

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 861 263**

51 Int. Cl.:

A61K 9/72 (2006.01)

A61M 35/00 (2006.01)

C01B 21/24 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.03.2015 PCT/US2015/019632**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.09.2015 WO15138406**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.03.2015 E 15761353 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.12.2020 EP 3116484**

54 Título: **Tratamiento de enfermedades con soluciones de liberación de óxido nítrico**

30 Prioridad:

14.03.2014 US 201461953053 P

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

06.10.2021

73 Titular/es:

**SANOTIZE RESEARCH AND DEVELOPMENT
CORP. (100.0%)
25th Floor, 700 West Georgia
Vancouver, British Columbia V7Y-1B3, CA**

72 Inventor/es:

**STENZLER, ALEX;
MILLER, CHRISTOPHER C. y
REGEV-SHOSHANI, GILLY**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 861 263 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

Tratamiento de enfermedades con soluciones de liberación de óxido nítrico

5 Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

Esta solicitud tiene derecho a prioridad en virtud del 35 U.S.C. § 119 (e) de la Solicitud de Patente Provisional de los Estados Unidos No. 61/953,053, presentada el 14 de marzo de 2014.

10 Antecedentes de la invención

Se ha demostrado que el NO endógeno cumple una función crítica en diversas funciones corporales, incluida la vasodilatación del músculo liso, la neurotransmisión, la regulación de la cicatrización de heridas y las respuestas inmunes a infecciones como la acción bactericida dirigida hacia diversos organismos (Moncada et al., 1991, Pharmacol Rev, 43: 109-42; De Groote et al., 1995, Clin Infect Dis, 21 (supl. 2): S162-164).

El NO es un radical libre que es lipofílico con un pequeño radio de stokes que lo convierte en una excelente molécula de señal que le permite atravesar fácilmente la membrana plasmática hacia el citosol y, por lo tanto, se considera que es adecuado para el tratamiento de una variedad de indicaciones. Por ejemplo, se ha demostrado que el NO cumple una función importante en la cicatrización de heridas mediante vasodilatación, angiogénesis, acción antiinflamatoria y antimicrobiana (Witte et al., 2002, Amer J of Surg, 183: 406-12). Se plantea la hipótesis de que las propiedades reguladoras antimicrobianas y de mensajero celular de esta molécula, administrada en forma gaseosa exógena, podrían ingresar fácilmente al medio de la herida y ser útiles para optimizar la cicatrización de heridas crónicas con acciones específicas dirigidas a reducir la carga bacteriana, reducir el exudado y mejorar el desbridamiento endógeno.

Además, el potencial terapéutico de los donantes de NO para las lesiones cutáneas, como antimicrobiano de amplio espectro, parece prometedor (Fang, 1997, Amer Soc Clin Invest, 33: 2818-25; Vazquez-Torres et al., 1999, Nitric Oxide and Infection, 475-88). Sin embargo, hasta la fecha, este enfoque no se ha realizado en aplicaciones comerciales clínicas. Esto puede deberse a los efectos secundarios tóxicos de los compuestos portadores de donantes de NO sólidos, líquidos, en crema u otros no gaseosos y, específicamente, al ambiente ácido requerido para la liberación de la molécula de NO (Omerod et al., 1999, J Invest Dermatol, 113: 392-7; Bauer et al., 1998, Wound Repair Regen, 6: 569-77). Es posible que tampoco se haya demostrado una eficacia adecuada debido a la unión del óxido nítrico con otros compuestos en las preparaciones. Los enfoques endógenos, como la estimulación intracelular de óxido nítrico sintasa (NOS) y los apósitos para heridas exógenas con donantes de NO o soluciones saturadas que contienen NO tampoco han logrado liberar concentraciones constantes de NO en estado estable (Shabini et al., 1996, Wound Repair Regen, 4: 353-63). Se ha utilizado la exposición directa al gas de óxido nítrico (Stenzler, Patentes de EE. UU. Nos. 66432077, 7892198, 7520866 y Miller, et al., 2004, J Cuutical Med Surg 233-238) para tratar infecciones de heridas y, si bien es eficaz, requiere que el paciente debe estar conectado a un cilindro de gas durante 8 horas seguidas para el tratamiento. Como tales, estos métodos no son adecuados o efectivos en situaciones en las que solo se dispone de un tiempo muy corto para la administración de la molécula.

El documento WO2009/086470 se refiere a una composición de formulación de compuesto de nitrito farmacéuticamente aceptable para administración pulmonar, el documento WO03/013489 se refiere a una composición generadora de óxido de nitrógeno para su uso en el tratamiento de infecciones subungueales, y el documento WO03/020211, por ejemplo, describe un método para administrar óxido nítrico a un mamífero que comprende generar de forma no electrolítica un gas terapéutico que incluye óxido nítrico a partir de un precursor de óxido nítrico y transportar el gas terapéutico a un mamífero.

Weller y colegas describen un sistema que usa nitrito inorgánico y un ácido orgánico para producir NO en la superficie de la piel (Weller et al., 1998, J Am Acad Dermatol, 38: 559-63). Sin embargo, describen el sistema como desordenado, poco práctico, que causa dolor en las heridas abiertas y posiblemente causa más daño a las heridas. Hardwick, et al., Refinaron el sistema utilizando una membrana selectivamente permeable entre los reactivos y la herida. Informaron que en un modelo in vitro fue eficaz para reducir la carga microbiana (Hardwick et al., 2011, Clinical Sci, 100: 395-400). Si bien este método para la formación de NO se puede administrar mediante la aplicación tópica a una lesión o sitio de infección (Benjamin et al., Patente de EE. UU. No. 6,709,681), este método de tratamiento es una exposición de corta duración, que requiere múltiples reaplicaciones y es poco probable que trate lesiones o infecciones que no están presentes en el sitio específico de aplicación.

Por lo tanto, existe una necesidad en la técnica de tratamientos simples y efectivos no basados en antibióticos para humanos, particularmente en casos en los que el tiempo o ventana disponible para la administración es corto, y donde el sitio de tratamiento dirigido es diferente del sitio de administración. La presente invención se dirige a estas necesidades insatisfechas en la técnica.

Breve descripción de los dibujos

65 La siguiente descripción detallada de las realizaciones preferidas de la invención se comprenderá mejor cuando se lea junto con los dibujos adjuntos. Con el fin de ilustrar la invención, se muestran en los dibujos realizaciones que son

actualmente preferidas. Debe entenderse, sin embargo, que la invención no se limita a las disposiciones e instrumentos precisos de las realizaciones mostradas en los dibujos.

La Figura 1 muestra un dispositivo de quimioluminiscencia y Hathback.

5

La Figura 2 comprende las Figuras 2A-2B, que representan la cantidad de NO detectada a los 3, 8, 15 min (A) así como a las 3, 4 (A) y 24 horas (B). La escala X es el TIEMPO (minutos) desde el inicio en el punto de medición (que muestra la cantidad de medición previa como 0-0.1 ppm) y la escala Y muestra la cantidad de NO (medido en ppb).

10

La Figura 3 es un gráfico que representa la eficacia antibacteriana de NORS contra *A. baumannii*, *S. aureus* resistente a metilina y *E. coli* usando NORS de concentraciones variables de nitrito (0.07-0.41 %) a pH 3.7. Los controles fueron: solución salina, nitritos solo al 0.41 % (pH 6) y solución salina con pH reducido a 3.7. Las barras de error indican la desviación estándar para tres experimentos con 3 repeticiones cada uno.

15

La Figura 4 representa placas de agar LA/BHI, en placa con *A. baumannii*, *S. aureus* resistente a la metilina y *E. coli* después de una exposición de 10 minutos a NORS.

La Figura 5 es un gráfico que representa la viabilidad del serotipo 1 (rayas) y 6 (cuadrados) de *M. haemolytica* después del tratamiento con NORS al 0.41 % durante 0.5, 1, 2 y 5 minutos. Una estrella representa una muerte completa.

20

La Figura 6 es un gráfico que representa la eficacia antiviral de NORS contra Influenza H1N1 usando NORS de concentraciones variables de nitrito (0.007-0.14 %) a pH 3.7. Los controles fueron: solución salina, nitritos solo al 0.14 % (pH 6) y solución salina con pH reducido a 3.7. Las barras de error indican la desviación estándar para tres experimentos con 3 repeticiones cada uno.

25

La Figura 7 comprende las Figuras 7A-7B. Las figuras muestran 2 fotografías de las placas de ensayo de placa para A. control de solución salina y NORS al 0.07 % de concentración, B - control de pH y NORS al 0.14 % de concentración.

30

La Figura 8 comprende las Figuras 8A-8C. Estos son gráficos que representan la viabilidad del virus usando NORS al 0.41 % y diferentes títulos iniciales para el control (triángulo), tratamiento de 1 minuto (cuadrado) y tratamiento de 10 minutos (círculo). Se utilizó solución salina como control. (A - IBR, B - BRSV, C - PI3).

La figura 9 es un diagrama esquemático del aparato construido para probar el efecto de los gases del espacio libre generados por NORS sobre el crecimiento micelial.

35

La Figura 10 es un gráfico que representa la eficacia antifúngica de NORS contra *Trichophyton mentagrophytes* (10A) y *Trichophyton rubrum* (10B) usando NORS de concentraciones variables de nitrito (0.007-0.07 %). Las barras de error indican la desviación estándar para tres experimentos con 3 repeticiones cada uno. A * representa una diferencia significativa ($P < 0.05$) con respecto al control.

40

La figura 11 está compuesta por las figuras 11A-11B. Este es un cromatograma de los gases del espacio libre que se encuentran después de 30 minutos de exposición a NORS. Se muestra un cromatograma producido por un GC-MS que demuestra los componentes del gas del espacio libre después de una exposición de 30 min a 0.14 % de NORS. El método GC-MS se calibró para cuantificar los niveles de NO, N₂O y NO₂. A - Cromatograma GC para MW = 30 - las moléculas detectadas se etiquetan encima de cada pico. B - Cromatograma MS con el peso molecular detectado a los 5.4 min.

45

Figura 12. Actividad antifúngica de los gases del espacio libre producidos por NORS. Gráficos de dos líneas que demuestran 1. Recuento de viabilidad de micelios de *T. mentagrophytes* (eje Y izquierdo) y 2. Niveles de nitrito en la solución de hongos expuestos (eje Y derecho) medidos por Griess Reagent™. Ambos, después de haber estado expuestos a gases generados por NORS en el espacio libre durante 2, 4, 8, 16 y 24 horas. El recuento de viabilidad micelial se muestra como cuadrados, mientras que la concentración de nitrito se muestra como triángulos. Las barras de error indican la desviación estándar de los triplicados.

50

La Figura 13, compuesta por las Figuras 13A-13B, representa la incidencia de BRDc después de 7 y 14 días después de la llegada al corral de engorde. La figura 13A es un gráfico que representa el porcentaje de animales enfermos en cada grupo. La Figura 13B es un gráfico que representa el porcentaje de animales enfermos en el grupo de tratamiento/control sobre el total de animales enfermos. Blanco = control. Gris = SIN tratamiento.

55

La Figura 14, que comprende las Figuras 14A-14C, representa los niveles de MetHb. La Figura 14A es un gráfico que representa los niveles de MetHb antes, 5 minutos y 30 minutos después del tratamiento para los animales de control. La Figura 14B es un gráfico que representa los niveles de MetHb antes, 5 minutos y 30 minutos después del tratamiento para los animales tratados con NO. La Figura 14C es un gráfico que representa la diferencia promedio en los valores de MetHb 5 minutos y 30 minutos después del tratamiento en comparación con los valores medidos antes del tratamiento. (gris = control, blanco = tratamiento con NO) todos los animales probados en cada grupo.

60

65

La Figura 15, compuesta por las Figuras 15A-15B, representa el NO exhalado medido por quimioluminiscencia. La figura 15A es un espectro que representa el NO exhalado del grupo de control. La Figura 15B es un espectro que representa el NO exhalado del grupo de tratamiento.

5 La Figura 16 muestra la concentración de nitrito en las muestras. La figura muestra la diferencia en la concentración de nitrito en las muestras después del tratamiento (concentración en las muestras posteriores al tratamiento de 5 minutos o 30 minutos menos la concentración en las muestras del tratamiento previo). (gris = control, blanco = tratamiento con NO) Las barras de error indican la desviación estándar para todos los animales probados en cada grupo.

10 La Figura 17, compuesta por dos fotografías, muestra la administración de NORS en forma de niebla a hurones.

La Figura 18 comprende la Figura 18A-18B, representa los cambios en la temperatura (18A) y el título viral (18B) 1-5 días después de la instalación viral y el tratamiento con solución salina (control) o NORS (0.41 %) para hurones.

15 Descripción detallada

La presente invención se refiere al descubrimiento inesperado de que la administración de una solución de liberación de óxido nítrico líquido (NORS) a un sujeto proporciona un mecanismo para administrar una cantidad eficaz de NO gaseoso (gNO) a uno o ambos sitios de administración, o a un sitio de tratamiento dirigido que está distal al sitio de administración. Por ejemplo, la administración de un NORS líquido por vía intranasal proporciona gNO localmente a un sujeto al tiempo que permite la entrega dirigida de gNO a una ubicación diferente en las vías respiratorias distales o el pulmón del sujeto. Además, la presente invención se refiere al descubrimiento inesperado de que la administración de un NORS líquido proporciona el suministro rápido del NORS líquido al sitio de tratamiento objetivo, seguido de una liberación extendida y prolongada de gNO en el sitio de tratamiento. La presente invención es particularmente adecuada para aplicaciones móviles o de campo, donde el tiempo y el espacio son limitados. Por ejemplo, la presente invención es muy adecuada para su uso con un paciente ambulatorio o un sujeto en el que la herida de un paciente puede cubrirse con una gasa empapada en NORS, cubrirse con un vendaje impermeable al gas y enviarse a casa mientras continúan siendo tratados con gNO por otras 24 horas.

20 De acuerdo con lo anterior, en un aspecto de la invención, NORS proporciona una liberación prolongada de gNO como se define en las reivindicaciones. En otro aspecto de la invención, el NORS está compuesto por una baja concentración de un compuesto liberador de óxido nítrico y/o una baja cantidad de un agente acidificante como se define en las reivindicaciones. La presente invención también incluye usos médicos de NORS como se define en las reivindicaciones. Aquí, un NORS respectivo puede, por ejemplo, utilizarse en métodos para el tratamiento de una herida en un sujeto que lo necesite. La presente invención también incluye un NORS respectivo para su uso en un método para reducir la presencia de una bacteria, hongo, virus u otro patógeno mediante la administración de un NORS. En una realización, la solución se puede administrar al menos a una parte del tracto respiratorio superior de un ser humano. En una realización adicional, la solución puede instilarse sobre un apósito debajo de una cubierta impermeable o semiimpermeable al gas. En una realización adicional, la solución puede estar en un recipiente abierto para remojar una extremidad con una infección o herida.

Definiciones

45 A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen el mismo significado que el comúnmente entendido por un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en este documento puede usarse en la práctica o ensayo de la presente invención, se describen los métodos y materiales preferidos.

50 Como se usa en este documento, cada uno de los siguientes términos tiene el significado asociado con él en esta sección.

Los artículos “un” y “una” se utilizan en el presente documento para hacer referencia a uno o más de uno (es decir, al menos uno) del objeto gramatical del artículo. A modo de ejemplo, “un elemento” significa un elemento o más de un elemento.

55 “Aproximadamente” como se usa en este documento cuando se refiere a un valor medible tal como una cantidad, una duración temporal y similares, pretende abarcar variaciones de $\pm 20\%$, $\pm 10\%$, $\pm 5\%$, $\pm 1\%$, o $\pm 0.1\%$ del valor especificado, ya que tales variaciones son apropiadas para realizar los métodos divulgados.

60 Como se usa en el presente documento, el término “modular” se refiere a cualquier cambio en el estado biológico, es decir, en aumento, disminución y similares.

Como se usa en el presente documento, una “cantidad terapéuticamente eficaz” es una cantidad de una composición terapéutica suficiente para proporcionar un efecto beneficioso a un sujeto al que se administra la composición.

Los términos “paciente”, “sujeto” e “individuo” se usan indistintamente para referirse a un animal de sangre caliente, como un mamífero, que padece una enfermedad o trastorno. Se entiende que los seres humanos y los animales están incluidos dentro del alcance del término “sujeto”, “sujeto” o “individuo”.

5 Como se usa en este documento, los términos “sitio de tratamiento” y “sitio de tratamiento” se usan para referirse a un área, una región o un sitio en, o dentro del cuerpo de un sujeto, incluyendo un tejido, una herida, una lesión, un absceso, incluida la piel intacta. Los sitios de tratamiento que pueden tratarse mediante los usos médicos de la invención incluyen cualquier área, región o sitio en la superficie o dentro del cuerpo de un sujeto que pueda estar expuesto al óxido nítrico gaseoso. A modo de ejemplos no limitativos, las regiones y sitios que pueden tratarse mediante los usos médicos de la invención incluyen, entre otros, tejidos externos (por ejemplo, piel, etc.), tejidos internos (por ejemplo, mucosas, músculos, fascia, etc.) y órganos internos (por ejemplo, pulmones, hígado, etc.). Debe entenderse que muchas áreas, regiones y sitios que normalmente no son susceptibles a la exposición al óxido nítrico gaseoso pueden volverse susceptibles a la exposición al óxido nítrico gaseoso después de que se introduce una herida, como, por ejemplo, una incisión quirúrgica o una laceración traumática. al cuerpo de un sujeto. Además, no se debe interpretar que “sitio de tratamiento” incluye solo aquellas áreas, regiones o sitios que exhiben evidencia manifiesta de patología, sino que también debe interpretarse que incluye áreas, regiones o sitios que pueden ser asintomáticos, es decir, que no contienen evidencia manifiesta de patología, pero que, no obstante, puede verse afectada y que, con el tiempo, podría exhibir evidencia más evidente de patología. A modo de ejemplos no limitativos, dicho sitio puede incluir una herida traumática, herida quirúrgica, tejido intacto o quemadura, incluidos aquellos que han estado en contacto con, o que están en riesgo de entrar en contacto potencialmente con, un patógeno que pueda colonizar o quemar. infectar la herida y puede tratarse, o tratarse profilácticamente, con los dispositivos en el contexto de la invención y los usos médicos de la invención.

“NORS”, como se usa en el presente documento, puede referirse a una solución o sustancia que libera óxido nítrico.

25 Una “enfermedad” es un estado de salud de un sujeto en el que el sujeto no puede mantener la homeostasis, y en el que, si la enfermedad no mejora, la salud del sujeto continúa deteriorándose.

30 Por el contrario, un “trastorno” en un sujeto es un estado de salud en el que el sujeto es capaz de mantener la homeostasis, pero en el que el estado de salud del sujeto es menos favorable de lo que sería en ausencia del trastorno. Si no se trata, un trastorno no necesariamente causa una disminución adicional en el estado de salud del sujeto.

Una enfermedad o trastorno se “alivia” si se reduce la gravedad de un síntoma de la enfermedad o trastorno, la frecuencia con la que tal síntoma es experimentado por un paciente, o ambos.

35 El término “tratar” o “tratamiento”, como se usa en este documento, se refiere al alivio (es decir, “disminución”) y/o la eliminación de un signo o síntoma o una fuente de un signo o síntoma de una enfermedad o trastorno. A modo de varios ejemplos no limitantes, un síntoma de una infección bacteriana se puede tratar aliviando un síntoma de ese trastorno. Un síntoma de una infección bacteriana también se puede tratar eliminando por completo un síntoma de ese trastorno. Una infección o colonización bacteriana se puede tratar aliviando la fuente o “causa” de ese trastorno. Una infección o colonización bacteriana también se puede tratar eliminando la fuente de ese trastorno.

40 Como se usa en este documento, una “bacteria resistente a los antibióticos”, es una bacteria que es miembro de una especie de bacteria que históricamente ha exhibido mayor susceptibilidad a uno o más agentes antibióticos particulares que la que exhibe actualmente la bacteria miembro resistente a antibióticos.

