

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la
Propiedad Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
13 de abril de 2017 (13.04.2017)

WIPO | PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2017/060550 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes:
A61K 31/192 (2006.01) **A61K 33/14** (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES20 16/070702

(22) Fecha de presentación internacional:
4 de octubre de 2016 (04.10.2016)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
AR 20150103203
5 de octubre de 2015 (05.10.2015) AR

(71) Solicitantes: **QUIMICA LUAR SRL** [AR/AR]; Hualñin 359 - B° Alberdi 5000, Córdoba, . (AR). **BOFARULL, Monica Liliana** [IT/ES]; Conrado Albadalejo 37, F, 03540 Alicante (ES).

(72) Inventores: **ARGAÑARÁS, Luis Alberto**; Hualfin 359 - B° Alberdi 5000, Córdoba, . (AR). **MUÑOZ, Adrián Javier**; Luis de Azpeitia 3517, Córdoba, . (AR). **ALASINO, Roxana Valeria**; Dean Funes 825, Córdoba, . (AR). **GARRO, Ariel Gustavo**; Ferroviarios 1606, B° Crisol Norte, Córdoba, . (AR). **BELTRAMO, Dante Miguel**; Tupunga 2390, Córdoba, . (AR).

(74) Mandatario: **SALIS, Eli**; Goleta, 17, Esc. 2 2º C, 03540 Alicante (ES).

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE,

AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible):
ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declaraciones según la Regla 4.17:

- sobre la identidad del inventor (Regla 4.17(i))
- sobre el derecho del solicitante para solicitar y que le sea concedida una patente (Regla 4.17(H))
- sobre el derecho del solicitante a reivindicar la prioridad de la solicitud anterior (Regla 4.17(iii))

Publicada:

- con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))

(54) Title: BACTERICIDAL AND VIRUCIDAL PHARMACEUTICAL COMPOSITION

(54) Título : UNA COMPOSICIÓN FARMACÉUTICA BACTERICIDA Y VIRUCIDA

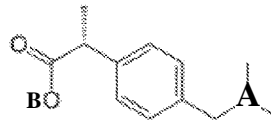


Figura 1

(57) Abstract: The invention relates to a bactericidal and virucidal pharmaceutical composition for use on epithelia of tissues such as pulmonary, nasal and oral tissues, which comprises a non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID) in a concentration between 5 and 500 mM and a salt, the NSAID preferably being solubilised in a hypertonic saline solution. The composition can be used in therapies for herpes simplex viral infections, be used as a bactericidal mouthwash, or be vehiculated to the lung by using a nebuliser, for cystic fibrosis.

(57) Resumen: Una composición farmacéutica bactericida y virucida Una composición farmacéutica bactericida y virucida, de aplicación sobre epitelios de tejidos como pulmonar, nasal y bucal, que comprende un anti-inflamatorio no esteroideo (AINE) en una concentración entre 5 y 500 mM y una sal, preferentemente solubilizado dicho AINE en solución salina hipertónica, aplicable a terapias de infecciones virales tipo Herpes simplex, para ser empleada como enjuague bactericida bucal, o bien para ser vehiculizada al pulmón mediante el uso de un nebulizador para fibrosis quística.



WO 2017/060550 A1

DESCRIPCIÓN

UNA COMPOSICIÓN FARMACÉUTICA BACTERICIDA Y VIRUCIDA

Campo técnico de la invención

- 5 La presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas para el tratamiento de afecciones pulmonares y de tejido epitelial tales como la fibrosis quística. En particular está comprendida entre las composiciones de uso tópico o para nebulizar.

Estado de la técnica

- 10 Los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) son un grupo heterogéneo de medicamentos que comparten sus acciones terapéuticas (analgésica, antiinflamatoria y antipirética) pero que se diferencian en su eficacia y toxicidad relativa

- Aunque los AINEs son fármacos relativamente seguros, cuando se administran en dosis adecuadas y en pacientes seleccionados, pueden presentar efectos adversos e
- 15 interacciones potencialmente graves. Los efectos secundarios causados por los AINEs afectan a diversos órganos, pero los originados a nivel gastrointestinal son los más frecuentes. Aproximadamente un 2-3% de los pacientes que toman AINEs durante un año desarrollan una complicación gastrointestinal como hemorragia o perforación alta o baja. Durante ese periodo de tiempo un 5-10% desarrollan úlceras sintomáticas y un 30-50%
- 20 desarrollan dispepsia que requiere atención médica [Lanas, A., Pique, J.M., Ponce, J., *Gastroenterol. Hepatol.*, 24, 22 (2001); *Gastroenterol. Hepatol.*, 24, 134 (2001).2j].

La molécula de Ibuprofeno con un PM de 206,3 g/mol, (Figura 1) al igual que otros derivados de 2-arilpropionato, los cuales incluyen; ketoprofeno, flurbiprofeno, naproxeno, etc. contiene un carbono quiral en la posición α (alfa-) del propionato.

- 25 El Ibuprofeno es considerado un antiinflamatorio no esteroideo (AINE), utilizado frecuentemente como antipirético y para el alivio sintomático del dolor de cabeza (cefalea), dolor dental, dolor muscular o mialgia, molestias de la menstruación, dolor neurológico de carácter leve y dolor postquirúrgico. También se usa para tratar cuadros inflamatorios, como los que se presentan en artritis, artritis reumatoidea y artritis gotosa. Generalmente la dosis
- 30 recomendada para adultos es de unos 1200 mg diarios. Sin embargo, bajo supervisión médica, la cantidad máxima de ibuprofeno para adultos es de 800 mg por dosis o 3200 mg por día.

Hay poca correlación entre la severidad de los síntomas y los niveles plasmáticos medidos. Los efectos tóxicos son poco probables en dosis inferiores a 100 mg/kg pero pueden ser graves por encima de los 400 mg/kg, (alrededor de 150 comprimidos de 200 mg para un hombre normal). Sin embargo, dosis altas no indican que el cuadro clínico vaya a ser letal.

- 5 No es posible determinar una dosis letal precisa, ya que puede variar con la edad, el peso y las enfermedades asociadas al paciente.

La mayoría de los síntomas son un exceso de la acción e incluyen dolor abdominal, náuseas, vómitos, somnolencia, mareos, dolor de cabeza, zumbido de oídos y nistagmo. Rara vez los síntomas pueden ser más graves, se conocen de algunos como hemorragia
10 gastrointestinal, convulsiones, acidosis metabólica, hiperpotasemia, hipotensión, bradicardia, taquicardia, fibrilación auricular, coma, insuficiencia hepática, insuficiencia renal aguda, cianosis, depresión respiratoria y paro cardíaco.

El Ibuprofeno, por su estructura, es una molécula prácticamente insoluble en agua, se solubiliza menos de 1 mg en 1 mL de agua (< 1 mg/mL). La forma de administración del
15 Ibuprofeno para el tratamiento de todos los casos mencionados anteriormente es siempre de forma de comprimidos o cápsulas blandas en las cuales el Ibuprofeno se encuentra en forma protonada. Esta forma protonada, hace por lo tanto al Ibuprofeno una molécula fuertemente insoluble en agua. Como contraparte, el Ibuprofeno resulta soluble en disolventes orgánicos como etanol o acetona.

20 La forma de solubilizar el Ibuprofeno en agua se puede realizar mediante la remoción del protón por algún catión. En tal sentido, se pueden preparar soluciones acuosas hasta concentraciones 1 M de pH 7.0 - 8.5, titulando el Ibuprofeno con soluciones alcalinas de hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, hidróxido de magnesio, o bien por el agregado de dietanolamina, Tris(hidroximetil)aminometano (THAM) o arginina, lisina o histidina.

25 Debido a su estructura molecular, una vez solubilizado en el agua y dependiendo de su concentración, el Ibuprofeno se transforma en una molécula anfipática con propiedades surfactantes con dos formas o estructuras, una por debajo de su concentración micelas crítica (CMC) que es de alrededor de 180 mM (Amphiphilic association of ibuprofen and two nonionic cellulose derivatives in aqueous solution- Annika Ridell, Hans Evertsson, Stefan
30 Nilsson and Lars-Olof Sundeeof- Journal of Pharmaceutical Sciences. Volume 88, Issue 11, pages 1175-1181- Nov. 1999) y otra donde se encuentra por sobre su CMC donde se encuentra formando una micela.

Los estudios *in vitro* indican que, al igual que otros AINE, el ibuprofeno se fija en gran medida a la albúmina plasmática, aunque en bebés, esto parece ser significativamente menor (95%) en comparación con el plasma de adultos (99%). El ibuprofeno compite con la bilirrubina en la fijación a la albúmina. Especialmente en el suero de los recién nacidos esto
5 podría dar como consecuencia, que la fracción de bilirrubina libre podría aumentar con concentraciones altas de ibuprofeno.

En años recientes Hussein y Janabi publican un artículo (*In Vitro* Antibacterial Activity of Ibuprofen and Acetaminophen, J Glob Infect Dis. 2010 May-Aug; 2(2): 105-108), donde se habla sobre la actividad antibacteriana *in vitro* de Ibuprofeno y acetaminofeno. En este caso
10 se menciona que Ibuprofeno limita su actividad bactericida sólo a bacterias como *Escherichia coli* (Celik I, Akbulut A, Kilic SS, Rahman A, Vural P, Canbaz M, Felek S. Effects of ibuprofen on the physiology and outcome of rabbit endotoxic shock. BMC infectious diseases. 2002;2:26-38. Bernard GR, Wheeler AP, Russell JA, Schein R, Summer WR, Steinberg KP, et al. The effects of ibuprofen on the physiology and survival of patients with
15 sepsis. New Engl J Med. 1997. En este caso se demuestra que el Ibuprofeno presenta actividad antiinflamatoria sobre el pulmón de conejos infectados con *Pseudomonas aeruginosa*, pero no tiene efecto sobre la bacteria misma (Sordelli DO, Cerquetti MC, el-Tawil G, Ramwell PW, Hooke AM, Bellanti JA. Ibuprofen modifies the inflammatory response of the murine lung to *P. aeruginosa*. Eur J Respir Dis. 1985;67:1 18-27). En otra parte de
20 este trabajo se muestra que Ibuprofeno no presenta actividad sobre *Campylobacter pylori* en humanos (Graham DY, Klein PD, Opekun AR, Smith KE, Polasani RR, Evans DJ, et al. In vivo susceptibility of *Campylobacter pylori*. Am J Gastroenterol. 1989;84:233-8] y sobre *Mycobacterium tuberculosis* en los ratones (Byrne ST, Denkin SM, Zhang Y. Aspirin and ibuprofen enhance pyrazinamide treatment of murine tuberculosis. J Antimicrob
25 Chemoth. 2007;59:313-6). En dicho estudio no se demuestra una actividad importante del Ibuprofeno ya que tampoco se observó efecto sobre bacterias tipo *Serratia* ni en *Bacillus subtilis*, así los autores presentan una variable actividad inhibitoria del Ibuprofeno. Cabe destacar que los estudios *in vitro* fueron realizados vehiculizando el Ibuprofeno en etanol, una condición tal que cuando la solución madre se diluye en medio acuoso produce la
30 precipitación del propio Ibuprofeno.

