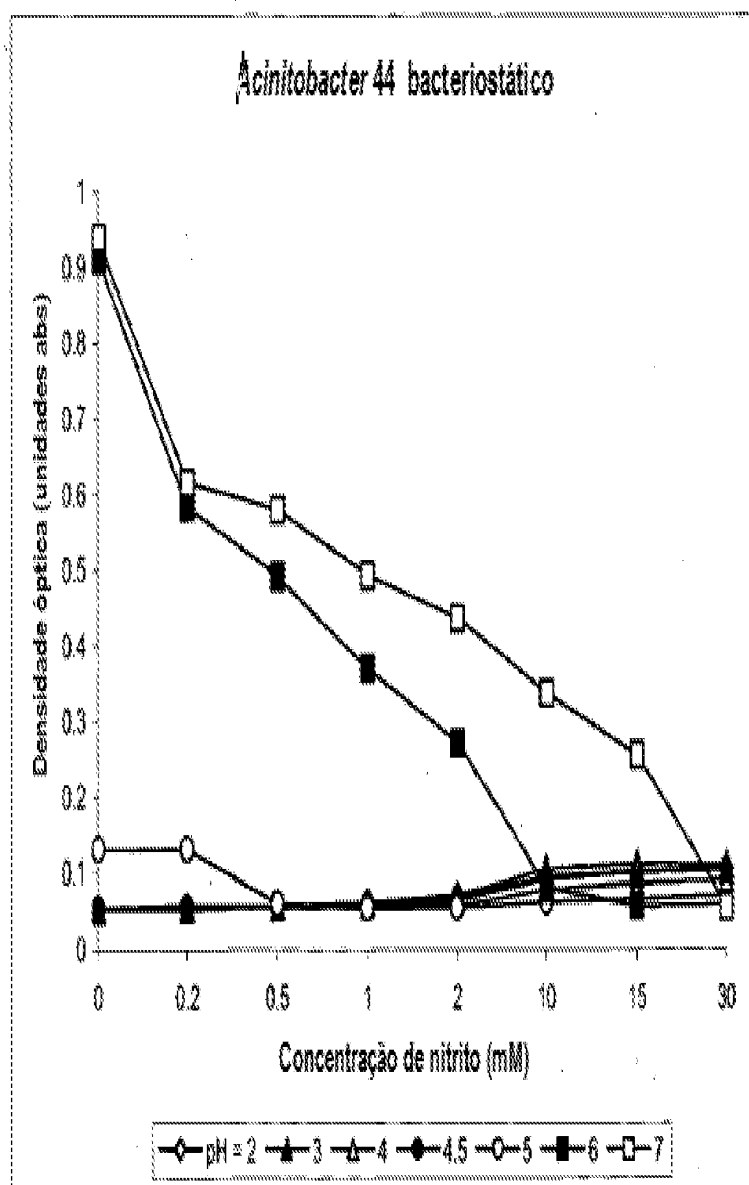


Figura 15 M

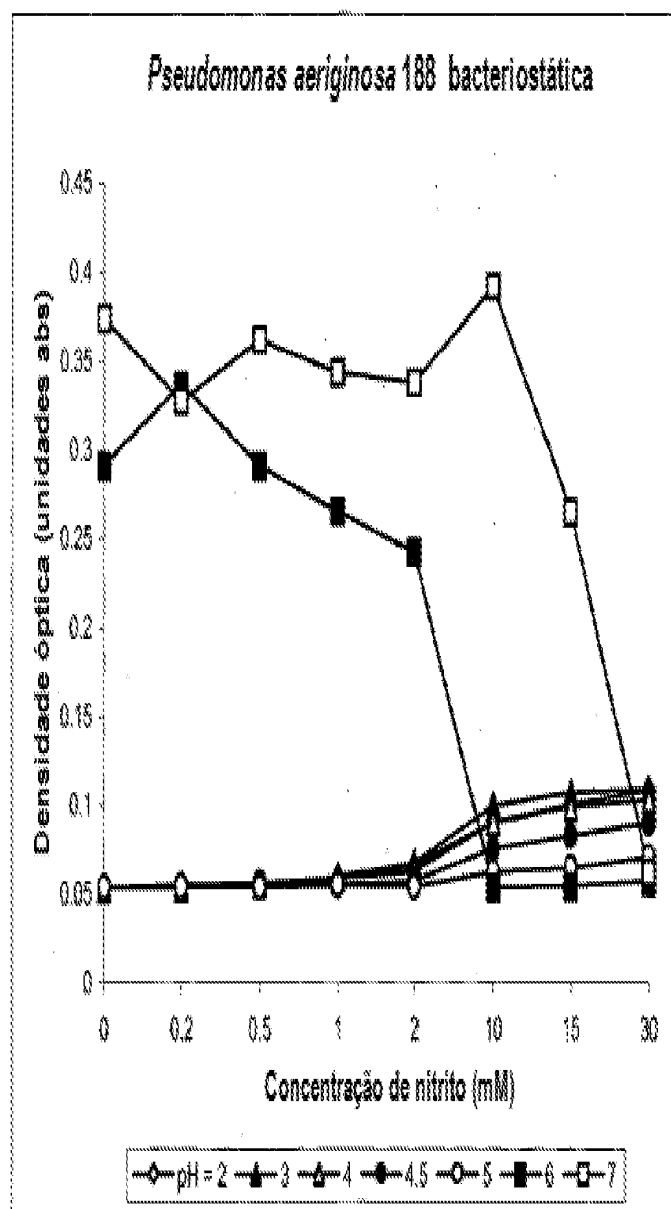


Figura 15 N