45 Rangos: a lo largo de esta divulgación, se pueden presentar varios aspectos de la invención en un formato de rango. Debe entenderse que la descripción en formato de rango es simplemente por conveniencia y brevedad y no debe interpretarse como una limitación inflexible. De acuerdo con lo anterior, se debe considerar que la descripción de un rango ha divulgado específicamente todos los subrangos posibles, así como los valores numéricos individuales dentro de ese rango. Por ejemplo, se debe considerar que la descripción de un rango como de 1 a 6 tiene subrangos específicamente divulgados como de 1 a 3, de 1 a 4, de 1 a 5, de 2 a 4, de 2 a 6, de 3 a 6, etc., así como números individuales dentro de ese rango, por ejemplo, 1, 2, 2.7, 3, 4, 5, 5.3 y 6. Esto se aplica independientemente de la amplitud del rango.

Descripción

55 Como se mencionó anteriormente, la presente invención se refiere a sistemas y métodos para administrar un NORS líquido a un sujeto como vehículo para liberar una cantidad eficaz de gNO en el sitio de administración y/o en un sitio de tratamiento dirigido que está distal a el sitio de administración. La administración del NORS líquido proporciona la entrega rápida del NORS líquido al sitio de tratamiento objetivo, seguido de una liberación extendida y prolongada de gNO en el sitio de tratamiento.

60 La presente invención proporciona una serie de ventajas sobre los tratamientos de NO utilizados actualmente. Por ejemplo, como se presenta en el presente documento, se ha descubierto inesperadamente que los NORS de la presente invención son capaces de liberar una cantidad terapéuticamente eficaz de NO durante un período de tiempo prolongado mientras se usa una cantidad menor de uno o ambos de un componente de nitrito y un agente acidificante que las composiciones de la técnica anterior. También como se presenta en el presente documento, se ha descubierto

inesperadamente que cuando las composiciones de la presente invención se formulan como un líquido en lugar de como una crema o loción, se logra una administración sorprendente y significativamente más eficaz de gNO, incluida una mayor duración de la liberación de gNO y por lo tanto la capacidad de usar una cantidad o dosificación reducida de la composición. Además, a diferencia de las aplicaciones tópicas que se aplican directamente a la lesión y, por lo tanto, tienen un área de tratamiento limitada solo al sitio de aplicación, el gNO liberado de un NORS líquido también puede tratar lesiones o microbios que no se encuentran en el sitio de aplicación. Por ejemplo, el NORS líquido se puede rociar en las fosas nasales del sujeto, lo que da como resultado la liberación prolongada de gNO en el flujo de aire inspirado del sujeto durante minutos u horas. Además, la duración del tratamiento se puede reducir a un solo tratamiento versus múltiples tratamientos durante semanas o meses, como cuando se usa una aplicación tópica.

En un aspecto, la presente invención proporciona composiciones y composiciones para su uso en métodos como se definen en las reivindicaciones útiles para el tratamiento de enfermedades y trastornos en los que la administración de óxido nítrico es beneficiosa. En una realización, los métodos y composiciones son útiles para el tratamiento de una herida en un sujeto que lo necesite. En una realización, el método comprende además cubrir la herida con una cubierta impermeable al gas. En otra realización, los métodos y la composición son útiles para tratar infecciones de los pies asociadas a hongos o diabetes. Debe apreciarse que los NORS de la presente invención pueden ser adecuados para tratar cualquier infección provocada por un microorganismo o patógeno, incluyendo una bacteria, un virus, un hongo, un protozoo, un parásito, un artrópodo y similares.

Soluciones de liberación de NO

Los NORS de la presente invención proporcionan una liberación prolongada de gNO a un sujeto que lo necesite. Por "liberación extendida" se entiende que se libera una cantidad eficaz de gas NO de la formulación a una velocidad controlada, de modo que los niveles terapéuticamente beneficiosos (pero por debajo de los niveles tóxicos) del componente se mantienen durante un período extendido de tiempo que varía hasta aproximadamente 24 horas, proporcionando así, por ejemplo, una forma de dosificación de 30 a 60 minutos, o varias horas. Como se define en las reivindicaciones, el gas NO se libera durante un período de al menos 30 minutos. En una realización, el gas NO se libera durante un período de al menos 8 horas. En otra realización, el gas NO se libera durante un período de al menos 12 horas. En otra realización, el gas NO se libera durante un período de al menos 24 horas. Una NORS de liberación prolongada es beneficiosa porque la solución se puede administrar al sujeto durante un período corto de tiempo, mientras que la liberación de NO de la solución continúa después de la administración. Además, el uso de un NORS de liberación prolongada permite que el sujeto permanezca ambulatorio después de la administración de la solución, en lugar de permanecer inmóvil mientras está conectado a un dispositivo de liberación de NO para recibir tratamiento.

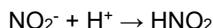
En un aspecto, los NORS de la presente invención tienen propiedades antibacterianas, antifúngicas y/o antivirales y, por tanto, pueden ser útiles como agentes antibacterianos, antifúngicos y/o antivirales. En una realización el NORS es un agente antibacteriano eficaz contra *Acinetobacter baumannii*. En otra realización, el NORS es un agente antibacteriano eficaz contra *Staphylococcus aureus* resistente a metilicina. En otra realización, el NORS es un antibacteriano eficaz contra *Escherichia coli*. En una realización, NORS es un agente antifúngico eficaz contra *Trichophyton rubrum*. En otra realización, el NORS es un agente antivírico eficaz contra Influenza H1N1.

La solución de la presente invención se vuelve activa cuando los nitritos y ácidos se mezclan en solución salina o agua en la que el pH de la solución es inferior a 4.0 y presenta un nivel de producción aumentado o mejorado de gas óxido nítrico durante un período de tiempo prolongado. En una realización, el pH del estado activo de la solución liberadora de óxido nítrico está entre un pH de aproximadamente 1.0 y un pH de aproximadamente 4.0. En otra realización, el pH del estado activo de la solución liberadora de óxido nítrico está entre un pH de aproximadamente 3.0 y un pH de aproximadamente 4.0. En una realización, el pH es de aproximadamente 3.2. En otra realización, el pH es de aproximadamente 3.6. En otra realización, el pH es de aproximadamente 3.7. En una realización, el pH es de aproximadamente 4.0. En otra realización, el pH está por debajo de aproximadamente 4.0. Debido a que la solución liberadora de óxido nítrico de la presente invención no es activa hasta que el ácido interactúa con los nitritos en líquido, la solución de nitrito puede prepararse previamente, transportarse y prepararse para su administración mientras está en su estado latente (pH mayor que 4.0), sin producir ningún gas óxido nítrico apreciable o sin perder su capacidad para producir una cantidad eficaz de gas óxido nítrico. Luego, cuando un usuario está listo para entregar o administrar la solución para el tratamiento de un sujeto humano, la solución puede activarse inmediatamente antes de la administración al sujeto humano mediante la adición de un ácido (pH conducido por debajo de 4.0), maximizando así la cantidad de gas de óxido nítrico producido por la dosis de solución administrada.

En una realización, el pH de la solución se puede reducir mediante la adición de al menos un agente acidificante a la solución. La introducción del agente acidificante impulsa la reacción de la solución hacia los reactivos, reduciendo así el pH (creando más ácido), que a su vez crea más gas de óxido nítrico.

Por ejemplo, al introducir nitrito de sodio (u otras sales de nitritos) en una solución salina se producirá muy lentamente gas de óxido nítrico, pero en una cantidad indetectable (medida por la metodología de análisis de quimioluminiscencia (sensibilidad de ppb)). La tasa de NO producido a partir de la solución aumenta a medida que disminuye el pH, particularmente cuando cae por debajo de pH 4.0. El NO se produce en base a las siguientes ecuaciones de equilibrio:

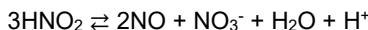
1.



5 2a.



10 2b.



15 Por tanto, un agente acidificante, por ejemplo, un ácido, puede donar el H^+ al nitrito (NO_2^-). Cuanto más H^+ esté presente, más rápida será la reacción hacia el HNO_2 y se producirá más NO.

20 En una realización, la solución liberadora de óxido nítrico incluye el uso de una solución a base de agua o solución salina y al menos un compuesto liberador de óxido nítrico, tal como nitrito o una sal del mismo. En una realización, la solución es una solución basada en solución salina. En una realización, el compuesto liberador de óxido nítrico es un nitrito, una sal del mismo y cualquier combinación de los mismos. Los ejemplos no limitantes de nitritos incluyen sales de nitrito como nitrito de sodio, nitrito de potasio, nitrito de bario y nitrito de calcio, sales mixtas de nitrito como nitrito orotato y ésteres de nitrito como nitrito de amilo. En una realización, el compuesto liberador de óxido nítrico se selecciona del grupo que consiste en nitrito de sodio y nitrito de potasio, y cualquier combinación de los mismos. En otra realización, el compuesto liberador de óxido nítrico es nitrito de sodio. En una realización, la solución está compuesta de nitrito de sodio en una solución salina. En otra realización, la solución está compuesta por nitrito de potasio en una solución salina.

25 En una realización, la concentración de nitritos en la solución está entre el 0.07 % p/v y aproximadamente el 0.5 % p/v. En una realización, la concentración de nitritos en la solución no es mayor de aproximadamente 0.5 % p/v. En otra realización, la concentración de nitritos en la solución es de aproximadamente 0.41 % p/v. En otra realización, la concentración de nitritos en la solución está entre aproximadamente 0.07 y 0.5 % p/v. Como se usa en este documento, el término "p/v" se refiere al (peso de soluto/volumen de solución) x 100 %.

30 La solución de la presente invención también puede contener al menos un agente acidificante. Como se describe en otra parte de la presente, la adición de al menos un agente acidificante a la solución de la presente invención contribuye a aumentar la producción de NO. La presente invención contempla cualquier agente acidificante que proporcione una mayor producción de NO. En una realización, el agente acidificante es un ácido. Los ejemplos no limitantes de ácidos incluyen ácido ascórbico, palmitato de ascorbilo, ácido salicílico, ácido málico, ácido láctico, ácido cítrico, ácido fórmico, ácido benzoico, ácido tartárico, ácido clorhídrico, ácido sulfúrico y ácido fosfórico. En una realización, el ácido se selecciona del grupo que consiste en ácido ascórbico, ácido cítrico, ácido málico, ácido clorhídrico y ácido sulfúrico, y cualquier combinación de los mismos. En una realización, el ácido es ácido cítrico.

35 Como se describió anteriormente, la cantidad de agente acidificante presente en la solución afectará directamente la velocidad de la reacción para producir NO. Como se define en las reivindicaciones, la cantidad de agente acidificante no es mayor de aproximadamente 0.5 % p/v. En otra realización, la cantidad de agente acidificante es aproximadamente 0.5 % p/v. En otra realización, la cantidad de agente acidificante es aproximadamente 0.2 % p/v. En una realización, la cantidad de agente acidificante es aproximadamente 0.07 % p/v. En otra realización, la cantidad de agente acidificante está entre aproximadamente 0.07 y 0.5 % p/v.

40 La solución se puede administrar al sujeto como una formulación de liberación extendida de gas NO y, opcionalmente, con una formulación portadora, como microesferas, microcápsulas, liposomas, etc., como un ungüento o solución tópica, o en una inyección intranasal, como es conocido por un experto en la técnica para tratar una enfermedad o trastorno microbiano.

45 La solución de la presente invención puede liberar una concentración terapéuticamente eficaz de NO. En una realización, la concentración terapéuticamente eficaz de NO está entre aproximadamente 100 ppm y aproximadamente 1000 ppm. En otra realización, la concentración terapéuticamente eficaz de NO está entre aproximadamente 120 ppm y aproximadamente 400 ppm. En una realización preferida, la concentración terapéuticamente eficaz de NO es de aproximadamente 160 ppm.

60 Métodos

65 La presente invención proporciona un NORS líquido para su uso en un método de tratamiento de un sujeto necesitado que comprende el suministro de una solución de liberación de óxido nítrico a un sitio de tratamiento del sujeto como se define en las reivindicaciones. El presente método puede usarse para tratar, prevenir o reducir la incidencia de cualquier enfermedad, trastorno o afección en la que la administración de óxido nítrico sea beneficiosa. Las enfermedades, trastornos o afecciones ejemplares incluyen, pero no se limitan a, enfermedades respiratorias, infecciones respiratorias, heridas, quemaduras, infecciones tóxicas, enfermedades inflamatorias y similares. En una realización preferida, la

enfermedad, trastorno o afección son hongos en los pies. En otra realización preferida, la enfermedad, trastorno o afección son las úlceras del pie diabético. En otra realización preferida, la enfermedad, trastorno o afección son heridas quirúrgicas infectadas.

5 La presente invención es única porque permite la administración de óxido nítrico a un sujeto ambulatorio, o a una línea de ensamblaje de sujetos donde el protocolo de administración para la administración de NORS se logra en un período de tiempo corto. Esto es particularmente importante y valioso cuando se trata a seres humanos, ya que un paciente solo necesita estar situado momentáneamente durante el corto período de administración y luego puede moverse o ser movido, según se desee. Por ejemplo, la liberación extendida y el suministro de óxido nítrico al sitio de tratamiento por medio de la solución de liberación de óxido nítrico administrada permite que el sujeto tratado permanezca ambulatorio durante el tratamiento o inmóvil durante un período de tiempo muy corto. Por tanto, el sujeto no está limitado a un dispositivo de suministro de óxido nítrico durante toda la duración del suministro de óxido nítrico. Por el contrario, los NORS se pueden administrar al sujeto durante un tratamiento de corta duración, y después de la administración, los NORS continuarán administrando una liberación prolongada de una cantidad terapéuticamente eficaz de óxido nítrico al sujeto. En una realización preferida, el sujeto es un ser humano.

En un aspecto, la presente invención incluye un NORS líquido como se define en las reivindicaciones para su uso en un método para el tratamiento de una herida en un sujeto que lo necesita. En una realización, el método comprende rociar la herida de un sujeto con una solución liberadora de óxido nítrico que ha sido preparada justo antes de la aplicación y luego cubierta con una cubierta impermeable o semi-impermeable al gas que retendrá el óxido nítrico producido debajo de la cubierta y, por lo tanto, exponga la herida a la concentración terapéutica de óxido nítrico durante un período extendido de tiempo. La cubierta puede tener un pequeño orificio de purga para controlar o limitar la presión debajo de la cubierta. Esto permite que el sujeto sea tratado y luego deambule, eliminando la necesidad de que el sujeto permanezca junto a la fuente de gas.

En una realización, el método comprende el tratamiento de una herida, que incluye, pero no se limita a, una herida abierta, corte, raspado, quemadura, absceso, lesión, herida quirúrgica, herida por traumatismo, herida asociada a enfermedad o similar. En ciertas realizaciones, el método comprende administrar la solución inactiva al sitio de tratamiento. En determinadas realizaciones, el agente acidificante se añade a la solución inactiva, lo que reduce el pH de la solución inactiva creando así la solución liberadora de óxido nítrico. Por ejemplo, en una realización, la solución liberadora de óxido nítrico se produce añadiendo el agente acidificante a la solución inactiva directamente en el sitio de tratamiento. En otra realización, la solución de óxido nítrico se produce fuera del sitio de tratamiento y luego se aplica tópicamente al sitio de tratamiento. En una realización, el método comprende administrar una cubierta impermeable al gas sobre el área de tratamiento del sujeto, con el fin de restringir el gas de óxido nítrico producido sobre el sitio de tratamiento. La cubierta se puede aplicar antes, durante o después de la administración de la solución inactiva o la solución liberadora de óxido nítrico. La solución de liberación de óxido nítrico proporciona una producción prolongada de óxido nítrico, proporcionando así una administración continua de óxido nítrico terapéutico a la herida del sujeto.

Los pacientes con heridas abiertas como resultado de una lesión física o infección o del resultado de enfermedades conocidas tales como diabetes o enfermedad de estasis venosa, tienen la necesidad de que sus heridas se traten con un gas de óxido nítrico o un compuesto de óxido nítrico. Debido a que los NORS de la presente invención proporcionan una liberación prolongada de óxido nítrico y, por lo tanto, requieren un período de tiempo corto para la administración de la solución, los sujetos tratados con un NORS de la presente invención pueden permanecer ambulatorios después de la administración de la solución. Por lo tanto, la presente invención es ventajosa sobre los métodos anteriores, en los que se requiere que los pacientes que están siendo tratados con gas de óxido nítrico permanezcan estacionarios en un lugar donde el dispositivo de suministro y la fuente de gas de alta presión están conectados a su herida.

En una realización, la presente invención proporciona un NORS líquido para su uso en un método de tratamiento de la inflamación de la piel, que incluyen, inflamación asociada con psoriasis, dermatitis (atópica, de contacto, seborreica, etc.), eczema, tinea pedis y rosácea. En ciertas realizaciones, el método comprende administrar la solución inactiva al sitio de tratamiento. En determinadas formas de realización, el agente acidificante se suministra a la solución inactiva, lo que reduce el pH de la solución inactiva creando así la solución liberadora de óxido nítrico. Por ejemplo, en una realización, la solución liberadora de óxido nítrico se produce aplicando un agente acidificante a la solución inactiva directamente en el sitio de tratamiento. En otra realización, la solución de óxido nítrico se produce fuera del sitio de tratamiento y luego se aplica tópicamente al sitio de tratamiento. En una realización, el método comprende administrar una cubierta impermeable al gas sobre el área de tratamiento del sujeto, con el fin de restringir el gas de óxido nítrico producido sobre el sitio de tratamiento. La cubierta se puede aplicar antes, durante o después de la administración de la solución inactiva o la solución liberadora de óxido nítrico. La solución de liberación de óxido nítrico proporciona una producción extendida de óxido nítrico, proporcionando así una administración continua de óxido nítrico terapéutico al sitio de tratamiento del sujeto.

En determinadas realizaciones, la solución de liberación de óxido nítrico se prepara justo antes de la administración al sujeto mediante la administración de un agente acidificante a una solución inactiva. Por ejemplo, como se describe en otra parte de este documento, la administración del agente acidificante a la solución inactiva da como resultado la disminución del pH de la solución inactiva, activando así la solución liberadora de óxido nítrico que se administrará en el sitio de tratamiento. Es importante destacar que la solución de liberación de óxido nítrico proporciona una producción prolongada de óxido nítrico. En una realización, la solución de liberación de óxido nítrico produce óxido nítrico durante un

período de entre 30 minutos y 24 horas. En una realización, la solución de liberación de óxido nítrico produce óxido nítrico durante un período de entre 30 y 45 minutos. Como se define en las reivindicaciones, la solución de liberación de óxido nítrico produce óxido nítrico durante al menos 30 minutos. En una realización, la solución de liberación de óxido nítrico produce óxido nítrico durante al menos 1 hora. En otra realización, la solución de liberación de óxido nítrico produce óxido nítrico durante al menos 4 horas. En otra realización, la solución de liberación de óxido nítrico produce óxido nítrico durante al menos 8 horas. En otra realización, la solución de liberación de óxido nítrico produce óxido nítrico durante al menos 12 horas. En otra realización, la solución de liberación de óxido nítrico produce óxido nítrico durante al menos 24 horas. Por tanto, la solución de liberación de óxido nítrico administrada proporciona el suministro continuo de óxido nítrico al sitio de tratamiento del sujeto.

La solución de liberación de óxido nítrico se puede administrar al sujeto en una variedad de formas. La solución liberadora de óxido nítrico puede administrarse como un líquido, un aerosol, un vapor, microgotas, neblina, pediluvio o cualquier forma que proporcione la liberación de óxido nítrico de la solución, como entendería un experto en la técnica. En una realización, la solución de liberación de óxido nítrico se administra en forma de spray. En otra realización, la solución liberadora de óxido nítrico se administra en forma de vapor. La cantidad o el volumen de dosificación de la solución de liberación de óxido nítrico administrada se puede variar para optimizar la duración de la producción y el suministro de óxido nítrico. En una realización, la cantidad de solución liberadora de óxido nítrico administrada a un sujeto está entre aproximadamente 0.1 ml y 5000 ml. En otra realización, la cantidad de solución liberadora de óxido nítrico administrada a un sujeto está entre aproximadamente 10 ml y 1000 ml. En una realización, la cantidad de solución liberadora de óxido nítrico administrada a un sujeto es de aproximadamente 2 ml. En una realización, la cantidad de solución liberadora de óxido nítrico administrada a un sujeto es de aproximadamente 10 ml. En una realización, la cantidad de solución liberadora de óxido nítrico administrada a un sujeto es de aproximadamente 32 ml. En otra realización, la cantidad de solución liberadora de óxido nítrico administrada a un sujeto es de aproximadamente 160 ml. La solución de liberación de óxido nítrico se puede volver a administrar una o más veces, según sea necesario para tratar eficazmente al sujeto. En una realización, la solución liberadora de óxido nítrico se administra una vez a un sujeto. En otra realización, la solución de liberación de óxido nítrico se administra múltiples veces a un sujeto, donde la NORS se vuelve a administrar sustancialmente después de completar la liberación prolongada de gNO de la dosis anterior administrada.