En el trabajo de Sordelli y colaboradores (Sordelli DO, Cerquetti MC, el-Tawil G, Ramwell PW, Hooke AM, Bellanti JA. Ibuprofen modifies the inflammatory response of the murine lung to *Pseudomonas aeruginosa*, Eur J Respir Dis. 1985 Aug;67(2):1 18-27.) se muestra que la inyección del Ibuprofeno sódico, es capaz de reducir la capacidad inflamatoria

producida por una infección pulmonar de *P aeruginosa*, pero no afecta la actividad biológica de las bacterias.

En un trabajo reciente Juan D Guzman y colaboradores (BMJ open junio 5 del 2015 "Antitubercular specific activity of ibuprofen and the other 2-arylpropanoic acids using the HT-SPOTi whole-cell phenotypic essay) se muestra que una formulación de Ibuprofeno y otros antiinflamatorios no esteroideos presentan propiedades bactericidas para el tratamiento de la tuberculosis. Mediante un test denominado HT-SPOTi, demuestran que el Ibuprofeno, pero aún más activo aparece el derivado 3,5-dinitro-Ibuprofeno.

En otro trabajo publicado por el grupo del Dr. Ahmed Mohseni (Antibacterial, Anti-biofilm Activity of Some Non-steroidal Anti-Inflammatory Drugs and N-acetyl Cysteine against Some Biofilm Producing Uropathogens - American Journal of Epidemiology and Infectious Disease, 2015, Vol. 3, No. 1, 1-9) se muestra que drogas como los NSAID y N-actilcisteína afectan negativamente la adherencia de bacterias *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *P. aeruginosa* and *Proteus mirabilis* sobre la superficie de los catéteres de uso urológico afectando la formación de los indeseables biofilms como así también muestran un importante efecto bactericida, lo cual puede ser muy beneficioso en el uso de las infecciones producidas por aplicaciones de catéteres.

En otro trabajo llevado a cabo por la Dra Cidalia Pina-Vaz y colaboradores (Antifungal activity of ibuprofen alone and in combination with fluconazole against *Candida* species Journal Medical Microbiology - Vol 49, (2000) 831-840), se muestra que el ibuprofeno, solo o en combinación con fluconazol, son capaces de producir un marcado efecto antifúngico sobre distintas cepas de *Candida*, afectando la estabilidad de la membrana de modo de producir una marcada liberación de K intracelular que afecta la viabilidad del hongo

En otra patente US20120115897 A1, se describe la formación de un complejo entre ibuprofeno y derivados de esteres del ácido ascórbico donde se demuestra que esta formulación puede mejorar la solubilidad en agua, facilitar la administración endovenosa, reduciendo el tiempo de aplicación, haciendo que disminuya su efecto indeseado a nivel gastrointestinal aumentando su penetración en la barrera hematoencefálica, la cual puede ser aplicada en distintas patologías como artritis, esclerosis múltiple, fibrosis quística y neumonía, en el tratamiento del ductus arterioso en infantes prematuros, problemas de hipoxia cerebral y ciertos cánceres.

Una práctica habitual en el estado del arte es preparar ibuprofeno en metanol, lo que permite que en la dilución de las soluciones se produzca la precipitación del mismo.

También es habitual que este AINE se utilice de forma inyectable, esto trae como consecuencia dos problemas, el primero que el Ibuprofeno sódico presenta un fuerte efecto hemolítico, y segundo que el ibuprofeno rápidamente interacciona con albúmina, la proteína mayoritaria del plasma, que al acomplejarlo le inhibe fuertemente su actividad bactericida como se demuestra en los estudios de la presente memoria, donde claramente se demuestra que, en función de la concentración de Albúmina presente en el medio, decae la actividad bactericida del ibuprofeno.

Además, la patente US 20130178448 A1 describe una formulación de administración oral de ibuprofeno el cual se encuentra en presencia de diferentes tipos de lípidos como triglicéridos u otros tipos de ácidos grasos y alcohol, la cual puede ser administrada en forma líquida o en tabletas para ser ingeridas por boca en animales de modo que permitan alcanzar elevados niveles de Ibuprofeno en sangre para el tratamiento de enfermedades de origen pulmonar. La presente memoria demuestra que cuando el ibuprofeno es solubilizado en una emulsión de triglicéridos, al igual que lo que ocurre con su interacción con albúmina, pierde completamente su actividad bactericida.

Como se mencionó previamente, cuando el Ibuprofeno se solubiliza en agua, adquiere propiedades surfactantes, por lo tanto, puede interaccionar con membranas lipídicas afectando su estabilidad. La interacción entre Ibuprofeno y lípidos y su toxicidad depende del estado de agregación del Ibuprofeno. Se ha mencionado que a concentraciones superiores a su CMC Ibuprofeno puede dañar la integridad de las membranas lipídicas.

Por otra parte, existen antecedentes del uso de solución salina para el tratamiento de afecciones de las vías respiratorias por medio de nebulizaciones, en particular para el tratamiento de la fibrosis quística se utiliza la nebulización conjunta con antibióticos, siendo el más común la tobramicina. Además, existen antecedentes del uso de ibuprofeno como desinflamatorio para las mismas afecciones, pero por lo general mediante administración oral o endovenosa. Cabe destacar que para pacientes que padecen fibrosis quística, en general niños, el uso continuo de AINES provoca efectos adversos que suelen complicar el cuadro de la patología. Por otra parte, tal como se detalla en la presente memoria existen antecedentes que sugieren el uso de ibuprofeno como bactericida, aunque el estado del arte insinúa que no sería apropiado para ser usado contra *P. aeruginosa* ni contra *Burkholderia cepacia*. Por último, un artículo publicado en Journal of Aerosol Medicine and Pulmonary Drug Delivery en marzo de 2009: "Analgesic Effect from Ibuprofen Nanoparticles Inhaled by Male Mice" divulga la nebulización de ibuprofeno sólido arrastrado por vapor a ratas

evaluando su efecto antiinflamatorio y demostrando que se requiere entre 3 y 5 veces menos de concentración para que tenga un efecto equivalente al dosificado en forma oral.

La presente invención provee de una composición susceptible de ser administrada por nebulización para el tratamiento de la fibrosis quística que presenta un efecto inesperado y sorprendente al actuar como bactericida de bacterias tipo Gram + y Gram-, en especial con capacidad de inhibir bacterias como *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *B. cepacia* y además presenta efecto virucida sobre aquellos virus con envoltura lipídica. Siendo, la composición de la presente invención, muy simple y de efectos adversos insignificantes, frente al uso continuo de los antibióticos usuales para el tratamiento de esta enfermedad. Uno de los efectos técnicos de la presente invención es que el efecto bactericida del ibuprofeno se ha multiplicado por 5 veces al estar en solución hipertónica de ClNa, tal como puede observarse en el ejemplo 11 de la presente memoria. Además los inventores han demostrado mediante ejemplos de aplicación de la presente invención, la capacidad del Ibuprofeno por sobre y especialmente por debajo de su concentración micelar crítica (CMC), para desestabilizar membranas de diferentes bacterias Gram + y Gram- y aquellos virus con envoltura lipídica, de modo que afectan su actividad biológica, lo que permite redefinir, gracias a la presente invención, al Ibuprofeno como un agente bactericida y virucida, en combinación con solución salina.

20 Breve descripción de la invención

La composición farmacéutica bactericida y virucida, de aplicación sobre epitelios de tejidos como pulmonar, nasal y bucal, objeto principal de la presente invención, comprende un anti-inflamatorio no esteroideo (AINE) en una concentración entre 5 y 500 mM solubilizado en solución salina, preferentemente hipertónica que comprende una concentración de entre 0,3 y 2 Molar de NaCl que puede ser ClK; más preferentemente entre 0,4 y 1,1 Molar de NaCl; más preferentemente aún entre 0,9 y 1,05 Molar de NaCl. Su forma de administración es seleccionada del conjunto comprendido por inhalación, nebulización, enjuague bucal y tópica. Donde dicho anti-inflamatorio no esteroideo (AINE) comprende, preferentemente una concentración entre 5 y 180 mM; más preferentemente menor a 180 mM; más preferentemente aún entre 5 y 50 mM. Donde dicho anti-inflamatorio no esteroideo es arilpropiónico seleccionado del conjunto comprendido por Ibuprofeno, naproxeno, flurbiprofeno, ketoprofeno, diclofenac, diflunisal, etodolac, fenoprofen, indometacina, meclofenamato, mefenamic ácido, meloxicam, nabumetone, oxaprozin, piroxicam, sulindac, tolmetin, celecoxib, salicilatos acetilados, salicilatos no acetilados, y sus combinaciones;

preferentemente ibuprofeno. Y donde sus contraiones son los cationes monovalentes seleccionados del conjunto comprendido por sodio, potasio, litio y combinaciones de los mismos. Además, dicha composición comprende un pH en solución acuosa de entre 6,0 y 8,5; preferentemente entre 7,0 y 8,0; más preferentemente entre 7,5 y 7,9.