En determinadas realizaciones, la solución liberadora de óxido nítrico se administra directamente en el tracto respiratorio superior del sujeto. Por ejemplo, en una realización, la solución liberadora de óxido nítrico se pulveriza en el tracto respiratorio superior del sujeto. La solución puede administrarse en el tracto respiratorio superior del sujeto una vez por hora, una vez al día, una vez a la semana, una vez cada dos semanas, una vez al mes, una vez cada dos meses, una vez al año, y en todos y cada uno de los intervalos entre ellos necesario para tratar el tema. En una realización, la solución se pulveriza una vez a la semana. En otra realización, la solución se pulveriza una vez a la semana durante cuatro semanas consecutivas. La solución de liberación de óxido nítrico proporciona una producción prolongada de óxido nítrico, proporcionando así una administración continua de óxido nítrico terapéutico a la infección respiratoria superior del sujeto.

La duración de la administración de la solución de liberación de óxido nítrico al sujeto puede variarse para optimizar la administración. En una realización, la solución liberadora de óxido nítrico se administra al sujeto durante un período de tiempo de menos de 5 segundos. En otra realización, la solución liberadora de óxido nítrico se administra al sujeto durante un período de tiempo de aproximadamente 5 segundos. En otra realización, la solución liberadora de óxido nítrico se administra al sujeto durante un período de tiempo de aproximadamente 30 segundos. En otra realización, la solución liberadora de óxido nítrico se administra al sujeto durante un período de tiempo de aproximadamente 1 minuto. En otra realización, la solución liberadora de óxido nítrico se administra al sujeto sobre un período de tiempo de aproximadamente 2 minutos. En otra realización, la solución liberadora de óxido nítrico se administra al sujeto durante un período de tiempo de aproximadamente 10 minutos. En otra realización, la solución liberadora de óxido nítrico se administra al sujeto durante un período de tiempo de aproximadamente 30 minutos.

En una realización, el método comprende el tratamiento, la prevención o la reducción de la incidencia de una enfermedad o trastorno respiratorio en un sujeto. Las enfermedades o trastornos respiratorios ejemplares tratados mediante el presente método incluyen, pero no se limitan a enfisema, bronquitis crónica, asma, síndrome respiratorio del adulto (SDRA), enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), fibrosis quística, influenza y similares. En determinadas realizaciones, el método comprende el tratamiento de una enfermedad o trastorno respiratorio causado por una infección bacteriana, fúngica o viral. En algunas realizaciones, la infección es provocada por una bacteria. En otras realizaciones, la infección está provocada por un virus. El tratamiento de una enfermedad respiratoria mediante la presente invención comprende el suministro de una solución liberadora de óxido nítrico en el tracto respiratorio superior del sujeto a tratar. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, la solución liberadora de óxido nítrico puede inyectarse, pulverizarse, inhalarse o instilarse en el tracto respiratorio del sujeto. La solución liberadora de óxido nítrico se puede administrar al tracto respiratorio del sujeto a través de la cavidad nasal o la cavidad oral del sujeto. En una realización, la solución liberadora de óxido nítrico se pulveriza en el tracto respiratorio superior del sujeto. En una realización, la solución se administra al sujeto por vía intranasal. En una realización, la solución se administra a los senos nasales. La solución de liberación de óxido nítrico proporciona una producción prolongada de óxido nítrico, proporcionando de ese modo el suministro continuo de óxido nítrico terapéutico al tracto respiratorio superior del sujeto.

En una realización, el método comprende el tratamiento de una herida, que incluye, entre otros, una herida abierta, un corte, un raspado, una quemadura, un absceso, una lesión, una herida quirúrgica, una herida por traumatismo, una herida

asociada a una enfermedad en la que la herida es provocada o afectada por una infección. Por ejemplo, la infección puede ser provocada por un hongo o una bacteria, incluida una bacteria que ha desarrollado resistencia a uno o más antibióticos. En una realización, la bacteria es *S. aureus*.

5 En una realización, el método comprende el tratamiento, la prevención o la reducción de la incidencia de una enfermedad o trastorno respiratorio en un sujeto, en el que la enfermedad o trastorno está causado por una infección. Por ejemplo, la infección puede ser provocada por un virus, un hongo, un protozoo, un parásito, un artrópodo o una bacteria, incluida una bacteria que ha desarrollado resistencia a uno o más antibióticos. En algunas realizaciones, la infección es provocada por una bacteria. En otras realizaciones, la infección está provocada por un virus.

10 En una realización, el método comprende el tratamiento, la prevención o la reducción de la incidencia de una infección en un sujeto, incluidas las infecciones provocadas por un virus, un hongo, un protozoo, un parásito, un artrópodo o una bacteria, incluyendo una bacteria que ha desarrollado resistencia a uno o más antibióticos. En algunas realizaciones, la infección es provocada por una bacteria. En una realización, la bacteria es *Acetobacter baumannii*. En otra realización, la bacteria es *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina. En otra realización, la bacteria es *Escherichia coli*. En otras realizaciones, la infección está provocada por un virus. En una realización, el virus es Influenza H1N1. En otras realizaciones, la infección está provocada por un hongo. En una realización, el hongo es *Trichophyton Rubrum*.

20 Ejemplos experimentales

La invención se describe adicionalmente en detalle con referencia a los siguientes ejemplos experimentales. Estos ejemplos se proporcionan únicamente con fines ilustrativos y no pretenden ser limitantes a menos que se especifique lo contrario. Por tanto, la invención no debe interpretarse de ninguna manera como limitada a los siguientes ejemplos, sino que debe interpretarse que abarca todas y cada una de las variaciones que se hacen evidentes como resultado de la enseñanza proporcionada en el presente documento. A menos que se especifique lo contrario, el NORS como se describe en los siguientes experimentos es una solución salina que tiene una concentración de ácido cítrico de aproximadamente 0.2 % y una concentración de nitrito de sodio de aproximadamente 0.41 % (60 mM).

30 Ejemplo 1: Liberación extendida de NO de NORS

A continuación, se describen los materiales y métodos empleados en estos experimentos.

35 Se preparó una solución de NORS con una concentración de nitrito de 0.3 % p/v y pH 3.7. Una vez listo, se sumergió una gasa de 3x3 pulgadas en la solución, se exprimió ligeramente para descartar el exceso de líquido y se colocó en un dispositivo de "Baño Hath" (Figura 1). En diferentes momentos, se midió el NO liberado con un analizador de quimioluminiscencia (NOA 280i, General Electric, CO).

Se describen ahora los resultados de los experimentos.

40 La Figura 2 muestra la cantidad de NO detectada a los 3, 8, 15 min, así como a las 3, 4 (2A) y 24 (2B) horas. La escala X es el TIEMPO (minutos) desde el inicio en el punto de medición (que muestra la cantidad de medición previa como 0-0.1 ppm) y la escala Y muestra la cantidad de NO (medido en ppb).

45 El analizador quimioluminiscente tiene una tasa de extracción de muestra de 200 cc por minuto y, por lo tanto, hay un pico inicial y una reducción en la concentración de NO después de eso. El "Hathback" puede no estar completamente sellado y, por lo tanto, algunos NO pueden "escapar". Sin embargo, la liberación de NO todavía se detectó 24 horas después de que la gasa se saturó con la solución de NORS.

50 Ejemplo 2: Eficacia antibacteriana de NORS sobre *Acetobacter baumannii*, *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina y *Escherichia coli*

Todas las siguientes bacterias son comunes en las infecciones de heridas:

55 *A. baumannii* es una especie de bacteria patógena, conocida como bacteria aerobia gramnegativa, que es resistente a la mayoría de los antibióticos. Se informó que causa infecciones entre los soldados estadounidenses heridos en Irak.

E. coli - bacterias comunes gramnegativas.

60 *S. aureus* es una causa común de infección del sitio quirúrgico. Es un gram positivo y con frecuencia forma parte de la flora cutánea.

Staphylococcus aureus resistente a meticilina - MRSA es, por definición, una bacteria *S. aureus* que ha desarrollado resistencia a antibióticos betalactámicos que incluyen las penicilinas (meticilina, dicloxacilina, nafcilina, oxacilina, etc.) y las cefalosporinas.

65 A continuación, se describen los materiales y métodos empleados en estos experimentos.

Preparación bacteriana

Se obtuvieron cultivos bacterianos de *A. baumannii*, MRSA y *E. coli* de la American Type Culture Collection (ATCC # BAA-747, # 700698 y # 25922). Las bacterias se cultivaron en caldo de lisogenia (LB) (*E. coli* y *A. baumannii*) o caldo de infusión cerebro-corazón (BHI) (MRSA) hasta un estándar de 0.5 McFarland. Se almacenaron a -70 °C alícuotas de 1 ml de esta preparación que contenían aproximadamente 2.5×10^8 ufc/ml. El día de los experimentos, se sacó el stock fresco del congelador, se descongeló y se añadieron 2 ml de LB o BHI. Los cultivos se diluyeron adicionalmente con LB o BHI hasta 10^6 unidades formadoras de colonias por mililitro (ufc/ml).

10 Procedimiento de preparación y prueba de NORS

Se preparó NORS mezclando una concentración específica de nitrito de sodio (0.07-0.41 %) en solución salina y luego reduciendo el pH a 3.7 con ácido cítrico. Los controles fueron: solución salina, nitrito de sodio al 0.41 % y pH de 6, y solución salina a pH 3.7 (reducido con ácido cítrico).

15 Se mezclaron 100 µl de bacterias (10^6 ufc/ml) con 900 µl de NORS. Después de 10 min, las muestras se diluyeron en serie y se colocaron en placas de agar LB o BHI. Los cultivos se incubaron a 37 °C durante la noche (O/N) y luego se contaron los ufc para cuantificar el crecimiento bacteriano. Cada experimento se realizó por triplicado y cada experimento se repitió tres veces.

20 Se describen ahora los resultados de los experimentos.

Se probaron NORS compuestas por ácido cítrico y cada una con una concentración diferente de nitritos en solución salina en 3 especies de bacterias diferentes (*A. baumannii*, MRSA y *E. coli*) a un tiempo de exposición de 10 min con el fin de evaluar la eficacia antibacteriana de la NORS. Los nitritos al 0.41 % a pH 3.7 (ácido cítrico al 0.2 % p/v) dieron como resultado la erradicación completa de las tres bacterias (Figura 3 y 4).

Ejemplo 3: Eficacia antibacteriana de NORS sobre *Mannheimia haemolytica*

30 El principal patógeno bacteriano de BRDc es *M. haemolytica*, que produce una potente leucotoxina que es su principal factor de virulencia. En este estudio, se probó el efecto de NORS sobre bacterias asociadas con infecciones respiratorias bovinas para demostrar la eficacia global de la presente invención contra enfermedades que también se encuentran en otras especies de mamíferos.

35 A continuación, se describen los materiales y métodos empleados en estos experimentos.

Preparación bacteriana

40 Se aislaron cultivos bacterianos de *M. haemolytica* y se obtuvieron del Centro de Investigación de Agricultura y Agroalimentación de Canadá (Lethbridge, Canadá). Las bacterias se cultivaron hasta el estándar 0.5 de McFarland. Se almacenaron a -80 °C alícuotas de 1 ml de estas preparaciones que contenían aproximadamente 2.5×10^8 ufc/ml. El día de los experimentos, se retiró el stock fresco del congelador, se descongeló y se añadieron 2 ml de BHI. Los cultivos se diluyeron adicionalmente con BHI para lograr una DO_{600} de 0.1. Se utilizaron dos serotipos diferentes de *M. haemolytica*. Estos serotipos se aislaron originalmente de hisopos nasofaríngeos bovinos y posteriormente se confirmaron mediante ensayos bioquímicos y de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) como *M. haemolytica* (Klima et al., 2011, Vet. Microbiol. 149: 390-398). Fueron serotipados en laboratorio, frente a sueros de referencia, que se generaron en conejos.

Efecto antibacteriano de NORS sobre *M. haemolytica*

50 Se ensayó la eficacia de NORS a diferentes concentraciones contra los serotipos de *M. haemolytica*. Se utilizó solución salina como control. Se añadió NORS (900 µl) a tubos Eppendorf estériles separados. A continuación, se añadieron a cada tubo cien µl de cultivo que contenía cada serotipo a 10^6 UFC/ml (DO_{600} 0.1) y se incubaron durante 30 segundos, 1, 2, 5 y 10 minutos. Después de la incubación, las muestras de cada tubo se diluyeron en serie y se sembraron en placas de oveja con agar sangre y BHI. Las placas se incubaron a 37 °C durante la noche (O/N). Cada experimento se realizó por triplicado y cada experimento se repitió tres veces.

55 Se describen ahora los resultados de los experimentos.

Se observó que el uso de NORS, incluso durante 0.5 min, dio como resultado una inhibición significativa ($P < 0.05$) de *M. haemolytica*, en comparación con el control. El uso de NORS durante 1 minuto provocó la erradicación completa de un serotipo de esta bacteria y 2 minutos para ambos serotipos (Figura 5). Ambos serotipos que se utilizaron aquí son aislados de ganado de corral de engorde.

65

Ejemplo 4: Eficacia antiviral de NORS sobre H1N1

Durante siglos, la influenza ha afectado a la salud humana tanto estacionalmente como con pandemias recurrentes. A pesar de la reducción significativa de la carga de morbilidad a través de los esfuerzos de vacunación, la circulación del virus de la influenza A estacional causa un exceso de morbilidad y mortalidad, particularmente en pacientes con afecciones pulmonares preexistentes.

5 A continuación, se describen los materiales y métodos empleados en estos experimentos.

Estirpes celulares y virus

10 Se obtuvieron células epiteliales de riñón canino Madin-Darby (MDCK) (ATCC CCL-34) de la American Type Culture Collection y se mantuvieron en medio esencial mínimo de Dulbecco (DMEM) suplementado con suero bovino fetal (FBS) al 5 % y se incubaron a 37 °C en atmósfera humidificada con 5 % de CO₂ sin antibióticos ni agentes antimicóticos. Las células MDCK se cultivaron como monocapas en matraces de cultivo celular de 75 cm². Para estos experimentos se utilizaron pasajes entre 3 y 15.

15 La cepa viral se obtuvo del stock de laboratorio del Centro para el Control de Enfermedades de la Columbia Británica. Se cultivaron reservas de virus de influenza A, A/Denver/1/1957 (H1N1) en MDCK durante 48 horas, con medio que contenía 2 µg/ml de tripsina modificada (tratada con TPCK) sin suero. El virus madre se preparó como sobrenadantes libres de células clarificados. La concentración de virus para las reservas se determinó mediante un ensayo de placa estándar en células MDCK [27]. El título de virus para esta solución madre fue de 6 x 10⁶ unidades formadoras de placa (UFP)/ml, respectivamente.

Protocolo experimental

25 Se colocaron alícuotas de virus, diluidas en solución tampón de fosfato (PBS), generalmente 20 µl, sobre la superficie de vidrio estéril apropiada, se extendieron en una película por medio de una punta estéril y se dejaron secar dentro de una cabina de bioseguridad (normalmente 15-20 min). Cada muestra recibió 2 pulverizaciones (100 µl) de diferente concentración de NORS (0.007-0.14 % p/v) a pH 3.7. Los controles consistieron en muestras equivalentes rociadas solo con solución salina, nitritos (0.14 % a pH 6) y solución salina a pH 3.7. Después de 5 min, todas las muestras y las muestras de control equivalentes se reconstituyeron en 1.0 ml de PBS y se ensayaron mediante la formación de placa (unidades formadoras de placa, ufp) en las células apropiadas.

Se describen ahora los resultados de los experimentos.

35 Los NORS compuestos por ácido cítrico y cada uno con una concentración diferente de nitritos en solución salina se probaron en Influenza H1N1 con el fin de evaluar la eficacia antiviral de los NORS. Una concentración de 0.07 % p/v de nitritos a pH 3.7 (0.08 % p/v de ácido cítrico) resultó en una reducción de más del 90 % (Figuras 6 y 7A), mientras que 0.14 % causó la erradicación completa del virus (Figura 6 y 7B).

Ejemplo 5: Efecto antiviral de NORS sobre la rinotraqueítis infecciosa bovina, el virus sincitial respiratorio bovino y la parainfluenza-3 bovina

45 Está claro que, en el ganado, como en los seres humanos y otras especies de mamíferos, una infección viral activa aumenta drásticamente la susceptibilidad a contraer neumonía bacteriana (Bedling y Slifka, 2004). Esto se ha demostrado experimentalmente en bovinos infectados con cualquiera de varios virus respiratorios bovinos, como el virus del herpes bovino 1 (BHV-1) o el virus sincitial respiratorio bovino (BRSV), después de lo cual hace que el ganado sea altamente susceptible a una infección bacteriana secundaria cuando se enfrenta a *M. haemolytica* (Hodgson et al., 2005; Yates 1982). Estas observaciones sugieren que la infección viral altera los mecanismos de defensa del huésped contra *M. haemolytica* o amplifica aspectos indeseables de la respuesta del huésped a este patógeno bacteriano. En este ejemplo, se probó el efecto de NORS sobre 3 virus relacionados con infecciones respiratorias bovinas.

A continuación, se describen los materiales y métodos empleados en estos experimentos.

Células y virus

55 Se cultivaron células de riñón bovino Madin-Darby (MDBK) (ATCC CCL 22) en medio esencial mínimo de Eagle (MEM) que contenía suero bovino fetal al 10 %. A lo largo de los experimentos se utilizaron rinotraqueítis infecciosa bovina (IBR), virus sincitial respiratorio bovino (BRSV) y parainfluenza-3 bovina (PI-3). Estos virus se propagaron en células MDBK en medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) suplementado con suero bovino fetal al 2 % y se almacenaron a -80 °C hasta su uso. La cantidad de virus se midió mediante un ensayo de placa en células MDBK.

Actividad virucida directa de NORS

65 Se ensayó la actividad virucida usando volúmenes iguales (0.025 ml) de suspensión de virus, que contenían de 10³ a 10⁷ unidades formadoras de placa (PFU/ml) de cada uno de los 3 virus y NORS. Los dos volúmenes se mezclaron y se

incubaron durante 1 o 10 minutos a temperatura ambiente. Los virus se diluyeron con PBS que contenía suero bovino fetal (FBS) al 2 % y se midió el número de virus infecciosos en cada preparación mediante un ensayo de placa.

Se describen ahora los resultados de los experimentos.

IBR es el virus más susceptible a NORS, con una erradicación completa con todos los títulos iniciales después de 10 min de exposición y una reducción significativa ($P < 0.05$) para todos los títulos después de 1 min (Figura 8A). PI3 fue un poco menos susceptible, pero se observó una reducción significativa en la viabilidad en todos los títulos, tanto después de 1 como de 10 minutos (Figura 8C). El virus menos susceptible fue BRSV, donde no se observaron diferencias significativas después de 1 min de exposición, aunque se observó una reducción significativa ($P < 0.05$) en la viabilidad después de 10 min de exposición en todos los títulos (Figura 8B). Se encontró que la capacidad de NORS para erradicar el virus estaba en correlación directa con el título inicial.

Ejemplo 6: Eficacia antifúngica de NORS

La mayoría de las infecciones cutáneas son obra del grupo homogéneo de hongos queratinofílicos conocidos como dermatofitos. La tiña del pie, conocida como pie de atleta, es la forma más prevalente de infecciones micóticas superficiales del (Drake et al., 1996). Las especies del género *Trichophyton* se aíslan más comúnmente a partir de muestras clínicas, siendo *Trichophyton rubrum* y *Trichophyton mentagrophytes* las más comunes (Drake et al., 1996; Baran y Kaukhov, 2005).

Artículo publicado - Regev-Shoshani et al., 2013, J. Appl. Microbio. 114: 536-544

A continuación, se describen los materiales y métodos empleados en estos experimentos.

Preparación de hongos.

Trichophyton rubrum (18758) y *Trichophyton mentagrophytes* (114841) se obtuvieron de la American Type Culture Collection (ATCC). Los hongos se cultivaron a 30 °C en caldo Sabouraud (SAB) durante tres días hasta una biomasa micelial de 1 mg/ml. Se realizaron experimentos de viabilidad micelial con esta concentración. Los conidios se aislaron agitando (en un agitador Fisher a 100 RPM) perlas de vidrio (Soda Lime 2 mm, VWR) durante 60 segundos en la superficie de micelios cultivados en placas de agar SAB durante un mínimo de siete días. Se agitaron con vórtex perlas de vidrio cubiertas con conidios en solución salina estéril para suspender los conidios en solución.

Elaboración de NORS.

Se prepararon soluciones de liberación de óxido nítrico (NORS) utilizando nitrito de sodio y ácido cítrico, como se describió previamente. Específicamente, esto se hizo disolviendo nitrito de sodio sólido (NaNO_2) en agua destilada estéril (dH_2O) para alcanzar una concentración final de 0.007-0.14 % p/v. Luego, esas soluciones se acidificaron a pH 3.7 usando una masa predeterminada de ácido cítrico (hasta 0.1 %).

Efecto antifúngico de NORS sobre la viabilidad micelial de *T. rubrum* y *T. mentagrophytes*.

NORS que contienen NaNO_2 en concentración se ensayaron s de 0.007, 0.14, 0.35, 0.7 % p/v para determinar su eficacia como agentes antifúngicos. Se usó agua estéril (pH 6) como control. También se analizaron agua estéril ajustada a pH 3.7 usando ácido cítrico y agua estéril con 0.14 % de NaNO_2 (pH 6) para determinar si alguna de las soluciones poseía un efecto fungicida por sí mismas. Se preparó NORS (4 ml) y se añadió a tubos de plástico estériles separados de 5 ml. A continuación, se añadieron a cada tubo cien μl de cultivo que contenía micelios a una biomasa de 1 mg/ml y se incubaron durante 10, 20 y 30 minutos. Después de la incubación, las muestras de cada tubo se diluyeron en serie y se sembraron en placas de agar SAB. Las placas se incubaron a 30 °C hasta que se pudo detectar y contar el crecimiento (aproximadamente 3 días para *T. rubrum* y 2 días para *T. mentagrophytes*). Cada experimento se realizó por triplicado y se repitió tres veces.

Se realizó una serie de experimentos de control para eliminar el efecto antifúngico potencial de la concentración de ácido cítrico en la solución de tratamiento. Se prepararon diferentes concentraciones de ácido cítrico y se elevó el pH a 3.7 usando NaOH. Se utilizaron las mismas metodologías experimentales con agua como control para realizar estas pruebas.

Óxidos gaseosos de nitrógeno producidos a partir de NORS y su efecto sobre el crecimiento micelial.

La concentración de NO y otros gases liberados de los NORS en el espacio libre se determinó mediante cromatografía de gases con un detector de espectrómetro de masas (GC-MS). Se preparó NORS (nitritos al 0.14 % p/v) dentro de los tubos de plástico estériles de 5 ml descritos anteriormente. A continuación, se selló cada tubo durante 30 minutos, después de lo cual se analizó por GC-MS 1 ml del espacio libre por encima de la solución. El análisis de GC-MS (cromatógrafo de gases Varian™ CP-3800 conectado a una EM cuadrupolo Varian™ 1200) se realizó utilizando un método estándar que se había creado y calibrado previamente para separar y cuantificar moléculas de NO, NO_2 y N_2O , utilizando gases de

calibración. El método se estableció a una temperatura constante de 31 °C con un caudal de muestreo de 1 ml/min con gas helio como gas portador. La temperatura del inyector se fijó en 120 °C.

5 Para demostrar que el NO, que se encuentra en el espacio libre, es responsable del efecto fungicida de NORS, se combinaron micelios de *T. mentagrophytes* (10 ml a 1 mg/ml) con 20 ml de solución salina estéril dentro de un tubo de ensayo de vidrio estéril conectado mediante un tubo de teflón a un aparato de vidrio separado, como se ilustra en la figura 9. Se usó solución salina estéril (cloruro de sodio al 0.9 %) en reemplazo de dH₂O estéril para asegurar que cualquier actividad fungicida medida no fuera el resultado de desequilibrios osmóticos. Se añadió NORS al aparato de vidrio utilizando una jeringa de 50 ml a través del “puerto de llenado” (Figura 9) y luego se selló con una película de laboratorio de parafina y una envoltura de plástico. Se requirió una NORS de mayor concentración para producir un volumen suficiente de gas para tener en cuenta el volumen de espacio libre mucho mayor en el aparato en comparación con los tubos de 10 de 5 ml descritos anteriormente. Luego, el aparato se dejó a temperatura ambiente durante 2, 4, 8, 16 y 24 horas (cada una por separado), después de lo cual, las muestras del tubo de ensayo de vidrio se sembraron en placas de agar SAB, se incubaron a 30 °C durante 48 horas y se determinó la viabilidad fúngica. El crecimiento del tubo de ensayo expuesto se comparó con un control del mismo contenido que se mantuvo junto con la exposición en un tubo de ensayo de vidrio sellado (Figura 9). Otro estudio de control se realizó con el mismo aparato, utilizando solución salina en lugar de NORS. La concentración de nitrito en el tubo de ensayo de vidrio adjunto se midió después de cada punto de tiempo, usando reactivo de Griess (Green et al. 1982).

20 Se describen ahora los resultados de los experimentos.

Efecto antifúngico de NORS sobre la viabilidad micelial de *T. rubrum* y *T. mentagrophytes*.

25 Se cultivaron *T. rubrum* y *T. mentagrophytes* a partir de conidios durante un mínimo de 72 horas hasta una biomasa micelial de 1 mg/ml. El micelio se añadió a los tubos de tratamiento o control y se incubó durante hasta 30 minutos, después de lo cual, las muestras se sembraron en placas y se determinó la concentración (ufc/ml). Como NORS está formulado a partir de nitritos y ácido cítrico (reduciendo el pH a 3.7), se probó el efecto de exposición individual del agua a pH 3.7 y nitritos al 0.14 % p/v a pH 6 y se comparó con un control apropiado. Se detectó un efecto mínimo o nulo después de una exposición de 30 minutos con nitrito de sodio al 0.14 % (pH 6) o ácido cítrico a pH 3.7.

30 La Figura 10 muestra la viabilidad de los micelios después de la exposición como porcentaje del control. *T. mentagrophytes* (Fig. 10A) y *T. rubrum* (Fig 10B) demostraron respuestas similares a diferentes concentraciones de NORS. Ambas especies fueron tolerantes hasta un 0.014 % p/v de nitrito a un pH de 3.7 durante un máximo de 20 minutos, lo que demuestra una reducción de menos del 25 %. Mientras que el uso de una concentración más alta de nitrito al 0.035 % p/v a pH 3.7 produjo un efecto fungicida dependiente del tiempo a partir de una reducción significativa del 25 % después de 10 minutos y alcanzando una reducción del 98 % después de 30 minutos para ambas especies. Un aumento al 0.7 % p/v de nitrito y al 0.08 % p/v de ácido cítrico fue muy eficaz para erradicar el micelio, lo que resultó en una reducción superior al 99 % a los 10 minutos y una destrucción completa a los 30 minutos para *T. mentagrophytes* y una destrucción completa en todos los puntos de tiempo para el *T. rubrum*. Como era de esperar, una concentración de nitrito de 0.14 % p/v a pH 3.7 mostró una destrucción completa, incluso después de 10 minutos, para ambos organismos (no se muestra en el gráfico).

Los controles con ácido cítrico a pH 3.7 y nitritos solos no tuvieron un efecto significativo sobre el crecimiento micelial en comparación con el control de agua.

45 Análisis de gases del espacio libre por encima de NORS mediante GC-MS.

Se analizó una muestra de espacio libre del tubo (que contenía 4 ml de NORS al 0.14 %) después de 20 minutos mediante GC-MS para determinar qué moléculas gaseosas podían detectarse. Se estableció una detección específica para identificar NO, NO₂, N₂O y CO₂ y se determinaron sus respectivas concentraciones. Como lo revela el cromatograma de la figura 11A, se detectaron tres tipos de moléculas de gas (excluyendo el vapor de agua, no mostrado). NO eluyó a los 5.4 minutos, NO₂ a 5.98 y CO₂ eluyó a los 6.03 minutos. No se detectaron otros picos en un programa de exploración para MW 18-100. La Figura 11B muestra el peso molecular de 30 para el pico a los 5.4 minutos, que se correlaciona con el NO. Se encontró que la concentración de NO era 170 (± 30) ppm; El NO₂ fue 40 (± 10) ppm. También se encontró CO₂ (procedente del aire ambiente), pero no se cuantificó. No se detectó N₂O. A modo de comparación, el espacio libre de un tubo de control solo tenía niveles ambientales de CO₂ presentes.

60 Para demostrar que el NO producido por los NORS es probablemente el agente activo responsable de la actividad antifúngica observada, se construyó un aparato para garantizar que no se produjera ningún contacto directo entre el micelio fúngico y los NORS, permitiendo solo el intercambio de gases del espacio libre (Figura 9). La actividad antifúngica de los gases del espacio libre NORS se evaluó en micelios de *T. mentagrophytes* a 1 mg/ml. Tanto la viabilidad micelial como las concentraciones de nitrito se midieron después de 2, 4, 8, 16 y 24 horas. La Figura 12 ilustra la actividad antifúngica de los gases NORS durante un período de 24 horas. Se observó cierto efecto antifúngico después de 4 y 8 horas de exposición, donde se observó una reducción de un log₁₀ en la viabilidad micelial. La muerte completa resultó después de 16 horas de exposición. Los controles de micelios no mostraron cambios significativos en la concentración durante estos períodos de tiempo. Se demostró que las concentraciones de nitrito se correlacionan inversamente con la

viabilidad micelial. Después de 16 horas, cuando se alcanzó la destrucción completa de los micelios, se midió una concentración de nitrito de 0.014 % p/v. Los controles de micelios mostraron concentraciones de nitrito insignificantes. Cuando se usó solución salina en el aparato, en lugar de NORS, no se encontró muerte micelial y no se encontró NO en el espacio libre.

5

Ejemplo 7: El tratamiento profiláctico con óxido nítrico reduce la incidencia del complejo de enfermedades respiratorias bovinas en el ganado vacuno que llega a un corral de engorde

10

En una demostración adicional de la eficacia global de la presente invención para combatir también enfermedades similares en especies de mamíferos, los resultados descritos en el presente documento demuestran que el tratamiento con NO al llegar al corral de engorde disminuyó significativamente la incidencia de BRDc en el ganado vacuno. Se monitorizaron ochenta y cinco terneros de carne de res destetados comerciales mezclados, de origen múltiple y de origen cruzado, y se les evaluó la temperatura, el recuento de glóbulos blancos, la puntuación clínica, la hematología, los niveles de cortisol y la proporción de neutrófilos/linfocitos. El tratamiento con NO o placebo se administró una vez a la llegada al corral. Después de una semana, el 87.5 % de los animales enfermos eran del control, mientras que el 12,5 % eran de los grupos de tratamiento, y después de dos semanas el 72 % y el 28 % respectivamente. Se demostró que el tratamiento es seguro y no causa angustia ni efectos adversos en los animales.

15

Se describen ahora los materiales y métodos empleados en estos experimentos.

20

Animales y manejo

25

Para estos estudios se obtuvieron ochenta y cinco terneros de carne de vacuno destetados comerciales, cruzados, de origen múltiple, mezclados. Todos los estudios se realizaron en las instalaciones de investigación de carne de vacuno del Centro de Investigación Lacombe y todas las prácticas de manejo siguieron las pautas del Consejo Canadiense de Cuidado Animal (Canadian Council on Animal Care, 1993) y las pautas del Código de prácticas canadiense para el ganado vacuno (Agriculture Canada, 1991). Además, los protocolos de investigación fueron revisados y aprobados por el comité de cuidado de animales del Centro de Investigación Lacombe. Los terneros se obtuvieron a través de un sistema de subasta convencional y todos los animales habían estado expuestos a entre 4 y 6 h de transporte antes del estudio. Estos terneros fueron elegidos para proporcionar grupos de estudio que muestran un rango de incidencia de BRDc de 30-60 % que es típico de la industria de la carne de res en Canadá para estos rebaños de ganado "juntos". A su llegada a Lacombe, los terneros se descargaron, se pesaron y se tomaron muestras de saliva y sangre utilizando los procedimientos descritos anteriormente (Schaefer et al., 2012, Virulence 3: 271-279).

30

35

Los terneros se distribuyeron aleatoriamente en grupos de tratamiento y de control, se marcaron con etiquetas y números en las orejas codificadas por colores. A continuación, los animales se colocaron en corrales al aire libre que medían aproximadamente 60 x 60 metros y se alimentaron en literas ad libitum con una dieta equilibrada de ensilado de cereales, que cumplía o excedía las recomendaciones del Consejo Nacional de Investigación (NRC, 1984, Nutrient Requirements of Beef Cattle, 6th ed. National Academy Press, Washington DC). Los animales también tenían acceso libre al agua y se les proporcionó un área de cama de paja con una cubierta para el techo.

40

Puntuaciones clínicas

45

Mientras estaban contenidos en sus corrales de recepción, los terneros fueron monitoreados diariamente por personal capacitado, que estaba cegado en cuanto a las intervenciones de tratamiento, para detectar signos clínicos de enfermedad usando métodos descritos anteriormente (Schaefer et al., 2007, Res. Vet. Sci. 83: 376-384). Brevemente, las puntuaciones clínicas se diseñaron para identificar BRDc y se basaron en la aparición de cuatro criterios de la siguiente manera:

50

Ataque respiratorio: (0-5): 0 = sin ataque, ruidos respiratorios normales (NBS); 1 = Crujido muy fino (estertores) (VFCR) a la auscultación y/o tos moderada; 2 = Crepitación fina (subcrepitante) (FCR) a la auscultación y/o secreción nasal moderada y tos moderada; 3 = Crepitación media (crepitante) (MCR) en la auscultación y/o secreción nasal viscosa de moderada a grave con tos; 4 = Crepitación áspera (CCR), taquipnea (> 15 % de la norma) y/o una secreción nasal severa con dificultad respiratoria y sonidos pulmonares obnubilados y 5 = CCR con disnea, taquipnea, dificultad respiratoria marcada y/o consolidación pulmonar.

55

Ataque digestivo: (0-5): 0 = sin ataque, normal, comiendo y bebiendo; 1 = diarrea leve o ligera con deshidratación leve (<5 %) y reducción de la ingesta; 2 = diarrea moderada con 10 % de deshidratación y consumo reducido de alimento (<50 %); 3 = diarrea moderada a severa con 10 % o menos de ingesta de alimento y más del 10 % de deshidratación; 4 = diarrea severa y menos del 10 % de la ingesta normal de alimento y 5 = diarrea severa y no comer, no beber y estar deshidratado.

60

Puntuación de temperatura: temperatura central (rectal) (0-5): 0 = <37.7 °C; 1 = 37.7-38,2 °C; 2 = 38.3-38.8 °C; 3 = 38.9-39.4 °C; 4 = 39.5-40.0 °C y 5 => 40 °C. Las temperaturas rectales o centrales de los terneros se recogieron al comienzo y al final del estudio solo porque eran los momentos en que los animales estaban inmobilizados. Puntuación de disposición o letargo: (0-5): 0 = sin letargo, postura normal; 1 = anorexia leve o apatía, apariencia deprimida; 2 = letargo y depresión

65

moderados, lento para subir, anoréxico; 3 = postura recostada o anormal, en gran parte deprimida; 4 = postura postrada, recostada o anormal y 5 = muerte.

Análisis de laboratorio

5

Con respecto al análisis de laboratorio, se analizaron los niveles de cortisol sérico y salival usando un ensayo enzimático descrito previamente (Cook et al., 1997, *J. Ag. Food Chem.* 45: 395-399).

Hematología

10

Los valores hematológicos se midieron en un analizador hematológico Cell-Dyn 700 (Sequoia - Turner Corp. Mountain View, CA). Se determinaron los recuentos diferenciales de células sanguíneas utilizando frotis de sangre teñidos (tinción rápida Geisma-Wright) y examen microscópico directo de 100 células.

15

Tratamiento de rescate clínico

20

Los animales que mostraban síntomas clínicos evidentes de BRDc identificados por un cuidador de corrales cegado fueron rescatados y posteriormente recibieron el tratamiento inmediato recomendado por el veterinario del Centro de Investigación Lacombe seguido de un seguimiento continuo y un nuevo tratamiento si fuera necesario. Estos animales se clasificaron como verdaderos positivos (TP) en el análisis estadístico.

Tratamiento de óxido nítrico

25

Se suministró NORS con un dispositivo de pulverización. El NORS es una solución salina que tiene una concentración de ácido cítrico de aproximadamente 0.2 % p/v y una concentración de nitrito de sodio de 0.41 % p/v. Esta solución fue previamente probada y verificada para liberar 160 ppm de NO en un flujo de aire medicinal de 3 l/m (Praxair, Canadá), durante 30 min. En resumen, se rociaron 32 ml de la solución en un tubo de cloruro de vinilo de dos pulgadas de diámetro y se insertaron en un sistema ambientalmente controlado (como describieron anteriormente Ghaffari et al., 2005) donde se midió el NO usando quimioluminiscencia (Analizador de óxido nítrico Sievers NOA 280i). Los animales fueron inmovilizados en un agarre hidráulico convencional para manejo de ganado y recibieron un placebo (solución salina) o un tratamiento (NO) por un individuo cegado en cuanto a la intervención. Cada animal recibió 1 pulverización (8 ml), alternando en cada fosa nasal, dos veces, para un total de 32 ml antes de ser liberado en las áreas de corral del lote de alimentación. La duración de la administración del tratamiento fue inferior a 5 segundos.

30

35

Determinación de animales verdaderos positivos (TP) y verdaderos negativos (TN) para el complejo de enfermedades respiratorias bovinas (BRDc)

40

La determinación de un animal verdadero positivo o negativo para BRDc se basó en la comparación con un conjunto de valores "estándar de oro" utilizando un método publicado previamente (Humblet et al., 2004, *Res. Vet. Sci.* 77:41 -47; Schaefer et al., 2007, *Res. Vet. Sci.* 83: 376-384). Este enfoque se promueve comúnmente en estudios de diagnóstico médico veterinario y humano (Galen y Gambino, 1975, *Beyond Normality*. J. Wiley and Sons, NY; Thrusfield, 1995, *Diagnostic testing*, p. 266-285, *Veterinary Epidemiology*, 2nd ed. Blackwell Sci. Ltd., Oxford).

45

En el estudio actual, el criterio para un animal verdaderamente positivo para BRDc se definió como un animal que muestra tres o más de los siguientes signos; una temperatura central de > 40 °C (o 103.5 °F), un recuento de glóbulos blancos de menos de 7 o mayor de 11 x 1000/L, una puntuación clínica de > 3 o una proporción de neutrófilos/linfocitos de <0.1 (leucopenia) o > 0.8 (neutrofilia). Un animal negativo verdadero se definió como un animal que mostraba una puntuación de 0 o 1. Estos parámetros se consideraron consistentes con los rangos normales y anormales sugeridos (Kaneko, 1980, *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*, Academic Press, NY; Blood et al., 1983, *Medicina Veterinaria*, 6ª ed., Communications Branch, Agriculture Canada). Para las evaluaciones de laboratorio, todos los terneros fueron monitoreados al comienzo del estudio y nuevamente de tres a cuatro semanas después.

50

Se describen ahora los resultados de los experimentos.

55

Seguridad del tratamiento con NO

60

Todos los animales toleraron bien los tratamientos con óxido nítrico. Algunos de los animales estornudaron, pero ninguno mostró tos u otros signos clínicos de angustia. No se observaron eventos adversos ni eventos adversos graves en ninguna de las cohortes. Ningún animal murió durante el tiempo del estudio. Los niveles medios de salival y cortisol fueron equivalentes en cada grupo (Control 5.4 ± 5.7 nmol/l; Tratamiento 6.66 ± 5.5 nmol/l) sin diferencias significativas (p = 0.09).

Disminución de la incidencia de BRDc

65

Como puede verse en la Tabla 1, durante los días 1-14, 13 animales del grupo de control y 5 animales del grupo de tratamiento se identificaron como TP. La tabla muestra los valores registrados para los 4 parámetros que determinan

TP/TN para todos los animales TP. También se incluyeron la temperatura, la puntuación clínica, el recuento de leucocitos, la proporción de neutrófilos/linfocitos. Todos los animales enfermos tenían 3 o 4 parámetros registrados por debajo o por encima del valor de definición de TP. Este enfoque de puntuación proporciona una definición más sólida de animales enfermos en comparación con mirar solo un umbral de temperatura. Todos los animales tenían puntuaciones clínicas superiores a 3 y en 15 de los 18 animales se registró una temperatura de 103.5 °F o superior. Trece de los 18 animales TP también fueron reconocidos por el encargado del corral como enfermos.