- 5 Además, la presente invención puede materializarse ya sea en estado líquido, o como polvo o liofilizado, mediante un secado o una liofilización respectivamente, a partir de la solución acuosa hipertónica de dicha composición farmacéutica.

En una forma preferida de realización la presente invención además comprende un agente anestésico seleccionado del conjunto comprendido por xilocaína, lidocaína, carticaína,
10 mepivacaína y sus mezclas.

La presente invención es una composición farmacéutica para el tratamiento de fibrosis quística en aplicación nebulizada para llegar a los pulmones, así como también para el tratamiento de infecciones virales tipo Herpes simplex, aplicada sobre piel afectada. También puede usarse como enjuague bactericida bucal.

- 15 En una forma preferida de llevar a la práctica la presente invención para el tratamiento de la fibrosis quística dicha composición farmacéutica está en ausencia de antibióticos usuales para esta enfermedad. Estos antibióticos usuales son, entre otros colistimetato de sodio, tobramicina, ciprofloxacino, aztreonam lisina, levofloxacino, ciprofloxacino, fosfomicina, anfotericina B, vancomicina, gentamicina, ceftazidima, ampicilina y amikacina y sus mezclas.

- 20 En otra manera alternativa de llevar a la práctica la presente invención dicha composición además comprende dichos antibióticos usuales.

El proceso de elaboración de dicha composición farmacéutica bactericida y virucida, de aplicación sobre epitelios de tejidos como pulmonar, nasal y bucal, otro objeto de la presente invención, comprende los siguientes pasos:

- 25 a. se mezcla dicho AINE con agua y se agita para mantener la suspensión de dicho AINE;

- b. se agrega NaOH hasta alcanzar un pH comprendido entre 6,8 y 8,5 con suave agitación, de modo de permitir la completa solubilización de dicho AINE hasta obtener una concentración de entre 1 y 100 mg/mL; preferentemente, se deja reposar a temperatura
30 ambiente durante, al menos, 12 hs.;

- c. sobre la preparación del paso b. se agrega una solución salina hipertónica de NaCl con una concentración de entre 0,3 y 2 M;

d. la preparación del paso d. se filtra mediante poro de 0,22 micras.

En una forma preferida de realización de la presente invención dicho proceso comprende además el siguiente paso:

e. la solución filtrada del paso d. se liofiliza;

5 Por último, luego del paso e es posible agregar el paso siguiente:

f. al momento de su aplicación, ya sea para ser vehiculizada a pulmón mediante nebulizador o para ser aplicada en boca como enjuague bucal, la composición liofilizada del paso e. se resuspende en agua o en una solución glucosada al 5%.

La presente invención provee una composición farmacéutica bactericida y virucida, de
10 aplicación sobre epitelios de tejidos como pulmonar, nasal y bucal, que comprende un anti-inflamatorio no esteroideo (AINE) y una sal. Donde, preferentemente comprende una relación molar entre dicho AINE y dicha sal de entre 1:0,6 y 1:400, más preferentemente entre 1:10 y 1:100 y donde dicha sal es seleccionada del grupo comprendido por cloruro de Sodio, Potasio y sus combinaciones. Y preferentemente tal composición comprende una
15 formulación farmacéutica para ser diluida en agua en ausencia de cualquier otro componente. Y donde preferentemente comprende una formulación farmacéutica para el tratamiento de la fibrosis quística. Y donde preferentemente comprende una formulación farmacéutica para el tratamiento del Herpes Simplex. Y donde preferentemente comprende una formulación farmacéutica para enjuague bucal.

20

Breve descripción de las Figuras

Figura N° 1: Estructura química de Ibuprofeno.

Figura N° 2: Estructura química de la TOBRAMICINA.

Figura N° 3: Resultados del ejemplo 4: Efectividad bactericida de soluciones de
25 IBUPROFENO SÓDICO (IBUPROFENATO SÓDICO o SAL SÓDICA DE IBUPROFENO) **IBU-Na** e IBUPROFENO (IBUPROFENO PROTONADO) **IBU-H** en *P. aeruginosa*.

Figura N° 4: Resultados del ejemplo 5: Efectividad bactericida de soluciones de IBU-Na.

Figura N° 5: Resultados del ejemplo 6: Efecto antimicrobiano del IBU-Na sobre *P. aeruginosa* en función del tiempo.

30 Figura N° 6: Resultados del ejemplo 7. Efecto antimicrobiano del IBU-Na sobre *P. aeruginosa* a diferentes valores de pH.

Figura N° 7: Resultados del ejemplo 8. Efecto antimicrobiano del IBU-Na sobre distintas cepas bacterianas.

Figura N° 8: Resultados del ejemplo 9. Efecto antimicrobiano del IBU-Na a distintas concentraciones sobre las 3 cepas bacterianas principales que se encuentran asociadas a la enfermedad Fibrosis Quística (FQ).

Figura N° 9: Resultados del ejemplo 10. Efecto antimicrobiano del NAPROXENO en una población de *Burkholderia cepacia*.

Figura N° 10: Resultados del ejemplo 11. Efecto de la fuerza iónica (CINa) sobre un cultivo de *P. aeruginosa*.

Figura N° 11: Resultados del ejemplo 12. Efecto de la composición de la presente invención, que comprende IBU-Na con fuerza iónica (CINa 1M) sobre un cultivo de *P. aeruginosa*.

Figura N° 12: Resultados del ejemplo 13. Efecto bactericida de la composición de la presente invención, que comprende una solución de Ibuprofeno hipertónica en función del tiempo.

Figura N° 13: Resultados del ejemplo 14. Efecto de la composición de la presente invención que comprende IBU-Na con fuerza iónica sobre un cultivo de *P. aeruginosa* a variando el tiempo de tratamiento (minutos).

Figura N° 14: Resultados del ejemplo 15. Efecto de la composición de la presente invención que comprende ibuprofeno (IBU-Na) con fuerza iónica (CINa 1M) sobre un cultivo de tres cepas bacterianas.

Figura N° 15: Resultados del ejemplo 16. Efecto de la presencia de ALBUMINA humana sobre la actividad bactericida del IBU- Na [20 mM] en medio con fuerza iónica (CINa 1M).

Figura N° 16: Resultados del ejemplo 17. Efecto del LIPOVENOS en presencia de Fuerza Iónica (CINa 1M) sobre un cultivo de *P. aeruginosa*.

Figura N° 17: Resultados del ejemplo 19. Efecto antimicrobiano de la TOBRAMICINA en función de la concentración y del tiempo de contacto sobre *P. aeruginosa*.

Figura N° 18: Resultados del ejemplo 20. Efecto antimicrobiano de la TOBRAMICINA en presencia de fuerza iónica sobre *P. aeruginosa*.

Figura N° 19: Resultados del ejemplo 21. Efecto antimicrobiano del IBU-Na y la TOBRAMICINA en presencia de fuerza iónica sobre un biofilm artificial de *P. aeruginosa*.

Descripción detallada de la invención

La composición farmacéutica bactericida, que además tiene efectos virucidas, que se aplica sobre epitelios de tejidos como pulmonar, nasal y bucal, objeto principal de la presente invención, comprende un anti-inflamatorio no esteroideo (AINE) y una sal; donde dicho AINE se encuentra en una concentración entre 5 y 500 mM y solubilizado en solución salina de dicha sal. Donde dicha solución salina es preferentemente hipertónica que comprende una concentración de entre 0,3 y 2 Molar de una sal que preferentemente es NaCl, pero puede ser cualquier sal apta para el consumo humano tal como cloruro de potasio; más preferentemente entre 0,4 y 1,1 Molar de NaCl; más preferentemente aún entre 0,9 y 1,05 Molar de NaCl. Su forma de administración es seleccionada del conjunto comprendido por inhalación, nebulización, enjuague bucal y tópica. Donde dicho anti-inflamatorio no esteroideo (AINE) comprende, preferentemente una concentración entre 5 y 180 mM; más preferentemente menor a 180 mM; más preferentemente aún entre 5 y 50 mM. Donde dicho anti-inflamatorio no esteroideo es seleccionado del conjunto comprendido por Ibuprofeno, naproxeno, flurbiprofeno, ketoprofeno, diclofenac, diflunisal, etodolac, fenoprofen, indometacina, meclofenamato, mefenamic ácido, meloxicam, nabumetone, oxaprozin, piroxicam, sulindac, tolmetin, celecoxib, salicilatos acetilados, salicilatos no acetilados, y sus combinaciones; preferentemente ibuprofeno. Y donde sus contraiones son los cationes monovalentes seleccionados del conjunto comprendido por sodio, potasio, litio y combinaciones de los mismos. Además, dicha composición comprende un pH en solución acuosa de entre 6,0 y 8,5; preferentemente entre 7,0 y 8,0; más preferentemente entre 7,5 y 7,9.

En una forma preferida de la presente invención dicha composición farmacéutica comprende ibuprofeno o ibuprofeno sódico en una concentración de 50 mM en una solución salina hipertónica de 1 M de ClNa.

Además, la presente invención puede materializarse ya sea en estado líquido, o como polvo o liofilizado, mediante un secado o una liofilización respectivamente, a partir de la solución acuosa hipertónica de dicha composición farmacéutica. Tanto el proceso de secado como de liofilizado de composiciones farmacéuticas es ampliamente conocido en el estado de la técnica, por lo que no se considera necesario brindar mayores detalles al respecto.

En una forma preferida de realización la presente invención además comprende un agente anestésico. El efecto anestésico puede acompañar la composición de la presente invención para calmar el dolor y la molestia que provoca la fibrosis quística, pero por sobre todo cuando se utiliza para el tratamiento de virus tales como los Herpex. Tal agente anestésico

puede ser cualquiera de los aceptados para uso farmacéutico. Entre los que se prefieren para la presente invención se encuentran: xilocaína, lidocaína, carticaína, mepivacaína y sus mezclas.