Tabla 1: Parámetros que determinan TP/TN

		Día de s	Temp. (°F)		WRC		
Control	1	14	104.2	8	9.58	0.027	Y
	2	14	103.8	4	11.1	0.121	Y
	3	14	103.5	5	5.37	0.139	Y
	4	7	105.2	8	6.38	0.721	Y
	5	2	104.1	8	7.97	0.092	Y
	6	4	105.8	7	2.72	0.882	Y
	7	10	104.5	8	11.15	1.136	Y
	8	9	103.5	7	6.61	0.089	Y
	9	7	103.1	4	6.53	0.023	N
	10	7	103.1	4	10.95	0.037	N
	11	7	103.5	5	7.56	0.077	N
	12	7	103.4	5	5.99	0.082	N
	13	8	105.6	9	4.67	0.878	Y
Tratamiento	1	14	103.5	5	6.7	0.556	N
	2	6	105.2	8	12.15	1.058	Y
	3	8	104.2	10	6.57	1.537	Y
	4	11	105.4	9	11.25	0.877	Y
	5	8	104.6	8	6.72	0.181	Y

Los valores registrados para los 4 parámetros que determinan TP/TN para todos los animales enfermos en ambos grupos durante las primeras 2 semanas después de la llegada al corral de engorde (los indicadores de TP están resaltados).

La tabla incluye el día de la enfermedad registrada y si el pastor sacó al animal.

En términos de una incidencia de BRDc en este modelo, de estos 82 terneros evaluados, después de 7 días luego de la llegada, 8 mostraron un verdadero positivo para BRDc (10 %). Como se muestra en la Figura 13A, 7 animales (17.5 %) de los 40 del grupo de control y 1 (2.4 %) de los 42 del grupo tratado con NO se identificaron como TP en la primera semana. De estos 8 animales, uno (12.5 %) era del grupo tratado con NO y siete (87.5 %) eran del grupo de control con solución salina (Figura 13B). Estos resultados demuestran una reducción muy significativa de la incidencia de BRDc entre las cohortes de tratamiento y control con un solo tratamiento NORS al llegar al corral ($p < 0.001$). Durante los primeros 14 días, 18 animales (22 %) tuvieron una incidencia de BRDc y de estos 13 (72.2 %) estaban en el grupo de control, mientras que solo 5 (27.8 %) estaban en la cohorte de tratamiento (Figura 13B).

Estos datos, recopilados de tres estudios aleatorios y ciegos separados realizados en un corral de engorde convencional, muestran que el NO disminuyó significativamente la incidencia de BRDc, según lo definido por el rigor positivo verdadero, en una diferencia del 75 % en comparación con un placebo de solución salina (El 87.5 % de los animales enfermos pertenecían al grupo de control frente al 12.5 % del grupo de tratamiento).

Ejemplo 8: Biodisponibilidad de óxido nítrico para controlar el complejo de enfermedades respiratorias bovinas en terneros que ingresan a un corral de engorde

Los resultados descritos aquí demuestran que la administración de NORS a la fosa nasal de un bovino está disponible biológicamente. Trece terneros de carne de vacuno destetados comerciales, cruzados, de múltiples fuentes, mezclados, fueron tratados varias veces por vía intranasal durante un período de 4 semanas con una solución liberadora de óxido nítrico (tratamiento) o con solución salina (control). El NO exhalado, el porcentaje de metahemoglobina (MetHb) y los nitritos séricos demostraron disponibilidad biológica como resultado del tratamiento.

Se describen ahora los materiales y métodos empleados en estos experimentos.

Animales y manejo

El estudio se realizó en una instalación de corral de engorde registrada comercialmente en el oeste de Canadá (Westwold, Columbia Británica). Todas las prácticas de manejo siguieron las pautas del Consejo Canadiense de Cuidado Animal (Canadian Council on Animal Care, 1993) y las pautas del Código de Prácticas del Ganado de Carne de Canadá (Agriculture Canada, 1991). Además, los protocolos de investigación se adhieron al Certificado de Estudio Experimental aprobado por la Health Canada Veterinary Drug Directorate y el Health Canada Veterinary Drug Directorate and the Thompson Rivers University animal care committee.

Se adquirieron trece terneros de carne de vacuno destetados comerciales, cruzados, de múltiples fuentes, mezclados, a través de un sistema de subasta convencional. Todos los animales fueron expuestos a aproximadamente 4-6 horas de transporte antes del estudio. Estos terneros fueron elegidos para proporcionar grupos de estudio que muestran un rango de incidencia de BRDC de 30-60 %, que es típico de la industria de la carne de res en Canadá para este tipo de población de ganado. Al llegar al corral de engorde, los terneros se descargaron, se asignaron al azar en una de las tres cohortes, se les colocaron marcas en las orejas y se vacunaron (Bovi-Shield® GOLD FP™ 5; Pfizer, INFORCE™ 3; Pfizer, Mannheimia Haemolítica Bacterin-Toxoid; Pfizer) y pesaron.

Los terneros consistieron en 3 grupos de la siguiente manera: 1) Grupo de control - recibió solución salina como placebo (n = 4), 2) Grupo de tratamiento - 2 pulverizaciones de tratamiento con NO en cada fosa nasal - 32 ml en total (n = 5) y 3) Grupo de tratamiento con 5 veces la dosis normal de tratamiento con NO de 160 ml en total en cada tratamiento. Todos los grupos fueron tratados con NO al llegar aproximadamente 2 minutos después de administrar las vacunas. A continuación, los animales se colocaron en 2 corrales al aire libre, se separaron en grupos de control o de tratamiento. Fueron alimentados con heno picado, granos de cribado de granos, junto con ensilado de alfalfa/pasto y cebada para proporcionar una ración completa que cumplía o excedía las recomendaciones del Consejo Nacional de Investigación (NRC, 1984). Los animales también tenían acceso libre al agua y se les proporcionó lecho de aserrín.

25 Tratamiento de óxido nítrico

Se preparó una solución de liberación de óxido nítrico (NORS) en un dispositivo de pulverización de 5 l, que contenía 2 l de NORS. El NORS es una solución salina que tiene una concentración de ácido cítrico de aproximadamente 0.2 % y una concentración de nitrito de sodio de aproximadamente 0.41 % (60 mM). La solución se preparó en el lugar justo antes de la administración. Esta solución se probó previamente para liberar 160 ppm de NO en un flujo de gas de 3 l/min, como se verificó mediante análisis de quimioluminiscencia (280i, General Electric, CO). Los animales fueron inmovilizados brevemente en una caja hidráulica convencional para manipulación de ganado y un asistente de investigación capacitado les dio solución salina o NORS. Cada animal en los grupos de dosificación de control y tratamiento normal recibió 1 aerosol (8 ml), alternando en cada fosa nasal, para un total de 32 ml de cualquiera de las intervenciones antes de ser liberado en las áreas de corral del lote de alimentación. Cada animal del segundo grupo de dosificación recibió 5 veces el volumen de dosificación descrito anteriormente, para un total de 160 ml. Los animales recibieron estos tratamientos semanalmente durante cuatro semanas consecutivas.

40 Análisis de laboratorio

Se recogieron muestras de sangre el día 14. Un veterinario autorizado recogió sangre mediante venopunción yugular antes del tratamiento, 5 minutos después del tratamiento y 30 minutos después de las intervenciones del tratamiento. Cada muestra se colocó en uno de los 3 tubos de recolección preparados adecuadamente, uno para cada medición: cortisol, porcentaje de metahemoglobina (MetHb) y nitritos. El cortisol sérico fue analizado por Kamloops Large Animal Veterinary Clinic LTD. (1465 Cariboo Place, Kamloops, BC V2C 5Z3). Todas las muestras de sangre se transfirieron a la Thompson River University (TRU) en hielo para las mediciones de MetHb. El análisis de gases en sangre se realizó para la medición cooximétrica de MetHb utilizando un analizador ABL 800 FLEX (Radiometer America Inc., Ohio, EE. UU.). En ese momento también se midieron los gases en sangre, incluidos oxígeno arterial, dióxido de carbono, pH, bicarbonato y electrolitos.

50 Medición de NO exhalado

Se midió la concentración fraccional exhalada de NO (F_ENO) usando un analizador de quimioluminiscencia (280i, GE, CO). Se obtuvo una medición de línea de base de F_ENO para cada sujeto registrando durante 1 minuto antes y después de la intervención del tratamiento hasta que los niveles de F_ENO regresaron a los valores iniciales. El tubo de muestreo tenía un filtro de agua para evitar que entre líquido en el dispositivo. El filtro estaba en el extremo distal y se mantuvo lo más cerca posible de la fosa nasal del animal. Todo el manejo de los animales fue realizado por la misma persona para reducir la variación del manejador. La máquina se calibró antes de cada uso con gases de calibración estándar de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

60 Medidas de nitrito

Se recogieron muestras de sangre para el análisis de nitritos el día 14 (como se describió anteriormente). Todas las muestras para la medición de nitrito se colocaron en tubos heparinizados y se centrifugaron durante 5 minutos a 5000 RPM. El sobrenadante se recuperó y se colocó en tubos Eppendorff, se colocó en hielo seco y luego las muestras se transfirieron inmediatamente a un congelador a -80 °C hasta su procesamiento. Las mediciones de nitrito se realizaron

utilizando una técnica de interfaz de líquido quimioluminiscente de acuerdo con las instrucciones del fabricante (280i, General Electric, CO).

Se describen ahora los resultados de los experimentos.

Medidas de biodisponibilidad

Los tres parámetros medidos para biodisponibilidad (MetHb, F_ENO y nitritos en suero) mostraron cambios bioquímicos dentro de los 5 minutos posteriores al tratamiento.

Mediciones de MetHb

Se midió MetHb usando Cooximetría en muestras de sangre tomadas antes del tratamiento y 5 y 30 minutos después del tratamiento con NORS o control de solución salina. El grupo de control de solución salina (Figura 14A) no tuvo ninguna diferencia significativa entre los valores de MetHb antes y después del tratamiento. Por otro lado, el grupo de tratamiento NORS tuvo valores más altos de MetHb 5 y 30 minutos después de administrar el tratamiento (Figura 14B). La Figura 14 representa los valores de MetHb para los animales del grupo de control y de tratamiento (Figuras 14A y 14B, respectivamente), y la diferencia promedio entre el valor de MetHb a los 5 y 30 minutos después del tratamiento, en comparación con los valores iniciales (Figura 14C). Se observó una diferencia significativa en los 5 minutos posteriores al tratamiento entre el grupo NORS y el grupo de control con solución salina. El valor de MetHb fue, en promedio, 4.8 puntos más alto en el grupo de tratamiento en comparación con 0.1 más bajo en el grupo de control. Se encontraron diferencias pequeñas pero insignificantes después de 30 minutos entre tratamientos, aunque para el grupo de tratamiento NORS, los valores se mantuvieron significativamente más altos que la medida de los valores iniciales.

Medición de F_ENO

Cuando se administró NORS al animal, los F_ENO fueron lo suficientemente altos como para ser detectados por análisis quimioluminiscente entre segundos y minutos después del tratamiento con NORS (Figura 15). La Figura 15A representa el F_ENO medido después de administrar solución salina al animal (2.4 ppb) mientras que la Figura 15B muestra el F_ENO después de administrar NORS (alrededor de 400 ppb durante aproximadamente 5 minutos). Esto se midió fuera de la fosa nasal, mientras estaba diluido con aire, por lo que los niveles son mucho más bajos que los niveles reales de F_ENO. Sin embargo, este resultado demuestra que el gas NO está presente en comparación con el control de solución salina.

Nitritos en suero

Los nitritos se midieron usando la técnica de interfaz de líquido de quimioluminiscencia. Las muestras se extrajeron con etanol frío y se inyectaron 50 µl. Como se ve en la Figura 16, 5 minutos después del tratamiento hubo un aumento en la concentración de nitrito en el suero del animal. A los 30 minutos posteriores al tratamiento no hubo diferencias significativas (P > 0.05) con respecto al grupo de control.

Estos resultados descritos en el presente documento demuestran que NORS al 0.41 % dio como resultado la biodisponibilidad de NO, que fue confirmada por el aumento de F_ENO en el animal tratado y por el aumento transitorio esperado en el porcentaje de MetHb, lo que indica que el NO estaba disponible dentro del tracto respiratorio y se metaboliza en el suero en niveles aumentados de nitrito.

Ejemplo 9: Estudio de NORS con hurones

Este experimento se realizó para probar el efecto de NORS sobre la temperatura y los nitritos en sangre en hurones, después de la infección por Influenza A.

Se describen ahora los materiales y métodos empleados en estos experimentos.

Se compraron seis hurones de 10-12 semanas de edad en Triple F Farms y se aclimataron durante 5-7 días antes de la exposición. Se alojaron sueltos y juntos en una habitación de 12 x 18 pies durante la duración del estudio.

Seis hurones que estaban estables para el estudio se anestesiaron con ketamina-xilazina y se sangraron para los valores de referencia de nitrito. Todos los animales fueron expuestos al virus Influenza A/California/04/2009 mediante instilación intranasal de aproximadamente 7.5×10^4 pfu en 0.5 ml. A continuación, se volvió a sangrar a los animales para evaluar los niveles de nitrito en suero. Se obtuvieron muestras de sangre 30 y 240 minutos después de los tratamientos y se analizaron para nitritos séricos con un analizador quimioluminiscente. Dentro de los 5-10 minutos de las intervenciones de tratamiento de inoculación se administraron. Una cohorte de hurones (n = 3) recibió aproximadamente 2 ml de NORS durante un período de diez minutos con un nebulizador de volumen pequeño a 7 l/min. Otra cohorte de hurones (n = 3) recibió aproximadamente 2 ml de solución salina durante un período de diez minutos con un nebulizador de pequeño volumen a 7 l/min (Figura 17).

Los resultados se analizaron usando la prueba t de Student para datos no emparejados para la comparación entre dos grupos cualesquiera. Las medias de los grupos se probaron estadísticamente mediante medias de mínimos cuadrados (prueba t de dos colas). Para los experimentos con conjuntos múltiples (más de 2), el análisis estadístico de los datos obtenidos se realizó utilizando un análisis de varianza unidireccional (ANOVA) y el análisis de datos de la prueba de comparación múltiple de Tukey y la presentación gráfica se realizaron utilizando un paquete de estadísticas comerciales (Graphpad-Prism V 3.0, GraphPad Software Inc., EE. UU.). A menos que se especifique lo contrario, $p < 0.05$ indica significación estadística. Los resultados se informaron como media \pm desviación estándar.

Se describen ahora los resultados de los experimentos.

Los nitritos en el suero se elevaron significativamente a los 30 minutos ($p < 0.05$) y volvieron a los valores iniciales después de 240 minutos después del tratamiento con NORS en comparación con los valores de línea de base (Figura 18A). Además, cuando se administró el tratamiento NORS, hubo niveles significativos de NO detectables por el dispositivo AeroNOx™ (Pulmonox, Canadá). Estos resultados muestran que la biodisponibilidad del NO producido a partir de NORS se demostró en el suero después del tratamiento.

La temperatura media para los animales de control frente a los tratados, después de 3 y 5 días fue significativamente ($P < 0.05$) más alta (Figura 18B). Esto muestra un efecto sistémico del tratamiento NORS en los hurones.

Además, la presente invención o divulgación proporciona, respectivamente, los siguientes elementos 1 a 41:

1. Una solución líquida liberadora de óxido nítrico (NORS) compuesta por al menos un compuesto liberador de óxido nítrico y al menos un agente acidificante, en la que NORS proporciona una liberación extendida de una cantidad terapéuticamente eficaz de gas de óxido nítrico (gNO).

2. La solución del ítem 1, en la que el al menos un compuesto liberador de óxido nítrico se selecciona del grupo que consiste en un nitrito, una sal del mismo y cualquier combinación de los mismos.

3. La solución del ítem 2, en la que el nitrito es nitrito de sodio.

4. La solución del ítem 1, en la que la cantidad de al menos un compuesto liberador de óxido nítrico no es superior a aproximadamente 0.5 % p/v.

5. La solución del ítem 1, en la que el al menos un agente acidificante es un ácido.

6. La solución del ítem 5, en la que el ácido es ácido cítrico.

7. La solución del ítem 1, en la que la cantidad de al menos un agente acidificante no es superior a aproximadamente 0.5 % p/v.

8. La solución del ítem 1, en la que la concentración terapéuticamente eficaz de NO es de aproximadamente 160 ppm.

9. La solución del ítem 1, en la que NORS es una solución salina.

10. La solución del ítem 1, en la que el gNO se libera durante un período de al menos 30 minutos.

11. La solución del ítem 1, en la que el gNO se libera durante un período de al menos 4 horas.

12. La solución del ítem 1, en la que el gNO se libera preferentemente durante un período de al menos 8 horas.

13. La solución del ítem 1, en la que el gNO se libera durante un período de al menos 12 horas.

14. La solución del ítem 1, en la que el gNO se libera durante un período de al menos 24 horas.

15. Una solución líquida liberadora de óxido nítrico (NORS) compuesta por al menos un compuesto liberador de óxido nítrico que tiene una concentración no mayor de aproximadamente 0.5 % p/v y al menos un agente acidificante, en la que NORS libera una cantidad terapéuticamente eficaz de ácido nítrico. gas de óxido (gNO).

16. La solución del ítem 15, en la que el al menos un compuesto liberador de óxido nítrico se selecciona del grupo que consiste en un nitrito, una sal del mismo y cualquier combinación de los mismos.

17. La solución del ítem 16, en la que el nitrito es nitrito de sodio.

18. La solución del ítem 15, en la que el al menos un agente acidificante es un ácido.

19. La solución del ítem 18, en la que el ácido es ácido cítrico.

ES 2 861 263 T3

20. La solución del ítem 15, en la que la cantidad de al menos un agente acidificante no es mayor de aproximadamente 0.5 % p/v.
- 5 21. La solución del ítem 15, en la que la concentración terapéuticamente eficaz de NO es de aproximadamente 160 ppm.
22. La solución del ítem 15, en la que NORS es una solución salina.
- 10 23. Un método para el tratamiento de una herida en un ser humano, que comprende administrar al ser humano una solución líquida liberadora de óxido nítrico (NORS) compuesta por al menos un compuesto liberador de óxido nítrico y al menos un agente acidificante, en el que el NORS proporciona una liberación de una cantidad terapéuticamente eficaz de gas de óxido nítrico (gNO).
- 15 24. El método del ítem 23, en el que la herida es una herida abierta, un corte, un raspado, una quemadura, un absceso, una lesión, una herida quirúrgica, una herida por traumatismo, tinea pedis o una herida asociada a una enfermedad.
- 25 25. El método del ítem 23, que comprende además cubrir la herida con una cubierta impermeable al gas.
- 20 26. El método del ítem 23, que comprende además cubrir la herida con una cubierta semi-impermeable al gas.
27. El método del ítem 25, en el que la cubierta comprende al menos un orificio de purga para controlar o limitar la presión entre la cubierta y el lugar de tratamiento.
- 25 28. El método del ítem 23, en el que la cantidad de al menos un compuesto liberador de óxido nítrico no es superior a aproximadamente 0.5 % p/v.
29. El método del ítem 23, en el que la cantidad de al menos un agente acidificante no es mayor de aproximadamente 0.5 % p/v.
- 30 30. El método del ítem 23, en el que el sistema de suministro es un recipiente abierto para empapar la herida abierta.
31. El método del ítem 23, en el que el gNO se libera durante un período de al menos 30 minutos.
32. El método del ítem 23, en el que el gNO se libera durante un período de al menos 4 horas.
- 35 33. El método del ítem 23, en el que el gNO se libera preferentemente durante un período de al menos 8 horas.
34. El método del ítem 23, en el que el gNO se libera durante un período de al menos 12 horas.
- 40 35. El método del ítem 23, en el que el gNO se libera durante un período de al menos 24 horas.
36. Un método para el tratamiento, prevención o reducción de la incidencia de una enfermedad o trastorno en un ser humano que lo necesita, el método comprende administrar al ser humano una solución líquida liberadora de óxido nítrico (NORS) compuesta por al menos un óxido nítrico liberador compuesto a una concentración de no más de aproximadamente 0.5 % p/v y al menos un agente acidificante, en el que el NORS libera una cantidad terapéuticamente eficaz de gas de óxido nítrico (gNO).
- 45 37. El método del ítem 36, en el que la enfermedad o trastorno es una enfermedad o trastorno respiratorio.
- 50 38. El método del ítem 36, en el que la cantidad de al menos un compuesto liberador de óxido nítrico no es superior a aproximadamente 0.5 % p/v.
39. El método del ítem 36, en el que la cantidad de al menos un agente acidificante no es superior a aproximadamente 0.5 % p/v.
- 55 40. El método del ítem 36, en el que NORS se administra en forma de pulverización.
41. El método del ítem 36, en el que la NORS se administra por vía intranasal al sujeto.
- 60

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una solución líquida liberadora de óxido nítrico (NORS) compuesta de al menos un compuesto liberador de óxido nítrico y al menos un agente acidificante, en la que NORS proporciona una liberación prolongada de una cantidad terapéuticamente eficaz de gas de óxido nítrico (gNO), en el que el gNO se libera durante un período de al menos 30 minutos, en el que la cantidad de al menos un compuesto liberador de óxido nítrico no es superior al 0.5 % p/v, y en el que la cantidad de al menos un agente acidificante no es superior al 0.5 % P/v.
- 10 2. La solución de la reivindicación 1, en la que el al menos un compuesto liberador de óxido nítrico se selecciona del grupo que consiste en un nitrito, una sal del mismo y cualquier combinación de los mismos.
3. La solución de la reivindicación 2, en la que el nitrito es nitrito de sodio.
- 15 4. La solución de la reivindicación 1, en la que el al menos un agente acidificante es un ácido.
5. La solución de la reivindicación 4, en la que el ácido es ácido cítrico.
6. La solución de la reivindicación 1, en la que la cantidad terapéuticamente eficaz de gNO está entre 120 ppm y 1000 ppm.
- 20 7. La solución de la reivindicación 1, en la que el gNO se libera durante un período de al menos uno de 4 horas, 8 horas, 12 horas o 24 horas.
- 25 8. Una solución líquida liberadora de óxido nítrico (NORS) compuesta por al menos un compuesto liberador de óxido nítrico a una concentración no superior al 0.5 % p/v y al menos un agente acidificante a una concentración no superior al 0,5 % p/v para su uso en un método para el tratamiento, prevención o reducción de la incidencia de una enfermedad o trastorno en un ser humano que lo necesita, el método comprende administrar al ser humano dicho NORS, en el que el NORS libera una cantidad terapéuticamente eficaz de gas de óxido nítrico (gNO) durante un período de al menos 30 minutos.
- 30 9. NORS para su uso de acuerdo con la reivindicación 8, en el que la enfermedad o trastorno es una enfermedad o trastorno respiratorio.
10. El NORS para uso de la reivindicación 8, en el que la cantidad terapéuticamente eficaz de gNO está entre 120 ppm y 1000 ppm.
- 35 11. El NORS para uso de la reivindicación 8, en el que el NORS se administra como un aerosol.
12. NORS para su uso de acuerdo con la reivindicación 8, en el que NORS se administra por vía intranasal al sujeto.