La presente invención es una composición farmacéutica que es útil para el tratamiento de fibrosis quística en aplicación nebulizada para llegar a los pulmones. En esta tremenda patología que afecta particularmente a niños, la presente invención presenta ventajas nunca antes reportadas, pues con muy bajas dosis de AINE se logra no sólo un efecto antiinflamatorio, sino bactericida y virucida, que no genera mucosidad resistente y que actúa, aunque la misma ya exista. La presente invención también es de aplicación en el tratamiento de infecciones virales tipo Herpes simplex, aplicada sobre piel afectada. La presente invención también tiene efecto como enjuague bactericida bucal. La combinación de la fuerza iónica con la presencia del AINE logra, con muy bajas dosis un efecto bactericida y virucida nunca antes reportado, que tiene como efecto técnico el uso de muy bajas concentraciones de AINE y la consecuente drástica disminución de efectos adversos comunes en estos antiinflamatorios.

En una forma preferida de llevar a la práctica la presente invención para el tratamiento de la fibrosis quística dicha composición farmacéutica está en ausencia de antibióticos usuales para esta enfermedad. Estos antibióticos usuales son, entre otros colistimetato de sodio, tobramicina, ciprofloxacino, aztreonam lisina, levofloxacino, ciprofloxacino, fosfomicina, anfotericina B, vancomicina, gentamicina, ceftazidima, ampicilina y amikacina y sus mezclas.

En otra manera alternativa de llevar a la práctica la presente invención dicha composición además comprende dichos antibióticos usuales.

El proceso de elaboración de dicha composición farmacéutica bactericida y virucida, de aplicación sobre epitelios de tejidos como pulmonar, nasal y bucal, otro objeto de la presente invención, comprende los siguientes pasos:

- a. se mezcla dicho AINE con agua y se agita para mantener la suspensión de dicho AINE;
- b. se agrega NaHO hasta alcanzar un pH comprendido entre 6,8 y 8,5 con suave agitación, de modo de permitir la completa solubilización de dicho AINE hasta obtener una concentración de entre 1 y 100 mg/mL;
- c. se deja reposar a temperatura ambiente durante, al menos, 12 hs.;
- d. sobre la preparación del paso c. se agrega una solución salina hipertónica de NaCl con una concentración de entre 0,2 y 2 M;

e. la preparación se filtra mediante poro de 0,22 micras

En una forma preferida de realización de la presente invención dicho proceso comprende además el siguiente paso:

f. la solución filtrada del paso e. de la reivindicación 11 se liofiliza;

5 Por último, luego del paso f es posible agregar el paso siguiente:

g. al momento de su aplicación, ya sea para ser vehiculizada a pulmón mediante nebulizador o para ser aplicada en boca como enjuague bucal, la composición liofilizada del paso f. se resuspende en agua destilada o en una solución glucosada al 5%.

10 **Estudios para caracterizar las propiedades bactericidas del AINE y de la composición de la presente invención.**

Existen numerosos y variados métodos de laboratorio que pueden ser usados para determinar "in vitro" la susceptibilidad de bacterias a diferentes agentes antimicrobianos como ensayos en placa de halos inhibitorios de crecimiento, test de crecimiento/inhibición en caldos nutritivos, kits comerciales, antibiogramas, etc.

15 En este caso, los ensayos se desarrollaron sobre un soporte líquido no nutritivo (solución buffer) donde se mezcla el agente antimicrobiano con inóculos cuantificados de cultivos bacterianos puros. Luego de distintos tiempos de incubación, el material se siembra en placas de agar para poder realizar los ensayos de cuantificación de la cantidad de bacterias que sobreviven al tratamiento

En los Ejemplos que se detallan más adelante, se describen las generalidades de los ensayos, que contiene entre otras, las actividades preliminares de acondicionamiento de cepas de trabajo, insumos, materiales y métodos, análisis de resultados obtenidos de la actividad biológica.

25 **Estudios para caracterizar las propiedades virucidas del AINE y de la composición de la presente invención.**

En el caso de la evaluación de la actividad virucida del AINE, preferentemente Ibuprofeno, se llevaron a cabo los estudios como se describió en Alasino y colaboradores en 2007. En este caso, las distintas cepas de virus con envoltura lipídica se incuban con cantidades crecientes de Ibuprofeno durante un período de tiempo que oscila entre 60 y 120 minutos. 30 Luego este material se incuba con células en cultivo que son susceptibles al ataque de estos

virus, presentando un marcado efecto citopático (formación de agregados celulares (rosetas) o bien muerte celular) que se puede detectar por observación al microscopio óptico

Potenciales aplicaciones de la presente invención en distintas patologías infecciosas

5 En la presente invención se describe una composición de Ibuprofeno sódico solo, o asociado a una solución salina hipertónica pH entre 6,8 y 8,2, que presenta propiedades bactericidas contra diferentes bacterias como *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas fluorescens*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* (Gram +), *Staphylococcus aureus* (Gram +), *Enterococcus*
10 *faecalis* (Gram +) y virucidas que produce la inactivación de aquellos virus con envoltura lipídica como, virus de la diarrea bovina, Herpes virus tipo I y II, virus de estomatitis vesicular, virus de la hepatitis C, virus de la varicela.

Las aplicaciones de la composición de la presente invención con propiedades bactericidas y virucidas, alcanzan enfermedades infecciosas de tipo bacterianas que afectan directamente
15 a mucosas como la bucal, la pulmonar, o bien virales como las infecciones por Herpes virus tipo I a nivel labial, bucal, o vaginal, como así también en el caso de la expresión cutánea de Herpes virus tipo II.

Ventajas de la composición de la presente invención en el tratamiento de diferentes infecciones

20 El uso de estas propiedades bactericidas de una solución de IBU sola, preferentemente en combinación con una solución hipertónica, puede ser aplicado para el tratamiento infecciones bacterianas, y especialmente aquellas a nivel pulmonar producidas por bacterias del tipo de *P aeruginosa*, que es capaz de producir biofilms, como en el caso de la Fibrosis Quística, una patología que resulta muy difícil de eliminar. La composición de la presente
25 invención, puede presentarse en forma líquida, lo que hace que la misma pueda ser aplicada mediante un sistema de nebulización standard. Los nebulizadores son los dispositivos de elección para la administración vía pulmonar de fármacos. Los actuales nebulizadores, trabajan mediante pulsos de ultrasonido que es aplicado a una solución para producir una nube en la que se encuentran los fármacos a vehiculizar. Los pacientes
30 respiran normalmente esta nube durante varios minutos hasta que se agota la solución, la cual normalmente es de 1 a 5 mL por nebulización, lo cual presenta algunas ventajas como se menciona a continuación.

- En este caso la droga alcanzaría directamente al pulmón haciendo más

efectiva su concentración en el órgano blanco para actuar sobre las bacterias *P aeruginosa*, *S aureus* metilicino resistente y *B cepacia* como se detalla en los ejemplos que se mencionan más adelante.

- Evitaría el empleo sistémico de AINES y de antibióticos, ya que al entrar en sangre se produce una dilución que afecta la concentración efectiva en el órgano blanco.

- Se evita que el AINE tenga contacto con componentes del plasma y más específicamente con la proteína albúmina con quien interacciona fuertemente y podría reducir su actividad bactericida.

- Especialmente el hecho de que el IBU, es una molécula de carácter aniónica, no presenta interacción con los biopolímeros fuertemente aniónicos como Alginato y ADN, materiales mayoritarios que se encuentran presentes en el biofilm que aparece en esta patología, como puede ocurrir con los antibióticos usados actualmente como es la Tobramicina (Figura 2) que presenta 5 grupos aminos primarios en su estructura.

- El hecho que la presente invención comprenda ibuprofeno junto con una solución de alta fuerza iónica, permite tal cual se demuestra en la presente memoria, aumentar 5 veces la eficacia del poder bactericida, disminuir el tiempo de contacto para ejercer la propiedad bactericida de horas a escasos minutos.

- La composición de la presente invención, al presentar una solución salina hipertónica permite que la misma pueda actuar no sólo como un agente fluidificador del biofilm, sino que presenta un contundente efecto bactericida, además de su efecto antiinflamatorio ya conocido.

En el caso particular del efecto bactericida de la composición de la presente invención en epitelio bucal, la ventaja de esta formulación sobre las actuales formulaciones antisépticas reside en que aquellas que utilizan Clorhexidina con el tiempo producen una coloración en los dientes, mientras que no ocurre con el uso del Ibuprofeno. Por otra parte, la composición de la invención puede ser utilizada en infecciones bucales o labiales producidas por virus Herpes Simplex Tipo I ya que además de su efecto antiviral aporta su efecto antiinflamatorio durante el tratamiento, una condición deseada para aliviar las molestias durante la infección.

El proceso para elaborar la composición de la presente invención

Dicha composición de la invención comprende al menos un agente bioactivo como son los AINES solubilizado en medio acuoso que además de la clásica propiedad antiinflamatoria, en la presente invención, presenta propiedades bactericidas y virucidas cuando dicho AINE se encuentra formulado en una concentración que se encuentra por debajo de su

concentración micelar crítica y en presencia de solución salina. El proceso de elaboración de dicha composición comprende a modo de ejemplo, las siguientes etapas:

- se coloca AINE en un recipiente al que se le agrega agua y se agita para mantener la suspensión de AINE,

5 · luego se le agrega una solución básica como NaHO hasta alcanzar un pH comprendido entre 7,0 - 8,5 con suave agitación, de modo de permitir la completa solubilización de dicho AINE. Preferentemente se deja reposar a temperatura ambiente durante, al menos, 12 hs.

10 · La preparación se diluye hasta alcanzar la concentración de AINE deseada para el tratamiento elegido.

- Sobre la preparación anterior se agrega solución salina de NaCl comprendida en un rango entre 0,2 y 2 M

- la preparación se filtra mediante poro de 0,22 micras

15 · El material esterilizado puede ser finalmente liofilizado para su conservación o bien mantenido en estado líquido hasta su uso.

- Finalmente, al momento de su aplicación, ya sea para ser vehiculizada a pulmón mediante nebulizador, o para ser aplicada en boca como enjuague bucal, el AINE liofilizado se resuspende en el volumen original de: a- agua destilada, b- en una solución glucosada al 5%.