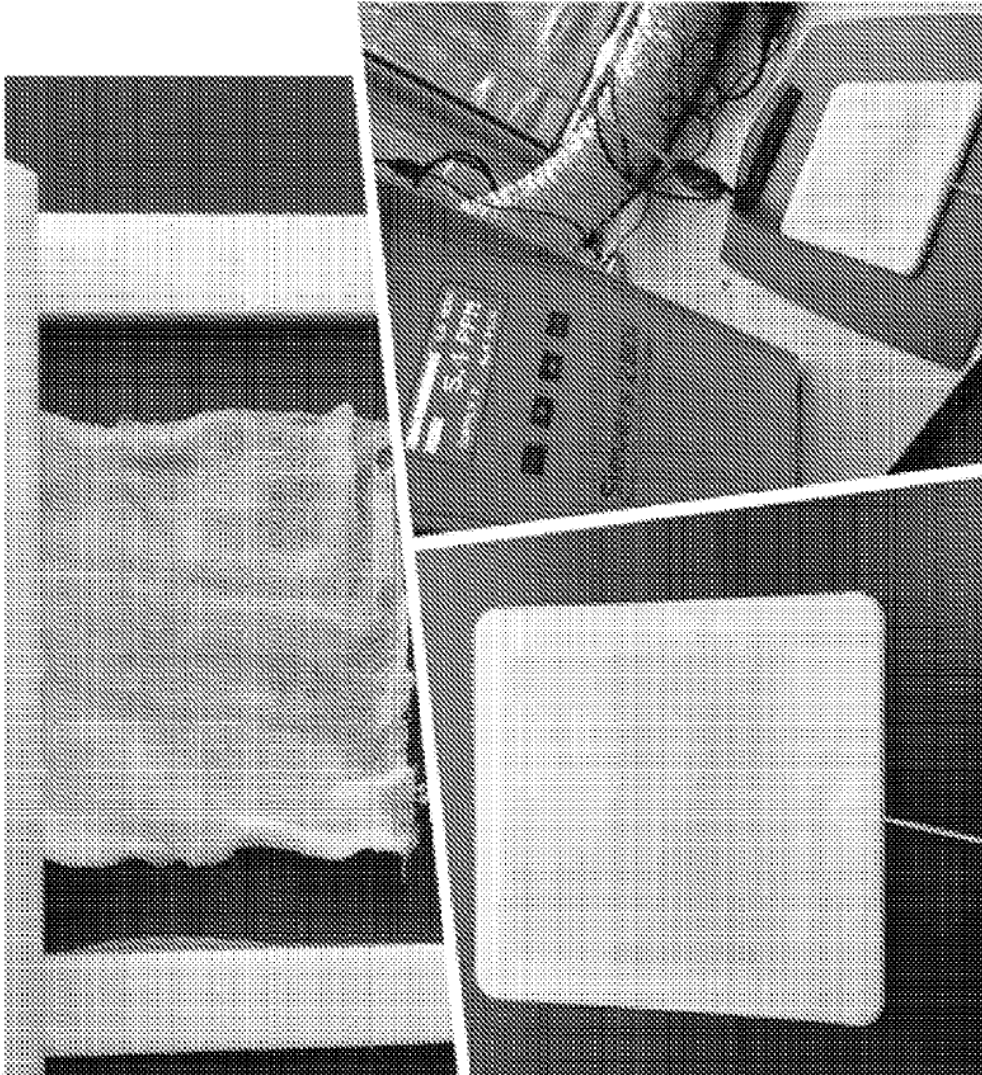


Figura 1

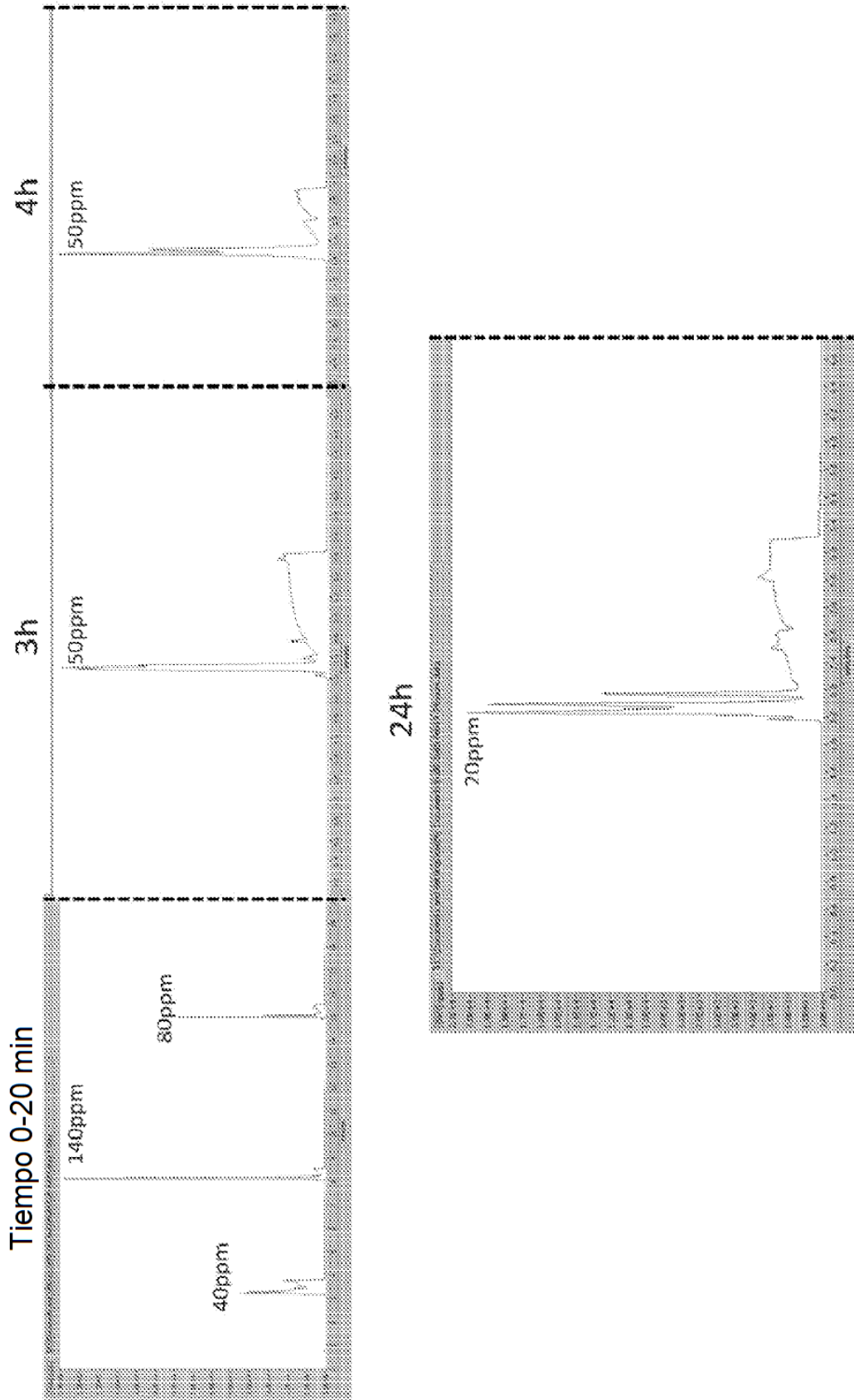


Figura 2

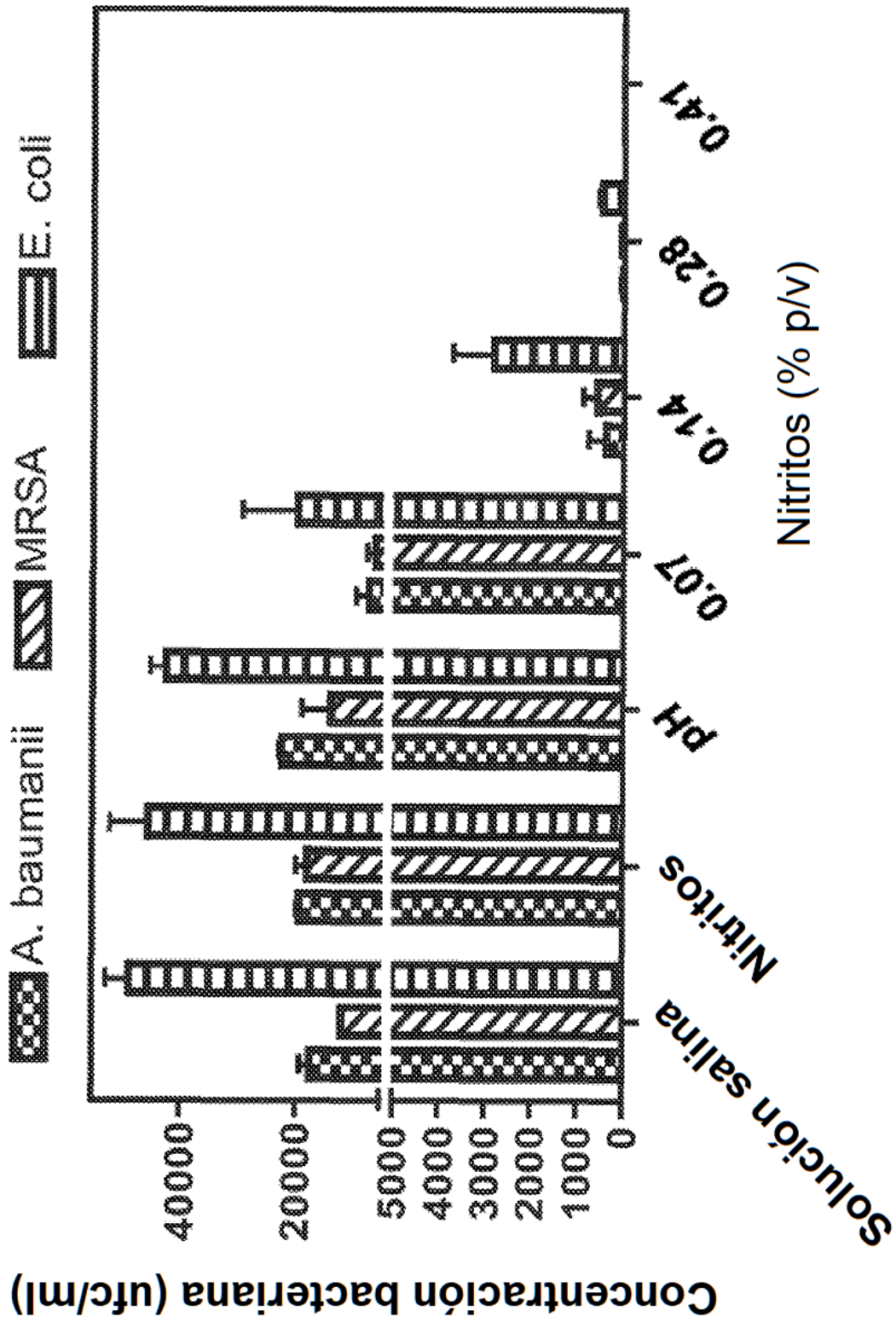


Figura 3

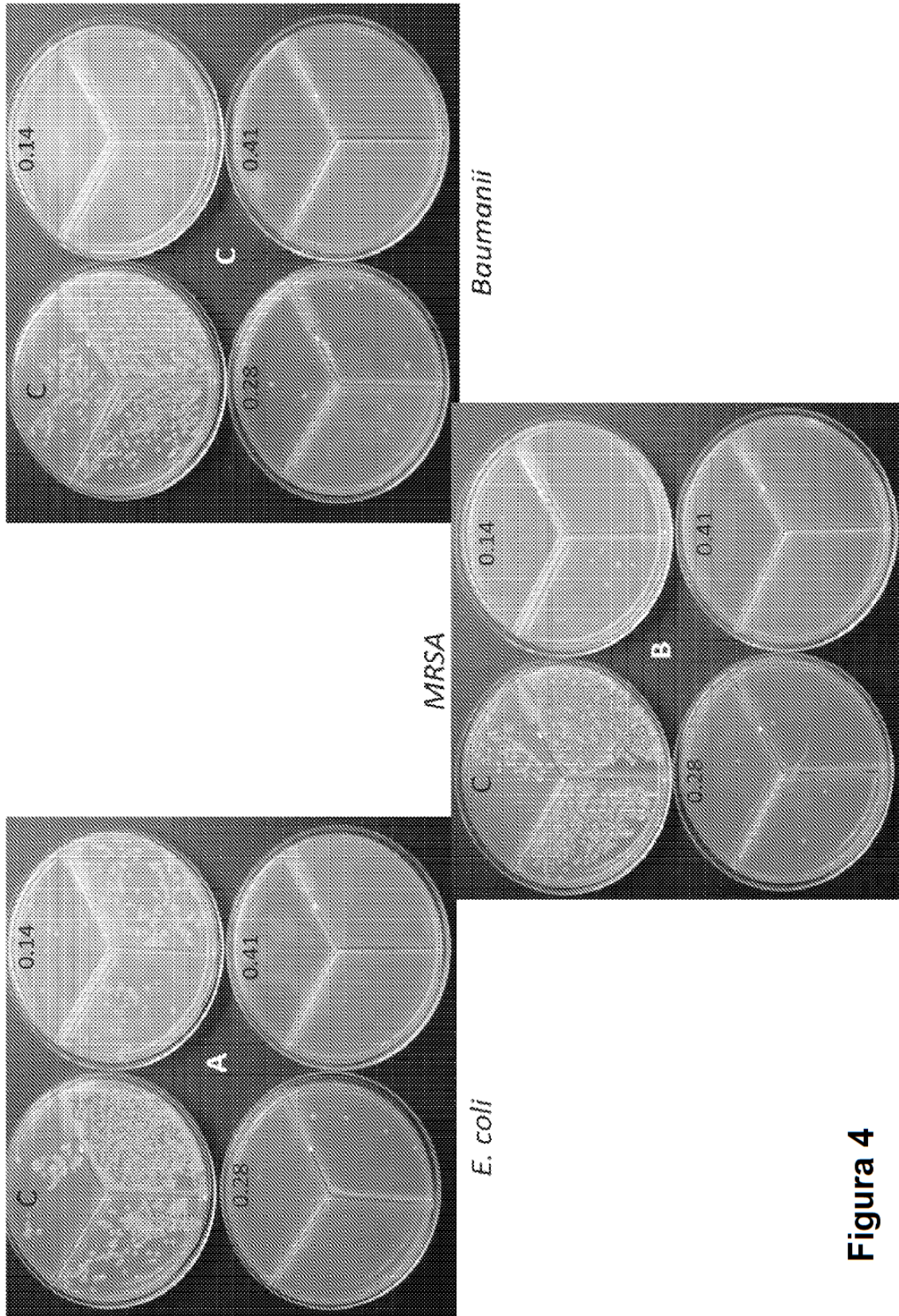


Figura 4

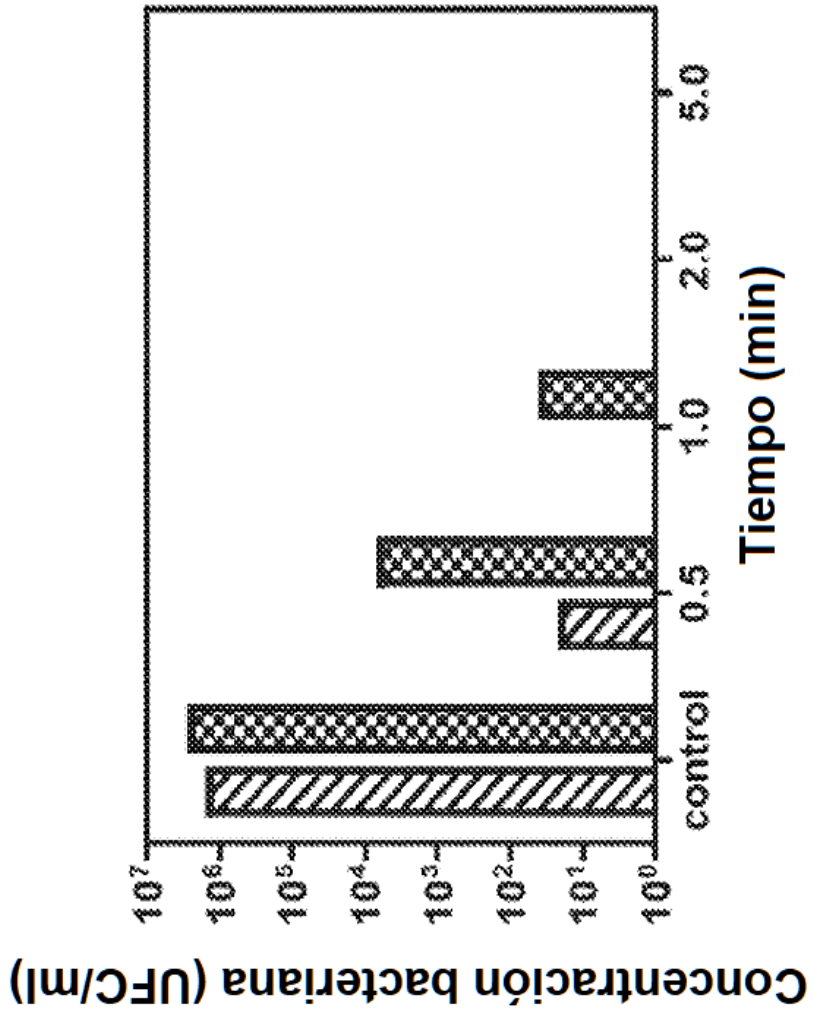


Figura 5

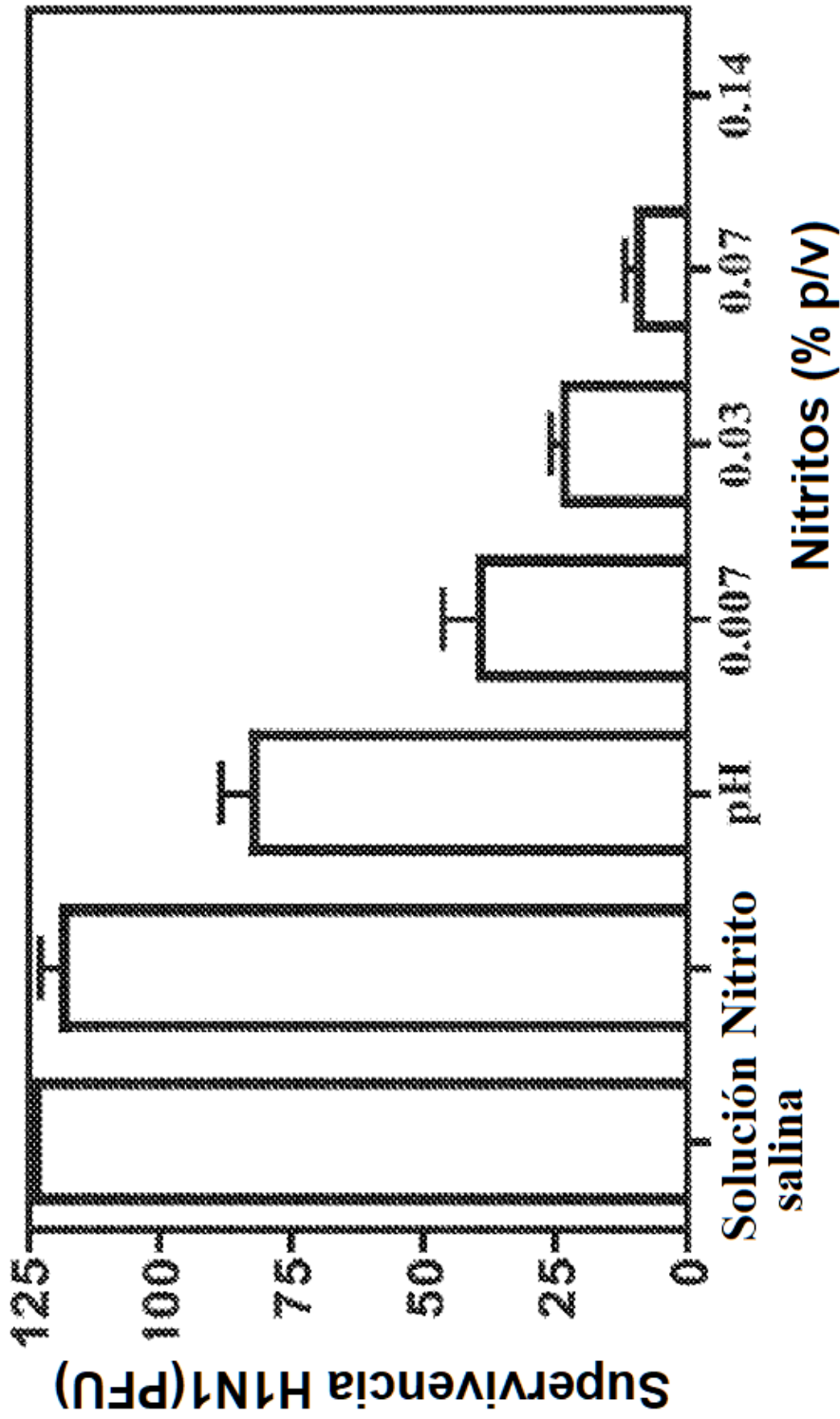


Figura 6

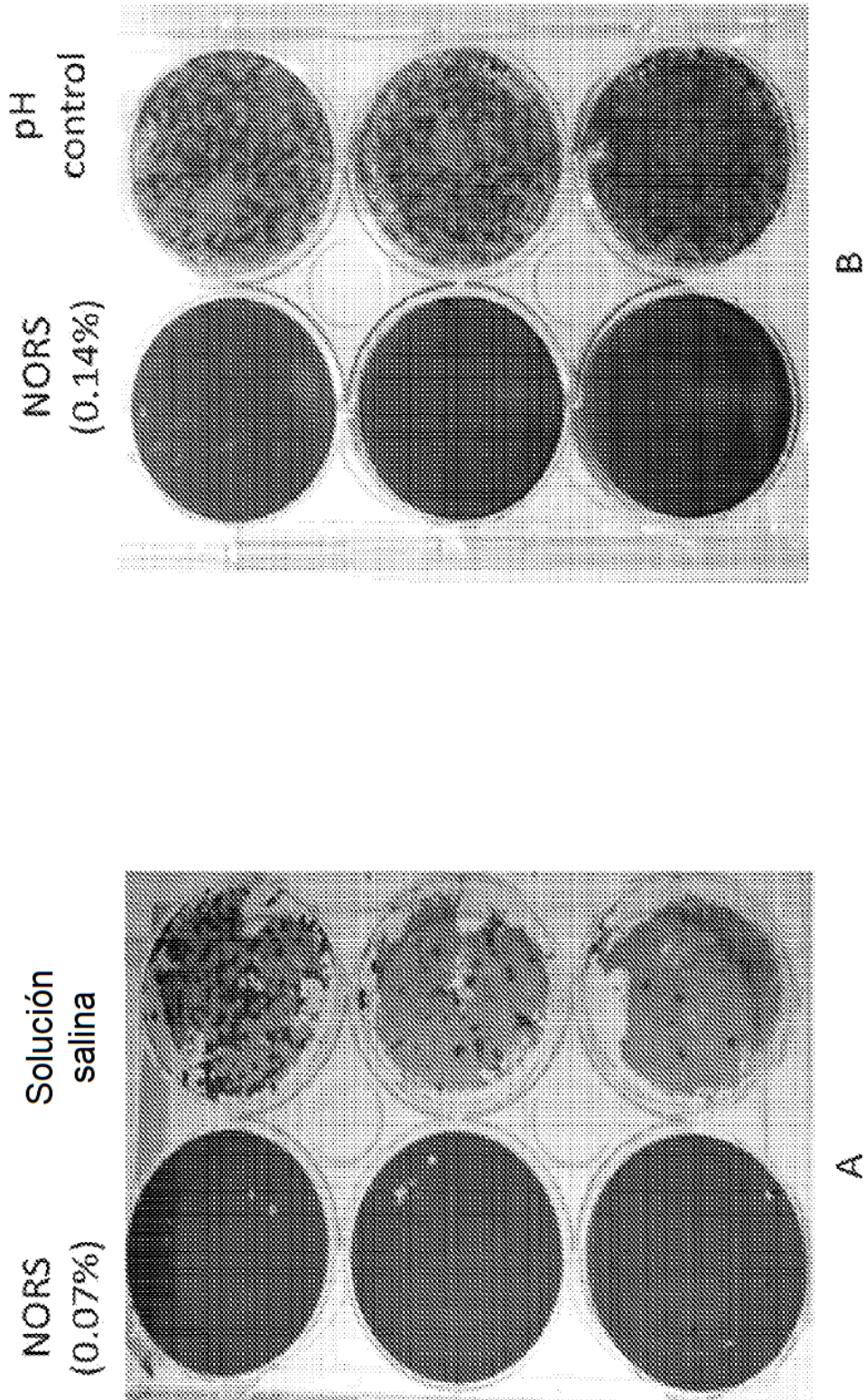


Figura 7

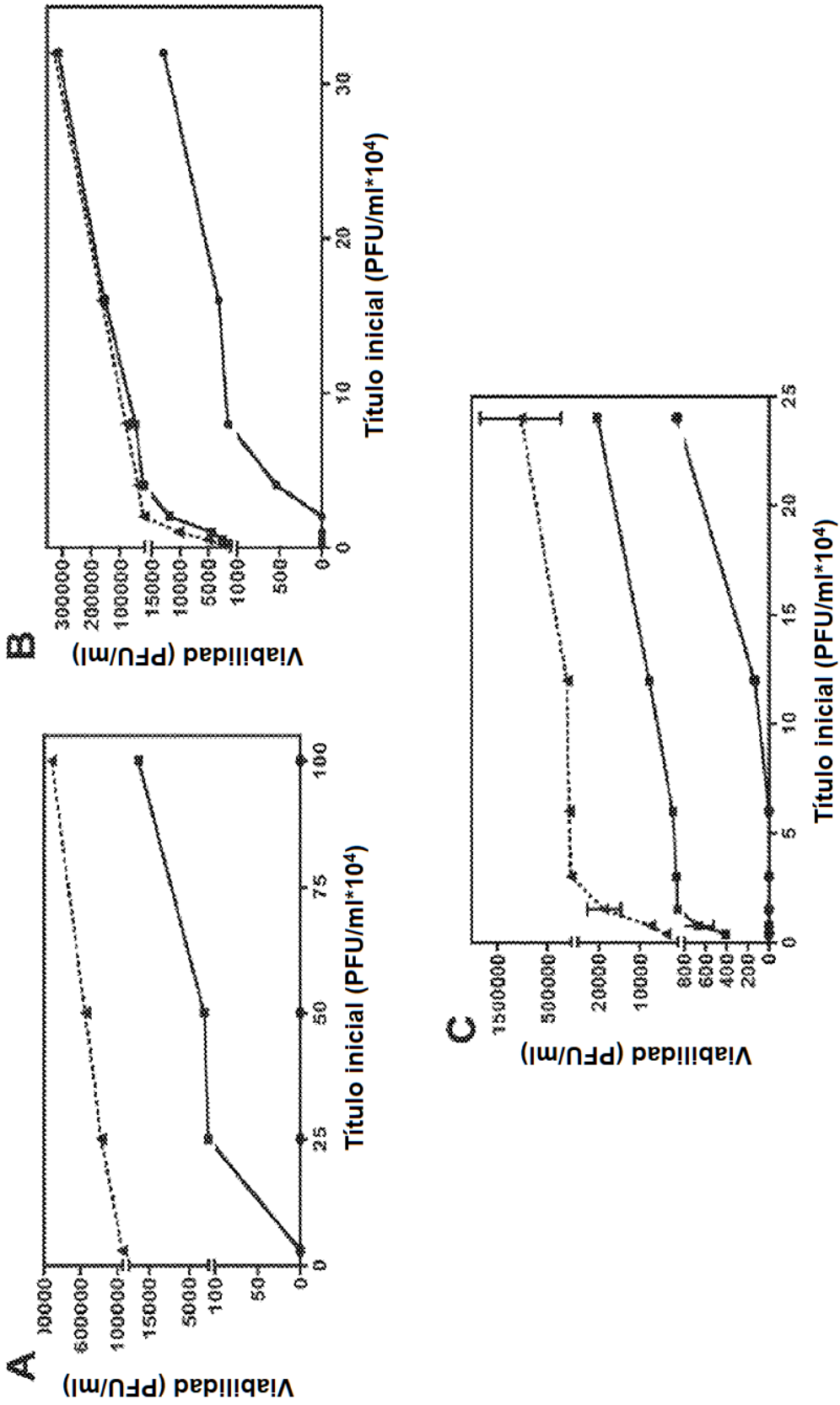


Figura 8

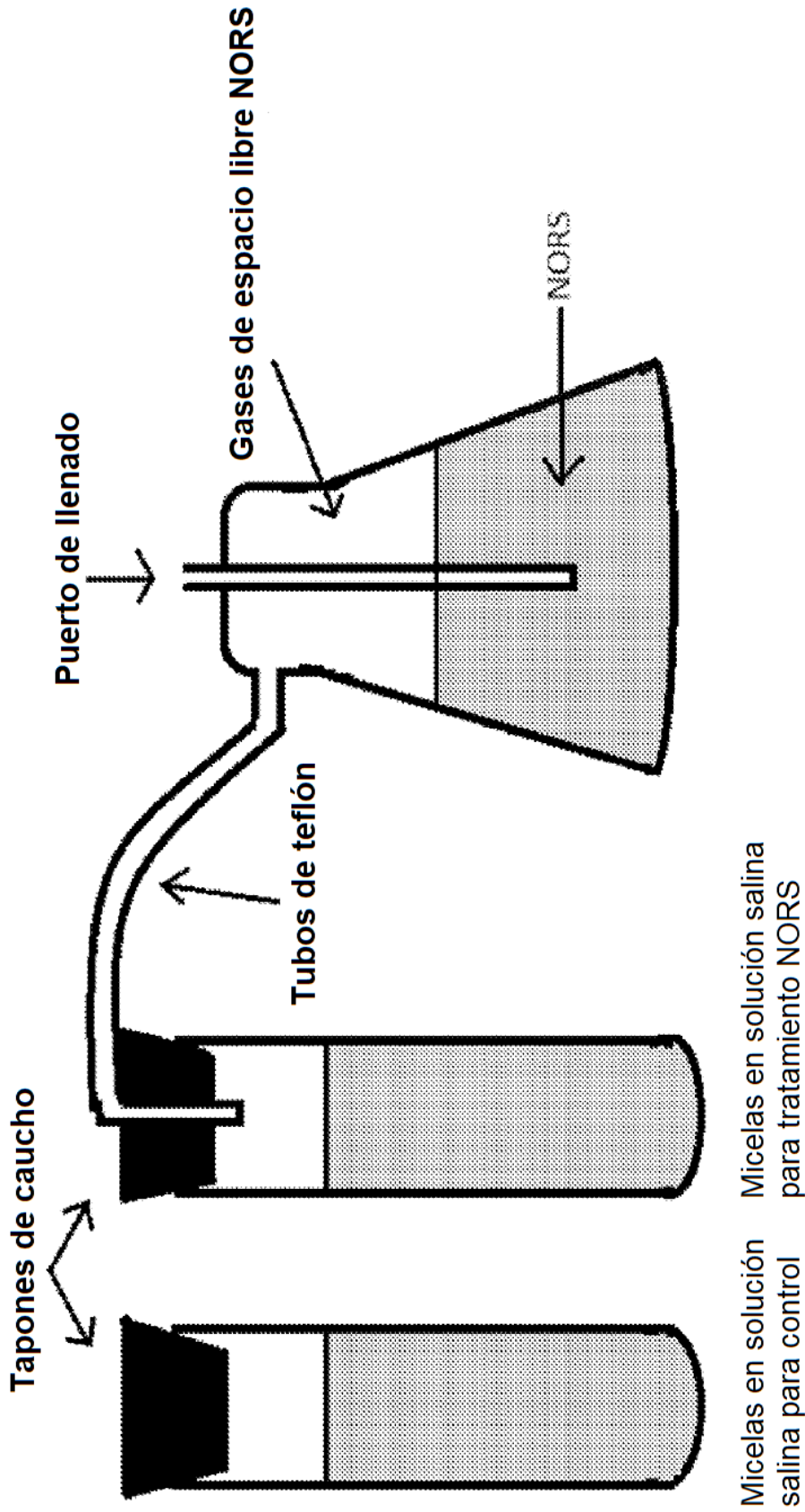


Figura 9

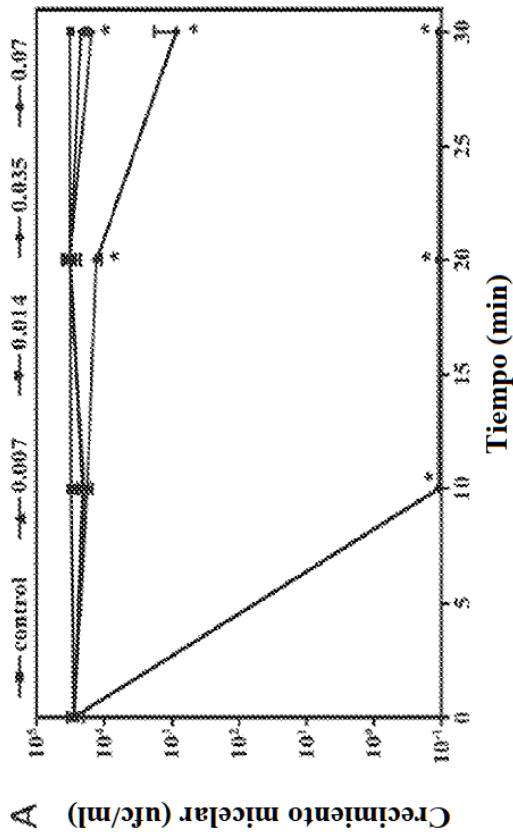
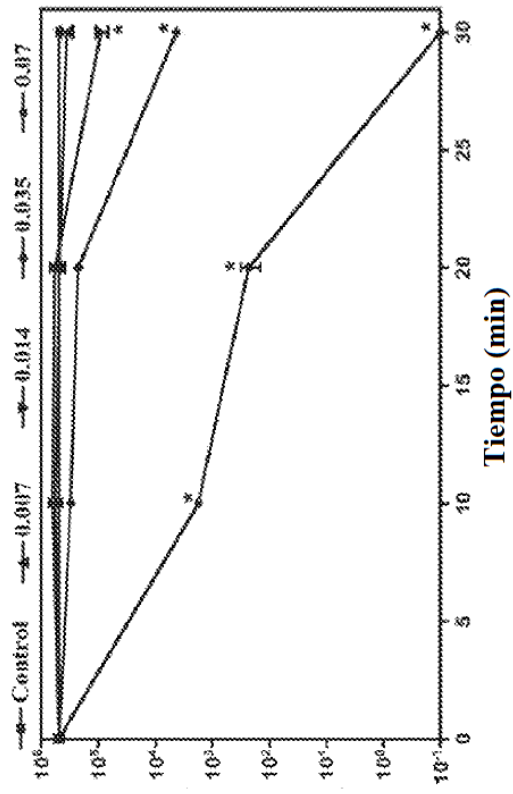