20 Dicho AINE puede ser seleccionado del conjunto comprendido por arilpropiónico seleccionado del conjunto comprendido por Ibuprofeno, naproxeno, flurbiprofeno, ketoprofeno, diclofenac, diflunisal, etodolac, fenoprofen, indometacina, meclofenamato, mefenamic ácido, meloxicam, nabumetone, oxaprozin, piroxicam, sulindac, tolmetin, celecoxib, salicilatos acetilados, salicilatos no acetilados, y sus combinaciones.

25 Se prefieren las sales de dichos AINES tales como de Na, I o K. Es por ello que al agregarle la solución de hidróxido de sodio se forma la sal del AINE. Preferentemente se utiliza ibuprofeno sódico (IBU-Na), que presenta mayor solubilidad en solución acuosa que el ibuprofeno protonado (IBU-H).

30 La composición de la presente invención, comprende AINE en polvo, preferentemente ibuprofeno sódico, y sal de Na o K en una relación molar de AINE:sal de entre 1:0,6 y 1:400, preferentemente entre 1:10 y 1:100. Este polvo se puede diluir en agua para obtener la formulación farmacéutica de la invención.

En la presente memoria descriptiva el IBUPROFENO es en cualquiera de sus formas. En particular el IBUPROFENO PROTONADO se identificará con la siguiente denominación: **IBU-H**.

- 5 Mientras que el IBUPROFENO SÓDICO, también conocido como IBUPROFENATO SÓDICO o SAL SÓDICA DE IBIPROFENO será identificado como **IBU-Na** en la presente memoria descriptiva. Este ibuprofeno sódico puede estar libre de agua, en forma de mono hidrato o en forma de dihidrato.

EJEMPLOS

10 Ejemplo 1

Preparación de las soluciones para los ensayos que se realizan en la presente memoria y en los siguientes ejemplos.

- 15 A continuación, se detallan modos de preparación de los componentes utilizados para la realización de la presente invención, que resultan ser los mejores conocidos por los inventores, pero que no son los únicos posibles.

Preparación de las soluciones IBU-H: Se disuelve Ibuprofeno sólido (20 g en etanol puro hasta completar 100 mL), esto representa una solución de IBU-H 1M. En los estudios sobre la actividad de estas formulaciones se utiliza una solución que, puesta en el medio de cultivo no supere el 5% una concentración de etanol que no afecta la viabilidad de las bacterias.

- 20 **Preparación de la solución de IBU-Na:** la solución madre de IBU-Na se prepara pesando 20 gr de Ibuprofeno, se agrega agua hasta los 50 mL, y luego con una solución de NaHO 4M se agrega cantidad suficiente para alcanzar un pH comprendido entre 7 y 8 y finalmente se enrasa a 100 mL para alcanzar una concentración final de 1 M de IBU-Na.

- 25 **Preparación de la solución de Naproxeno:** la solución madre de Naproxeno se prepara pesando 23 gr de Naproxeno, se agrega agua hasta los 50 mL, y luego con una solución de NaHO 4M se agrega cantidad suficiente para alcanzar un pH comprendido entre 7 y 8 y finalmente se enrasa a 100 mL para alcanzar una concentración final de 1 M de Naproxeno.

Preparación de la composición favorita de la presente invención:

- 30 Se siguen los siguientes pasos para la obtención de las distintas soluciones utilizadas para los ejemplos que siguen:

a. 2 gr de Ibuprofeno, se colocan en un Erlenmeyer a los que se le agrega 5 mL de agua y se agita para mantener la suspensión de Ibuprofeno,

- b. luego se le agrega NaHO 4 M hasta alcanzar un pH comprendido entre 7,0 - 8,5 con suave agitación, de modo de permitir la completa solubilización del IBU y finalmente se enrasa a 10 mL para lograr una concentración de 200 mg/mL. Se deja reposar a temperatura ambiente durante, al menos, 12 hs.
- 5 c. La preparación se diluye hasta alcanzar la concentración de IBU-NA deseada para el tratamiento elegido, según el ejemplo.
- d. Sobre la preparación anterior se agrega la solución salina hipertónica para llegar a una concentración de NaCl 1 M
- e. la preparación se filtra mediante poro de 0,22 micras.
- 10 Para la obtención de la composición de la presente invención para la aplicación en los ensayos que se realizan en los ejemplos que siguen se llega, mediante el procedimiento descrito a composiciones de entre 1 y 100 mM de IBU-Na y soluciones hipertónicas que llegan a presentar una concentración final de 1 M de ClNa. Los procedimientos utilizados son los habituales en la práctica de laboratorio al realizar diluciones.

15

Ejemplo 2

Activación y conservación del stock de cepas bacterianas de trabajo

Se utilizaron cepas comerciales liofilizadas ATCC (KWIK-STIK Microbiologics) activadas en tubos conteniendo 10 mL de medio BHI Brain Heart Infusión (Biokar BK015HA) a 37° C

20 durante 24 hs.

Composición en g/L:

• Infusión de cerebro y corazón	17,5
• Peptona	10
• Glucosa	2
• Cloruro de sodio	5
• Fosfato disódico	2,5

Preparación: Se disuelven 37 g del medio formulado en 1 L de agua destilada, se calienta hasta su completa disolución y ajusta el pH a $7,4 \pm 0,2$ a 25° C; finalmente se esteriliza por autoclave durante 15 minutos a 121°C.

25 Posterior al tiempo de activación de cada cepa en el medio referido y habiendo observado

crecimiento efectivo por turbidez cercano al patrón 0,5 de la escala Me Farland, se aditivo a cada cultivo un 10% v/v de glicerol estéril como crioprotector; luego se distribuyó el contenido de cada tubo en alícuotas de 1 ml en tubos eppendorf de 1,5 mL. Estos fueron identificados como cepas stock y se conservaron a ultrabaja temperatura en freezer a -70° C (Ultra low temperature freezer Sanyo MDFU70V) para disponer de una reserva adecuada de cada cepa de trabajo.

Ejemplo 3

Ensayos de actividad antimicrobiana del IBU

- 10 Se realizaron pruebas de efectividad de IBU a diferentes concentraciones, tiempos de acción, fuerza iónica, variaciones de pH y con diversas poblaciones bacterianas; además se midieron concentraciones efectivas del antibiótico comercial Tobramicina (Figura 2)

Metodología de los ensayos

- 15 El trabajo consistió en incubar poblaciones bacterianas de carga conocida en términos de UFC/mL, con los compuestos mencionados en diferentes concentraciones molares. Se organizaron baterías de ensayos "in vitro" a diferentes dosis o concentraciones y en tubos Eppendorf de 1,5 mL sin adicionar medio de cultivo. Para ello se trabajó con un buffer fosfato PBS 100 mM que mantuvo las condiciones fisiológicas durante el período de duración de cada ensayo a 37° C.

20

Composición del Buffer PBS 100 mM:

- | | | |
|----|---|---------------------------------|
| 25 | * | 8 g (137 mM) NaCl |
| | * | 0,2 g (2,7 mM) KCl |
| | * | 1,44 g (10 mM) NaHPO |
| | . | 0,24 g (2mM) KH ₂ PO |
| | * | 1000 mL agua Milli Q |

- Al finalizar el tiempo de cada ensayo, se tomaron alícuotas de 100 uL y diluciones decimales de cada tubo que fueron sembradas en placas de Petri para recuento directo de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) en medio Mueller Hinton agar (MHA) aplicando el método estandarizado de difusión por placa fluida o vertida.
- 30

A cada placa se le adicionaron 5 uL de una solución de colorante metabólico cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio (TTC) al 1% para mejorar el contraste de las colonias. Las placas fueron incubadas invertidas en estufa de cultivo por 24- 48 hs a 37° C y posteriormente se procedió al recuento directo con ajuste por factores de dilución y siembra para informar los resultados en términos de UFC/mL.

La composición en g/L del medio es:

Peptona	17,5
Almidón	1,5
Extracto de carne	4
Agar	15

Preparación:

Se disuelven 22,5 g del producto formulado en 1 L de agua destilada y se lleva a ebullición.

Se ajusta el pH a $7,3 \pm 0,2$ a 25° C y esteriliza en autoclave durante 15 minutos a 121°C.

Durante los ensayos, el medio se conservó fundido en baño termostatzado entre 45-50° C porque la técnica de siembra requiere embeber e integrar las bacterias en el medio. Una vez solidificadas, las placas fueron incubadas invertidas durante un tiempo establecido de 24-48 hs antes de proceder al recuento de cada una a los fines de conocer las concentraciones efectivas en cada caso y así poder establecer comparaciones con otros tratamientos.

Ejemplo 4:

Efectividad bactericida de soluciones de IBU-Na e IBU-H en *P. aeruginosa*

Se muestran los resultados de un ensayo con soluciones de IBU-Na e IBU-H a distintas concentraciones molares crecientes sobre una población de *P. aeruginosa* durante un tiempo de incubación de 4 hs a 37° C y posterior siembra en placa.

Para realizar el ensayo de efectividad bactericida de la solución de IBU-H se garantizó una concentración final de etanol EtOH < 5 % para evitar la acción bactericida propia del disolvente.

IBU

P. aeruginosa (UFC/mL \pm 10)

[mM]	IBU- Na	IBU- H
0 (Control)	1.700.000	1.700.000
1	1.700.000	1.700.000
5	1.700.000	1.700.000
10	760.000	480.000
20	300.000	200.000
50	50	1000
100	10	10

Ver Figura 3, donde los resultados de este ensayo demuestran que el IBU-Na tiene mayor capacidad bactericida que el IBU-H.

5 Ejemplo 5

Efectividad bactericida de soluciones de IBU-Na

En este ejemplo, se muestran los resultados de un ensayo con soluciones de IBU-Na a distintas concentraciones molares crecientes sobre 3 poblaciones de la misma cepa (*P. aeruginosa*) por un tiempo de incubación de 4 hs a 37° C y posterior siembra en placa.

10

IBU-Na	<i>P. aeruginosa</i> (UFC/mL \pm 10)		
[mM]	Población A	Población B	Población C
0 (Control)	200.000	20.000	2.000
1	200.000	20.000	2.000
5	150.000	17.000	1.800
10	100.000	3.500	800
20	20.000	400	50
30	500	40	10
40	100	10	10
50	10	10	10
100	10	10	10

Según se puede observar en la Figura 4, la conclusión de este estudio muestra que la dosis

efectiva de IBU- Na depende de la carga bacteriana.

Ejemplo 6

Efecto antimicrobiano del IBU-Na sobre *P. aeruginosa* en función del tiempo

Se caracterizó el efecto del IBU- Na sobre la misma cepa de *P. aeruginosa* a una
 5 concentración fija de bacterias variando la concentración y el tiempo de contacto del IBU. El
 ensayo se realizó a 37° C y posteriormente las muestras fueron sembradas en placa.

IBU- Na [mM]	Recuentos de <i>P. aeruginosa</i> (UFC/mL \pm 10) en función de los tiempos de tratamiento		
	1 hora	4 horas	Over Night (O.N.)
0 (Control)	2.000.000	2.000.000	2.000.000
1	2.000.000	2.000.000	2.000.000
2,5	2.000.000	1.800.000	2.000.000
5	1.700.000	1.300.000	1.000.000
10	1.000.000	1.000.000	900.000
25	500.000	250.000	100.000
50	100.000	30	10
100	2.000	10	10

Según se puede observar en la Figura 5, estos resultados muestran que se requiere un
 cierto tiempo de contacto o tratamiento con IBU- Na para obtener el efecto antimicrobiano;
 10 éste fue estandarizado para la mayoría de los ensayos en 4 horas.

Ejemplo 7

Efecto antimicrobiano del IBU-Na sobre *P. aeruginosa* a diferentes valores de pH.

Estudio sobre el efecto del pH del medio de incubación del ensayo sobre el potencial
 15 bactericida de una solución 50 mM de IBU- Na incubada durante 4 hs a 37° con un inóculo
 de *P. aeruginosa*

IBU- Na [mM]	<i>P. aeruginosa</i> (UFC/mL \pm 10)		
	pH 6,8	pH 7,3	pH 7,8
0 (Control)	200.000	200.000	200.000

50	10	10	600
----	----	----	-----

Según se puede apreciar en la Figura 6, el resultado muestra que IBU- Na actúa como antimicrobiano en el rango de valores fisiológicos de pH.

5 Ejemplo 8

Efecto antimicrobiano del IBU-Na sobre distintas cepas bacterianas

Efecto antimicrobiano del IBU-Na a dos concentraciones de ensayo [50 y 100 mM] sobre la viabilidad de cepas bacterianas Gram Positivas y Negativas, durante 4 horas de contacto a 37° C.

Microorganismo		Recuento de Colonias (UFC/mL \pm 10)		
		Controles	IBU- Na 50 mM	IBU- Na 100 mM
A	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2.000.000	100	10
B	<i>Burkholderia cepacia</i>	1.300.000	680	10
C	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	100.000	150	10
D	<i>Enterobacter aerogenes</i>	1.000.000	450	10
E	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1.000.000	600	10
F	<i>Escherichia coli</i>	1.000.000	500	10
G	<i>Bacillus subtilis</i> (Gram +)	500.000	250	10
H	<i>Staphylococcus aureus</i> (Gram +)	1.000.000	550	10
I	<i>Enterococcus faecalis</i> (Gram +)	100.000	180	10

10

Tal como se puede observar en la Figura 7, el resultado muestra que el IBU- Na funciona como antimicrobiano sobre diferentes cepas bacterianas (Gram positivas y negativas).

Ejemplo 9

15 Efecto antimicrobiano del IBU-Na a distintas concentraciones sobre las 3 cepas bacterianas principales que se encuentran asociadas a la enfermedad Fibrosis Quística (FQ)

Efecto del IBU-Na a distintas concentraciones sobre la viabilidad de *Staphylococcus aureus*, *Burkholderia cepacia* y *Pseudomonas aeruginosa*, durante 4 horas a 37° C.

IBU- Na [mM]	Recuento de Colonias (UFC/mL \pm 10)		
	<i>Staphylococcus</i>	<i>Burkholderia</i>	<i>Pseudomonas</i>
0 (Control)	1.000.000	1.300.000	1.700.000
5	1.000.000	1.300.000	1.700.000
10	1.000.000	1.300.000	760.000
25	30.000	40.000	200.000
50	600	700	100
100	10	10	10

El resultado muestra que el IBU-Na presenta efecto sobre las tres cepas bacterianas más frecuentes que se encuentran presentes en la Fibrosis Quística (Figura 8)

5 Ejemplo 10

Efecto antimicrobiano del NAPROXENO en una población de *Burkholderia cepacia*

En este estudio, se analizó el efecto del Naproxeno a distintas concentraciones sobre una población de la cepa *B. cepacia* con ensayos de 4 hs de incubación a 37° C.

Naproxeno [mM]	<i>B. cepacia</i> (UFC/ml \pm 10)
0 (Control)	130.000
10	125.000
25	38.000
50	31.000
100	1.300

10

Tal como se muestra en la Figura 9. El resultado muestra que el Naproxeno muestra una menor actividad antimicrobiana comparada con el IBU-Na.

Ejemplo 11

15 Efecto de la fuerza iónica (CINa) sobre un cultivo de *P. aeruginosa*

En este estudio se analiza el efecto de la fuerza iónica (CINa) a diferentes concentraciones

sobre un cultivo de *P. aeruginosa* en tratamientos de 4 horas a 37° C.

CINa [M]	<i>P. aeruginosa</i> (UFC/mL \pm 10)
0 (Control)	2.000.000
0,01	2.000.000
0,025	2.000.000
0,05	2.000.000
0,1	2.000.000
0,25	1.800.000
0,5	1.600.000
1	1.000.000

El estudio muestra que no se observa disminución en la población bacteriana por efecto de la fuerza iónica. (Figura 10)

5 Ejemplo 12

Efecto de la composición de la presente invención, que comprende IBU-Na con fuerza iónica (CINa 1M) sobre un cultivo de *P. aeruginosa*.

Estudio para evaluar el efecto bactericida del IBU-Na en presencia de Fuerza Iónica (CINa 1M) sobre un cultivo de *P. aeruginosa* durante 4 horas a 37° C.

IBU-Na [mM]	<i>P. aeruginosa</i> (UFC/mL \pm 10)	
	Fuerza Iónica CINa 1M	Sin Fuerza Iónica
0 (Control)	1.700.000	1.700.000
5	1.000	1.700.000
10	10	760.000
25	10	200.000
50	10	100

10

El resultado muestra claramente que la fuerza iónica favorece la acción del IBU-Na, disminuyendo la dosis necesaria para obtener un efecto antimicrobiano en la población de bacterias ensayada. En la Figura 11 se observa claramente que con una concentración de 25 mM de IBU-Na se reduce el N° de UFC/mL a 1000, mientras que la composición de la

presente invención con la fuerza iónica de CNa al 1M logra el mismo resultado a una concentración cinco veces menor, es decir de unos 5 mM de IBU-Na.

Ejemplo 13

5 Efecto bactericida de la composición de la presente invención, que comprende una solución de Ibuprofeno hipertónica en función del tiempo

A continuación, se presenta el estudio para evaluar el efecto bactericida del IBU-Na en presencia de fuerza iónica (CNa 1M) a distintos tiempos de incubación sobre un cultivo de *P. aeruginosa*. Tratamientos de 1 hora, 2 horas y 4 horas a 37° C pH 6,5.

IBU-Na [mM]	<i>P. aeruginosa</i> (UFC/mL \pm 10)		
	1 hora	2 horas	4 horas
+ CNa (1M)			
0 (Control)	800.000	800.000	800.000
5	16.000	13.000	8.500
10	30	30	10
20	10	10	10

10

Tal como puede observarse en la Figura 12, este resultado muestra que la Fuerza iónica permite acortar los tiempos de acción fijados anteriormente.

Ejemplo 14

15 Efecto de la composición de la presente invención que comprende IBU-Na con fuerza iónica sobre un cultivo de *P. aeruginosa* variando el tiempo de tratamiento (en minutos)

Este estudio muestra el efecto bactericida del IBU-Na 20 mM en presencia de fuerza iónica (CNa 1M) sobre un cultivo de *P. aeruginosa*. Tratamientos a distintos tiempos de incubación (1, 3 y 10 minutos)

20

Tiempo (Minutos)	<i>P. aeruginosa</i> (UFC/mL \pm 10)		
	IBU 20 mM con Fuerza Iónica	IBU 20 mM sin Fuerza Iónica	Preincubacion 10' con Fuerza Iónica Posterior: IBU 20 mM

0 (Control)	1.000.000	1.000.000	1.000.000
1	10	1.000.000	1.000.000
3	10	1.000.000	1.000.000
10	10	1.000.000	1.000.000

Tal como puede observarse en la Figura 13, el resultado obtenido muestra que sólo el tratamiento combinado de Ibuprofeno en presencia de Fuerza Iónica (IBU-Na 20 mM + CIna 1M) permite obtener un resultado sinérgico sobre el efecto antimicrobiano en función del tiempo.

Analizando otras alternativas, como puede verse en la tercer y cuarta columna de la tabla de este mismo ejemplo, con ibuprofeno solo sin fuerza iónica y un tratamiento disociado, preincubando un inóculo de *P. aeruginosa* 1×10^8 UFC/mL durante 10 minutos en CIna 1M y posterior lavado por dilución 1/10 en buffer conteniendo IBU 20 mM. Como resultado se establece que la Fuerza Iónica sola no afecta el inóculo; el pretratamiento de Fuerza Iónica y posterior tratamiento con Ibuprofeno, no provocó modificaciones en el inóculo respecto de los controles, tal como se observa en la cuarta columna de la tabla de este ejemplo. Tal como queda evidenciado en este ejemplo, la presente invención tiene un efecto técnico sorprendente e inesperado, al lograr un efecto sinérgico casi instantáneo (en relación a otras terapéuticas) que favorece la interacción del Ibuprofeno sobre los microorganismos, y así en sólo un minuto lograr la drástica disminución de una población de microorganismos típicos de la fibrosis quística.