Figura 10

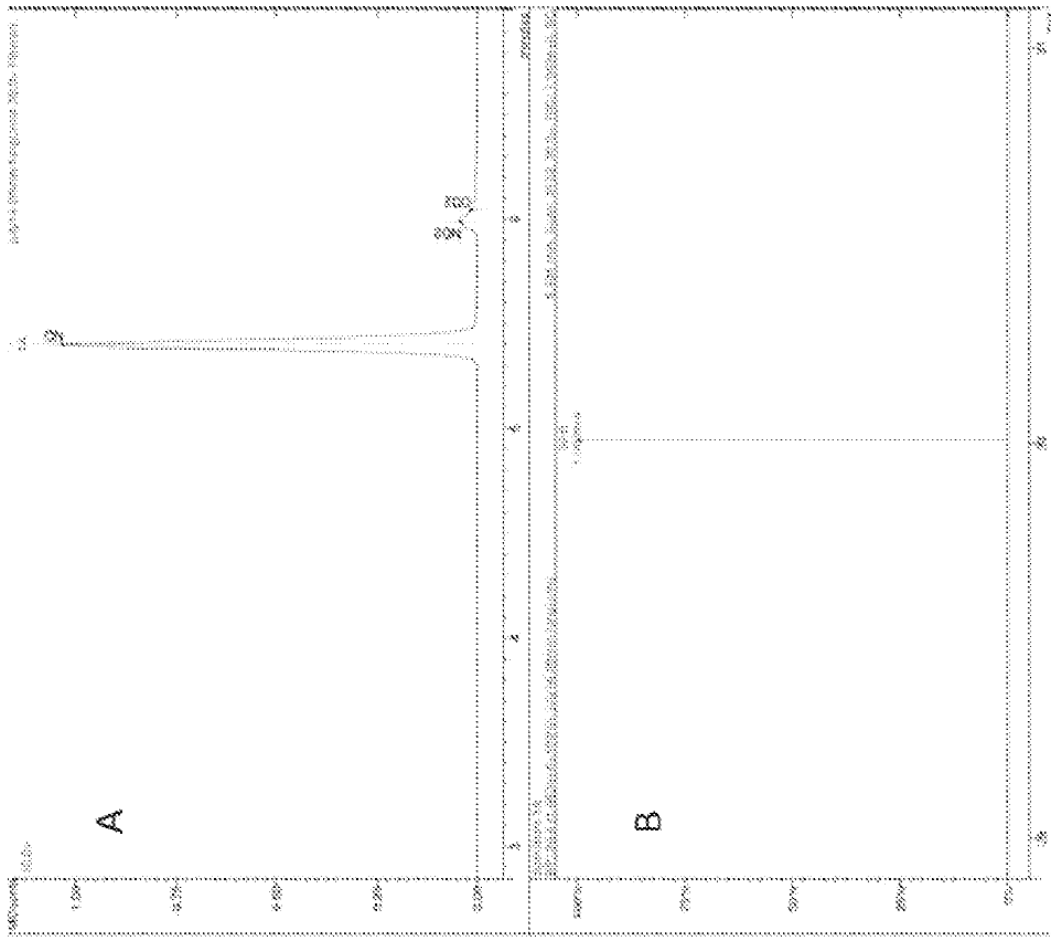


Figura 11

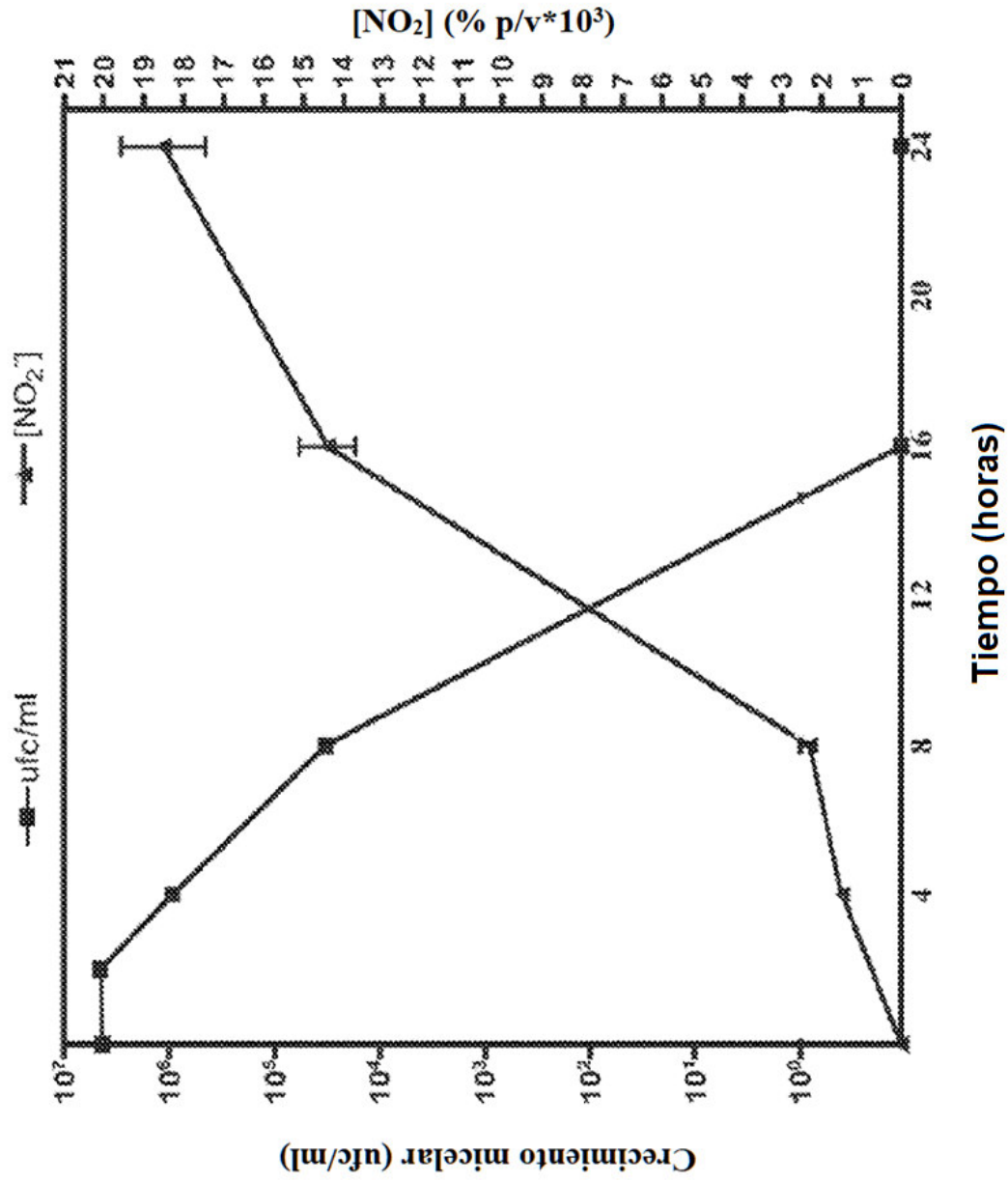


Figura 12

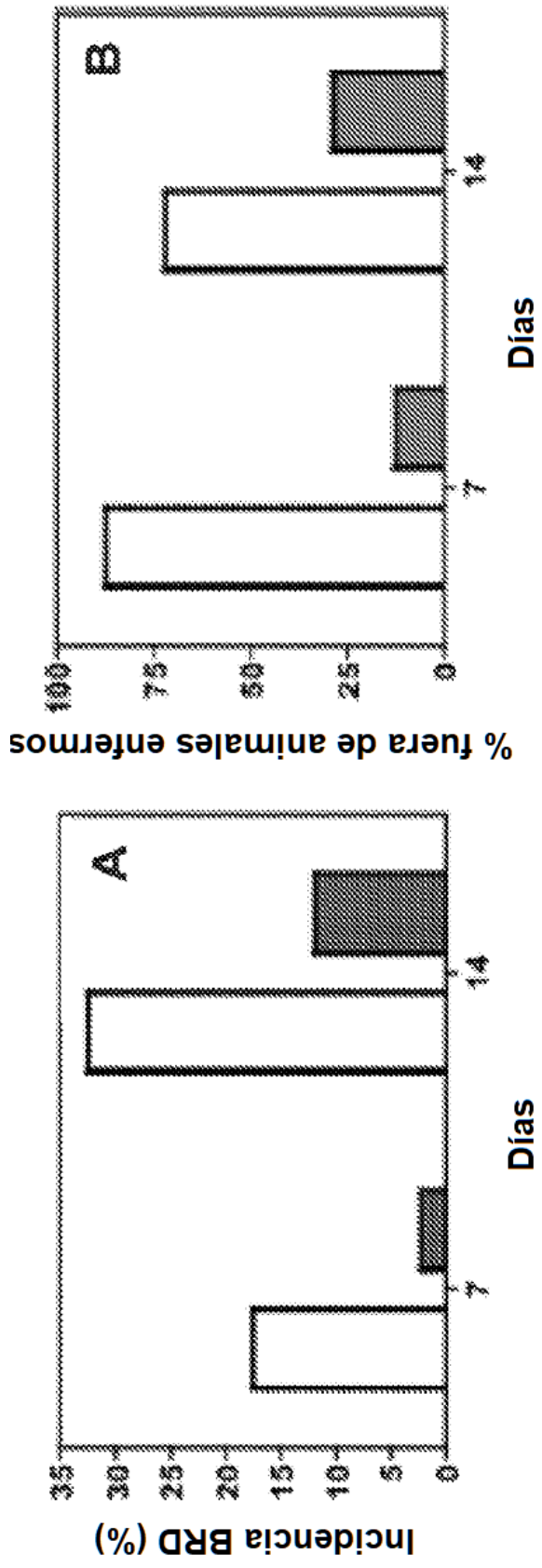


Figura 13

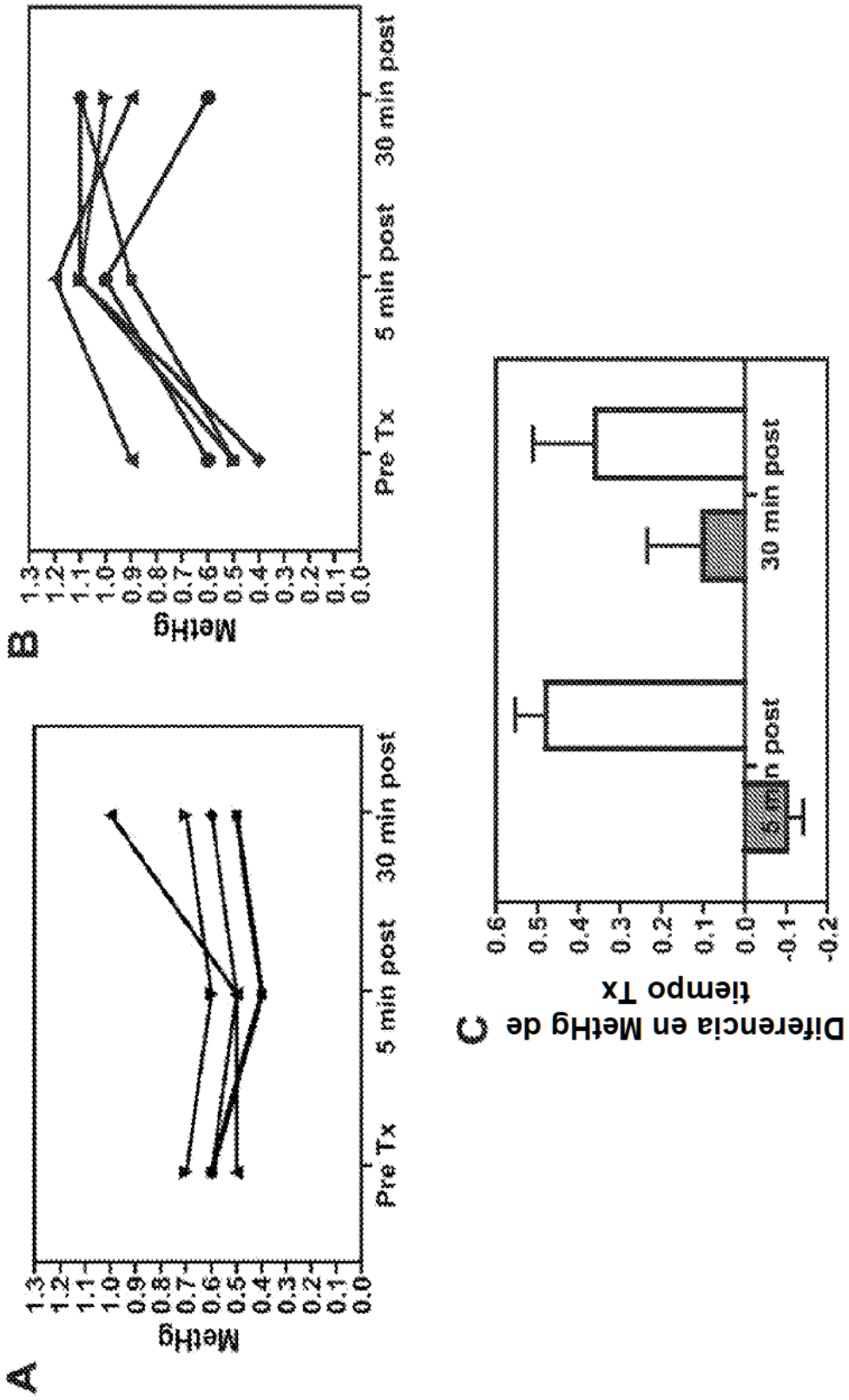
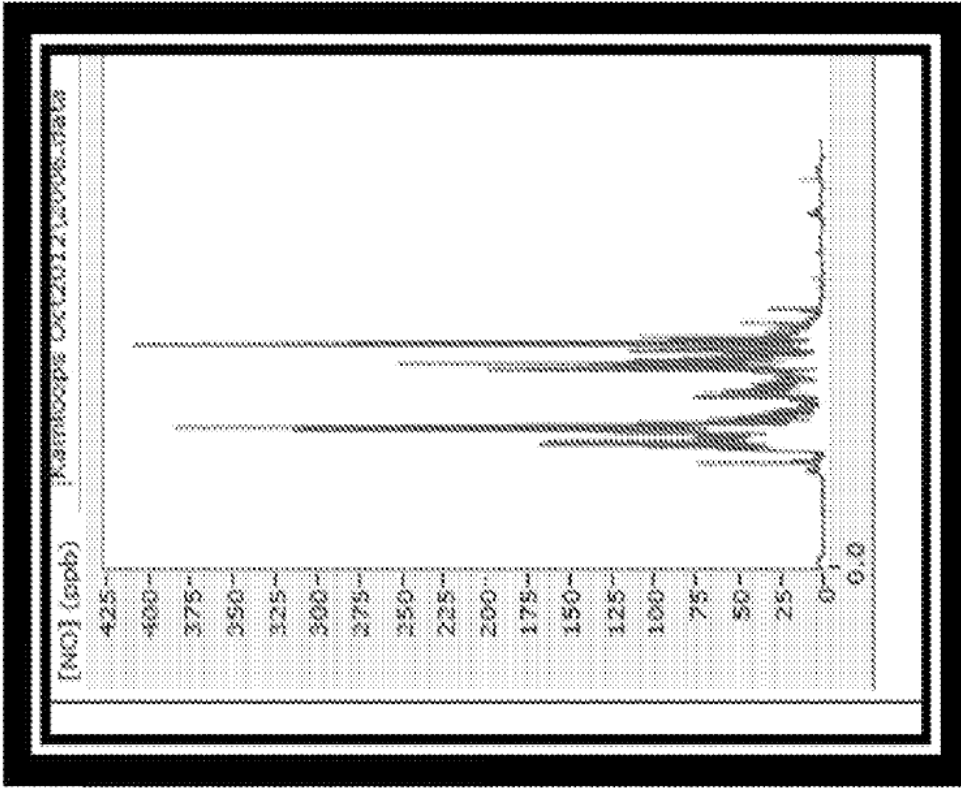
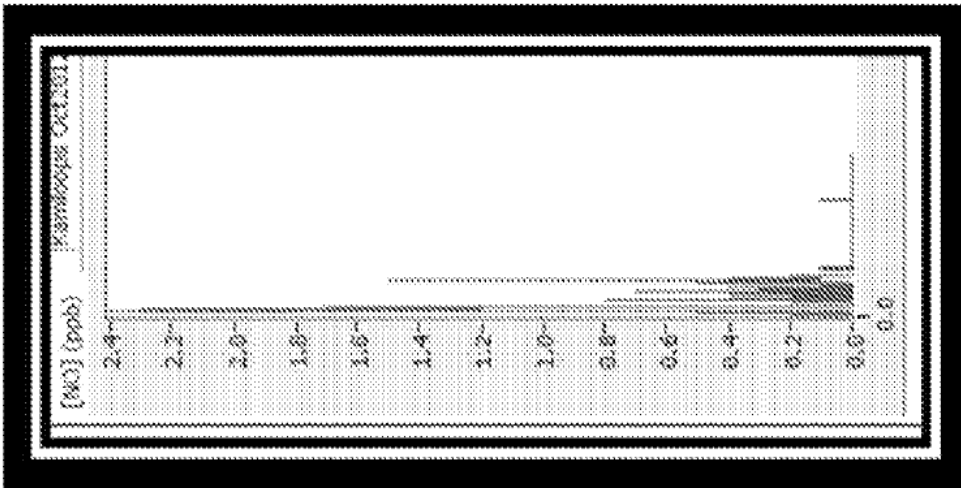


Figura 14



B



A

Figura 15

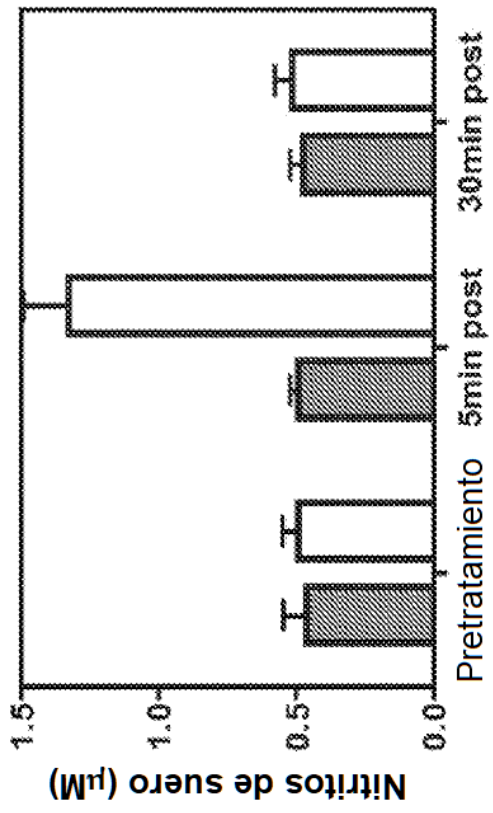


Figura 16

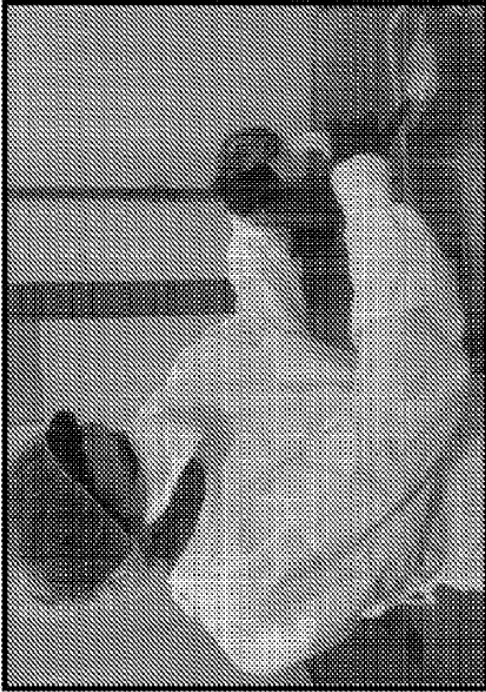


Figura 17

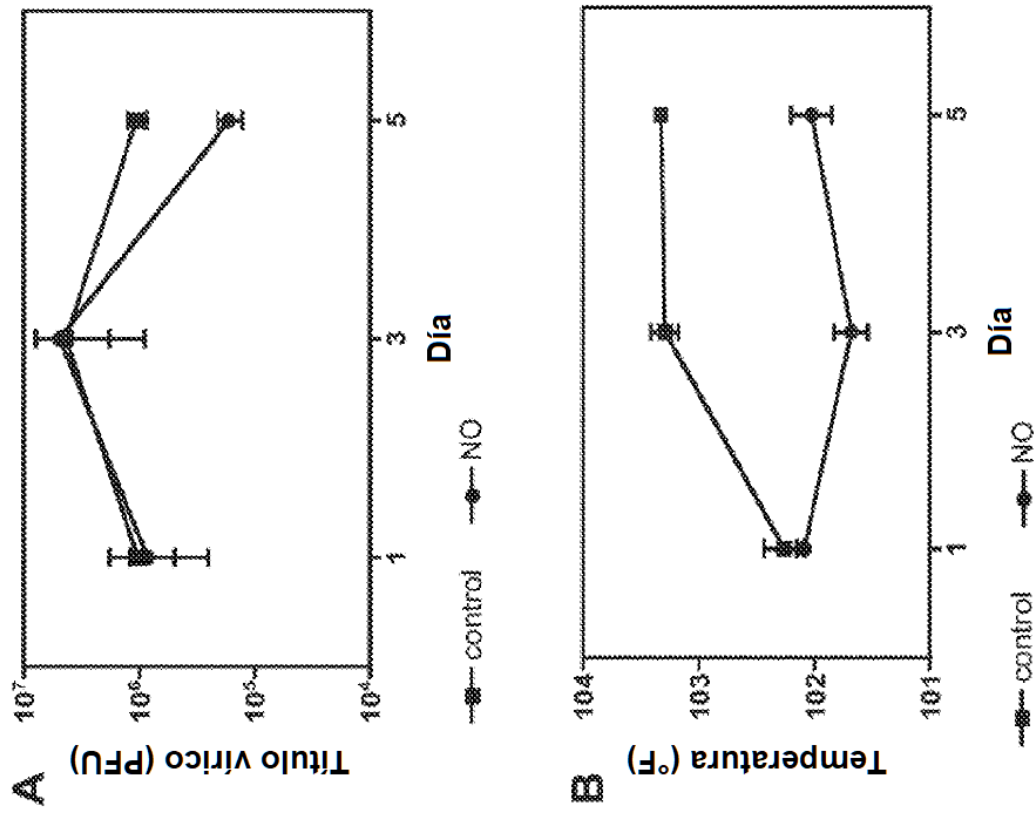


Figura 18