Ejemplo 15

Efecto de la composición de la presente invención que comprende ibuprofeno (IBU-Na) con fuerza iónica (CIna 1M) sobre un cultivo de tres cepas bacterianas

Ensayo para evaluar el efecto del IBU- Na con fuerza iónica (CIna 1M) sobre 3 cepas bacterianas: *P aeruginosa*, *S aureus* y *B cepacia* en tratamientos por 4 horas a 37° C.

IBU- Na [mM]	Recuento de Colonias (UFC/mL \pm 10)
--------------	--

α / CINA 1M	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. cepacia</i>
0	3.000.000	1.000.000	1.700.000
12,5	250	100	100
25	10	10	10
50	10	10	10

Tal como se observa en la Figura 14, la presencia de una solución hipertónica favorece la acción antibacteriana del IBU-Na sobre las tres cepas de interés asociadas a la enfermedad FQ.

- 5 A continuación, se presentan ejemplos de aplicación que muestran cómo se ve afectado el efecto bactericida del Ibuprofeno cuando se administra ya por vía oral o por vía endovenosa. Estos ejemplos ponen de manifiesto aspectos que evidencian la altura inventiva de la presente composición, ya que se provee de una formulación que evita los factores que normalmente han ocultado los efectos bactericidas del Ibuprofeno.

10

Ejemplo 16

Efecto de la presencia de ALBUMINA humana sobre la actividad bactericida del IBU-Na [20 mM] en medio con fuerza iónica (CINA 1M)

- 15 Estudio para evaluar el efecto de la presencia de una proteína del suero, la albúmina humana, una proteína reconocida con capacidad para interaccionar fuertemente con la molécula de Ibuprofeno sobre la actividad bactericida. En este caso se realizó la pre-incubación inicial de distintas concentraciones de Albúmina con IBU- Na [20 mM] a temperatura ambiente durante 1 hora; posteriormente se incubaron con las bacterias en presencia de Fuerza Iónica (CINA 1M) para dar comienzo con el tratamiento final de 4 hs a 20 37° C.

ALBUMINA (mg/mL) con IBU 20 mM y NaCl (1M)	<i>P. aeruginosa</i> (UFC/mL \pm 10)
Control *	1.000.000

10	1.000.000
5	1500
2,5	10

* Albúmina 10 mg/mL sin IBU- Na

Tal como puede observarse en la Figura 15, la presencia de Albúmina interfiere en la acción antibacteriana del IBU- Na 20 mM. A partir de concentraciones de Albúmina inferiores a 10 mg/mL comienza a recuperarse el efecto bactericida del IBU- Na, lo que sugiere algún tipo de interacción.

Ejemplo 17

Efecto del LIPOVENOS^{MR} (triglicéridos de cadena media) en presencia de Fuerza Iónica (CINa 1M) sobre un cultivo de *P. aeruginosa*.

- 10 Se incubó un inóculo de *P. aeruginosa* en presencia de LIPOVENOS^{MR} + Fuerza Iónica (CINa 1M) durante un tratamiento por 4 horas a 37° C.

Tratamiento LIPOVENOS % con NaCl (1 M)	<i>P. aeruginosa</i> (UFC/mL \pm 10)
Control (0%)	2.000.000
2,5 %	2.000.000
5 %	2.000.000
10 %	2.000.000
20 %	2.000.000

Tal como puede observarse en la figura 16, el LIPOVENOS^{MR} no produce ningún efecto sobre el inóculo en las concentraciones ensayadas

Ejemplo 18

Efecto del IBU- Na [20 mM] en presencia de LIPOVENOS^{MR} sobre la viabilidad de *P. aeruginosa*.

Preincubación inicial de LIPOVENOS a distintas concentraciones con IBU- Na 20 [mM] a temperatura ambiente durante 1 hora. Posteriormente se mezcló con las bacterias para comenzar el tratamiento de 4 hs a 37° C.

LIPOVENOS(%)	<i>P. aeruginosa</i> (UFC/mL \pm 10)
+	
Control *	1.000.000
LIPO 10% +IBU 20 Mm	1.000.000
LIPO 5% +IBU 20 Mm	1.000.000
LIPO 2,5% +IBU 20 Mm	1.000.000

* LIPOVENOS^{MR} 10%, sin IBU- Na

- 5 La presencia de LIPOVENOS^{MR} hasta el 2,5%, presenta una marcada interferencia sobre la acción antibacteriana del IBU-Na 20 mM.

Ejemplo 19

10 Efecto antimicrobiano de la TOBRAMICINA en función de la concentración y del tiempo de contacto sobre *P. aeruginosa*

En este ensayo se realizó estudio para evaluar la actividad de un antibiótico conocido como es la Tobramicina sobre una población de *P. aeruginosa* en tratamientos de 1 h, 4 hs y O.N. a 37° C. y así comparar con los estudios de los ejemplos previos de la actividad del Ibuprofeno

Tobramicina [mM]	<i>P. aeruginosa</i> (UFC/mL \pm 10)		
	1 hora	4 horas	O.N.
Control	2.000.000	2.000.000	2.000.000
1	1.000.000	30.000	30.000
2,5	60.000	20.000	10
5	30.000	1.000	10
10	1.000	10	10

Tal como puede observarse en la Figura 17, a medida que se incrementa el tiempo de contacto de las bacterias con el antibiótico Tobramicina, aumenta su efecto bactericida.

Ejemplo 20

5 Efecto antimicrobiano de la TOBRAMICINA en presencia de fuerza iónica sobre *P. aeruginosa*

En este ejemplo se muestra un ensayo para evaluar una formulación del antibiótico Tobramicina en presencia de una solución de ClNa 1M sobre una población de *P. aeruginosa* durante 4 hs a 37° C.

Tobramicina [mM] con ClNa 1M	<i>P. aeruginosa</i> (UFC/mL \pm 10)
0	1.000.000
0,25	400.000
1	10
5	10
10	10

10

Tal como se observa en la Figura 18, con la presencia de fuerza iónica (ClNa 1M) se ve favorecido el efecto bactericida del antibiótico Tobramicina sobre una población de *P. aeruginosa* en un tiempo de contacto de 4 hs a 37° C.

15 Ejemplo 21

Efecto antimicrobiano del IBU-Na y la TOBRAMICINA en presencia de fuerza iónica sobre un biofilm artificial de *P. aeruginosa*

Estudio comparativo del efecto de IBU-Na y TOBRAMICINA en presencia de Fuerza Iónica (ClNa 1M) sobre un biofilm artificial de *P. aeruginosa* en presencia de una solución de

20

Tratamientos	<i>P. aeruginosa</i> (UFC/mL \pm 10)
Control Biofilm	2.000.000

Biofilm + FI (1)	2.000.000
(1) + IBU- Na 10 mM	25.000
(1) + IBU- Na 25 mM	200
(1) + Tobramicina 5 mM *	10
(1) + Tobramicina 10 mM *	10

* Formación de complejo insoluble

Tal como se puede observar en la figura 19, el ensayo muestra que el IBU-Na en presencia de fuerza iónica mantiene propiedades antimicrobianas a pesar de la barrera de alginato y no formó un complejo insoluble. Mientras que la Tobramicina formó un complejo insoluble durante los ensayos, aunque mantuvo efectiva su condición como antibiótico.

Cabe destacar que es un compuesto insoluble el que genera una obstrucción progresiva de los pulmones en la fibrosis quística. Con lo cual es posible esperar que en pruebas en humanos la composición de la presente invención se constituya en una terapia recomendada para esta enfermedad.

Ejemplo 22

Evaluación del potencial efecto citotóxico de nebulizaciones con Ibuprofeno en dos concentraciones sobre tejido pulmonar de ratas

En este estudio histopatológico se analizó el potencial efecto citotóxico del Ibuprofeno en pulmón, a concentraciones de 25 y 50 mM. Los grupos A y B corresponden a tratamientos replicados con 8 animales en cada concentración; éstos fueron nebulizados 1 hora por día durante 4 meses. Los restantes grupos C y D son similares que A y B, pero luego de los 4 meses en cada caso se los dejó unos 15 días más sin tratamiento alguno y luego se los sacrificó.

Tratamientos	Dosis IBU [mM]	Parámetros de daño agudo					Parámetros de daño sub-agudos	
		Infiltrado Alveolar	Infiltrado Intersticial	Membranas hialinas	Material proteináceo	Engrosamiento septal	Cuerpos de Masson	Granulomas y células gigantes
A	25	0 Hemorragia alveolar	1	1	1	1	NO	NO

	50	0 Intenso infiltrado mononuclear pehbronquial	0 Congestión capilar	0	0	1 Escaso y focal	NO	NO
B	25	0	1	0	0	1	NO	NO
	50	0 Intenso infiltrado mononuclear pehbronquial	1	0	0	1	NO	NO
C	25	0 Infiltrado mononuclear pehvascular y pehbronquiolar	1	0	0	1	NO	NO
	50	0 Leve infiltrado mononuclear pehbronquial	1	0	0	1	NO	NO
D	25	0 Infiltrado mononuclear pehvascular y pehbronquiolar	1	0	0	1	NO	NO
	50	0 Leve infiltrado mononuclear pehbronquial	1	0	0	1	NO	NO

De los resultados de los estudios anatomopatológicos mostrados en la Tabla, se puede concluir que la nebulización diaria de 60 minutos, durante un período de tiempo relativamente prolongado de 4 meses de una solución de Ibuprofeno 50 mM en ratas de la

5 cepa Balb7c no produce alteraciones significativas en el tejido pulmonar que haga necesario su suspensión.

Ejemplo 23

Estudios de la actividad antiviral de una solución de Ibuprofeno

A continuación, se describen los estudios "in vitro" donde se muestra la actividad de una solución de Ibuprofeno sódica para producir la inactivación de los virus denominados "envueltos" que son aquellos virus que presentan una envoltura lipídica.

5 **Cultivo de células utilizadas en el ensayo de actividad**

Células de riñón de mono verde de Africa (Vero) (ATCC CCL-21) , células Madin-Darby de riñón bovino (MDBK) (ATCC CCL-22) y células de tumor epitelial de laringe humanas (Hep-2) (ATCC CCL-23) fueron propagadas en medio esencial mínimo (MEM) suplementado con 10% de suero fetal bovino irradiado conteniendo 10000 IU de penicilina y 2 mM glutamina.

10 **Virus utilizados en los ensayos de inactivación**

El virus de la diarrea bovina BVDV fue provisto por INTA Castelar, y fue propagado en monolapas de células MDBK. El virus de la estomatitis vesicular (VSV) (ATCC VR-158) y el virus Herpes Simplex 1 (HSV) fueron propagados en células VERO. La cepa de virus rubéola (MV) fue obtenida a partir de la vacuna comercial Rouvax (Pasteur Merieux. Francia) fue propagada en células Hep-2. El virus Herpes Simplex (HSV) fue provisto por el instituto de Virología de la UNC

Preparación de los stocks de virus

Los virus fueron propagados usando las células susceptibles de ser infectadas, las cuales fueron cultivadas a 37 C, hasta la completa destrucción total de la monolapa de células. Los virus asociados a las células fueron extraídos por el uso de tres ciclos de congelamiento-descongelamiento de las botellas donde estaban las células. El material fue centrifugado a 3000 x g durante 15 minutos y el sobrenadante fue fraccionado y guardado a -70 C hasta su uso.

25 **Estudios para evaluar la actividad virucida de una solución de IBUPROFENO y de la composición de la presente invención**

Ensayos de infectividad de los virus HSV, BVDV, VSV y MV: la actividad infectiva de los virus fue determinada por el método de titulación (por diluciones 1/10) en placas de 96 pocillos (NUNC Life Technologies, Rockville, MD, USA), usando como criterio la medición del efecto citopático que se produce sobre las células (agregación y muerte celular) y por lo tanto se determina por positivo o negativo. Diluciones seriadas 1/10 de los virus fueron preparadas por cuadruplicado y fueron incubados por 60 minutos a 37° C con suave agitación con distintas concentraciones de Ibuprofeno que están comprendidas entre 1 y 50

mM. Luego de este período de tiempo, la solución de virus con Ibuprofeno se la incuba en presencia de las células y se dejan también 60 min. a 37° C a los fines de permitir la adsorción de los virus sobre las células para que puedan ejercer su efecto citopático. Luego se le agrega 150 uL de medio de mantenimiento a cada pocilio sin remover el inóculo.

- 5 La incubación fue llevada a cabo a 37° C in una estufa conteniendo 5 % de atmosfera de CO₂, con 90% de humedad relativa, durante 3 días para el caso de los virus HSV y VSV o bien hasta 7 u 8 días para los virus BVDV y MV, para dar tiempo suficiente para detectar la aparición del potencial efecto citopático.

Determinación de la Dosis infectiva 50

- 10 La denominada Dosis infectiva del cultivo celular 50% (TCID₅₀ mL⁻¹) fue calculada por el método de análisis de Reed-Muench (L. J. Reed, H. Munch, Am. J. Hygiene 1938, 27, 493.) para pocillos infectados por virus positivos.

Resultados del ensayo sobre el efecto de Ibuprofeno a una concentración 50 mM sobre la capacidad infectiva de los virus.

15

Virus	Características de los Virus			Reducción del nivel viral
	Familia	Genoma	Tamaño (nM)	Ibuprofeno TCID ₅₀ mL ⁻¹
20 HSV	Herpes	dsDNA	120-200	> 6.9
BVDV	Flavi	RssRNA	50-70	> 6.5
VSV	Rhabdo	SssRNA	70-170	> 7.7
MV	Paramyxo	SssRNA	150-300	> 5.0

- 25 Como puede observarse de los resultados obtenidos, la incubación de Ibuprofeno en presencia de los virus envueltos utilizados, produce un marcado efecto inhibitorio sobre la capacidad infectiva viral. Los títulos obtenidos expresados como Dosis Inhibitoria 50, oscilan en 10⁵ y 10⁷ logaritmos unidades formadoras de colonias.

REIVINDICACIONES

Habiendo descrito y representado la naturaleza y alcance de la invención y la manera que la misma ha de ser llevada a la práctica, se declara reivindicar como de exclusivo derecho y propiedad:

1 Una composición farmacéutica bactericida y virucida, de aplicación sobre epitelios de tejidos como pulmonar, nasal y bucal, caracterizada porque comprende un anti-inflamatorio no esteroideo (AINE) y una sal.

2 La composición farmacéutica bactericida y virucida, de aplicación sobre epitelios de tejidos como pulmonar, nasal y bucal, de la reivindicación 1 caracterizada porque comprende dicho anti-inflamatorio no esteroideo (AINE) en una concentración entre 5 y 500 mM solubilizado en solución salina de dicha sal.

3 La composición de la reivindicación 1 o 2 caracterizada porque su forma de administración es seleccionada del conjunto comprendido por inhalación, nebulización, enjuague bucal y tópica.

4 La composición de la reivindicación 2 caracterizada porque dicho anti-inflamatorio no esteroideo (AINE) comprende una concentración entre 5 y 180 mM.

5 La composición de la reivindicación 2 caracterizada porque dicho anti-inflamatorio no esteroideo (AINE) comprende una concentración menor a 180 mM.

6 La composición de la reivindicación 2 caracterizada porque dicho anti-inflamatorio no esteroideo (AINE) comprende una concentración entre 5 y 50 mM.

7 La composición de la reivindicación 1 o 2 caracterizada porque dicho anti-inflamatorio no esteroideo es seleccionado del conjunto comprendido por Ibuprofeno, naproxeno, flurbiprofeno, ketoprofeno, diclofenac, diflunisal, etodolac, fenoprofen, indometacina, meclofenamato, mefenamic ácido, meloxicam, nabumetone, oxaprozin, piroxicam, sulindac, tolmetin, celecoxib, salicilatos acetilados, salicilatos no acetilados, y sus combinaciones.

8 La composición de la reivindicación 1 o 2 caracterizada porque dicho anti-inflamatorio no esteroideo comprende AINE arilpropiónico.

9 La composición de la reivindicación 1 o 2 caracterizada porque dicho anti-inflamatorio no esteroideo es seleccionado del conjunto comprendido por Ibuprofeno, Naproxeno, Flurbiprofeno, ketoprofeno y sus combinaciones.

- 10 La composición de la reivindicación 1 o 2 caracterizada porque dicho anti-inflamatorio no esteroideo comprende ibuprofeno.
- 11 La composición de la reivindicación 1 o 2 caracterizada porque dicho anti-inflamatorio no esteroideo comprende como contraión a los cationes monovalentes seleccionados del
5 conjunto comprendido por sodio, potasio, litio y combinaciones de los mismos.
- 12 La composición de la reivindicación 2 caracterizada porque comprende un pH en solución acuosa de entre 6,0 y 8,5.
- 13 La composición de la reivindicación 2 caracterizada porque comprende un pH en solución acuosa de entre 7,0 y 8,0.
- 10 14 La composición de la reivindicación 2 caracterizada porque comprende un pH en solución acuosa de entre 7,5 y 7,9.
- 15 La composición de la reivindicación 2 caracterizada porque dicha solución salina es hipertónica y comprende una concentración de entre 0,3 y 2 Molar de NaCl
- 16 La composición de la reivindicación 2 caracterizada porque dicha solución salina es
15 hipertónica y comprende una concentración de entre 0,4 y 1,1 Molar de NaCl
- 17 La composición de la reivindicación 2 caracterizada porque dicha solución salina es hipertónica y comprende una concentración de entre 0,9 y 1,05 Molar de NaCl
- 18 La composición de la reivindicación 1 o 2 caracterizada porque además comprende un agente anestésico.
- 20 19 La composición de la reivindicación 18 caracterizada porque dicho agente anestésico es seleccionado del conjunto comprendido por xilocaína, lidocaína, carticaína y mepivacaína.
- 20 La composición de la reivindicación 1 o 2 caracterizada porque comprende un estado seleccionado del conjunto comprendido por líquido, polvo y liofilizado.
- 25 21 La composición de la reivindicación 1 o 2 caracterizada porque comprende una formulación farmacéutica para nebulizar a pacientes que padecen fibrosis quística.
- 22 La composición de la reivindicación 1 o 2 caracterizada porque comprende dicha composición para el tratamiento de la fibrosis quística en ausencia de antibióticos.
- 23 La composición de la reivindicación 1 o 2 caracterizada porque comprende una
30 formulación farmacéutica para el tratamiento de infecciones virales tipo Herpes simplex, que se aplica sobre piel afectada.

24 La composición de la reivindicación 1 o 2 caracterizada porque comprende una formulación farmacéutica para enjuague bactericida bucal.

25 La composición de la reivindicación 1 o 2 caracterizada porque además comprende antibióticos seleccionados del conjunto comprendido por colistimetato de sodio, tobramicina, 5 ciprofloxacino, aztreonam lisina, levofloxacino, ciprofloxacino, fosfomicina, anfotericina B, vancomicina, gentamicina, ceftazidima, ampicilina, amikacina y sus mezclas.

26 La composición de la reivindicación 1 caracterizada porque la relación molar entre dicho AINE y dicha sal es de entre 1:0,6 y 1:400.

27 La composición de la reivindicación 1 caracterizada porque la relación molar entre 10 dicho AINE y dicha sal es de entre 1:10 y 1:100.

28 La composición de la reivindicación 1 caracterizada porque dicha sal es seleccionada del grupo comprendido por cloruro de Sodio, Potasio y sus combinaciones.

29 La composición de la reivindicación 1 caracterizada porque comprende una formulación farmacéutica para ser diluida en agua en ausencia de cualquier otro 15 componente.

30 Un proceso de elaboración de la composición de la reivindicación 2 caracterizada porque comprende los siguientes pasos:

a. se mezcla dicho AINE con agua y se agita para mantener la suspensión de dicho AINE;

20 b. se agrega NaHO hasta alcanzar un pH comprendido entre 6,8 y 8,5 con suave agitación, de modo de permitir la completa solubilización de dicho AINE hasta obtener una concentración de entre 1 y 100 mg/mL;

c. sobre la preparación del paso b. se agrega una solución salina hipertónica de NaCl con una concentración de entre 0,3 y 2 M;

25 d. la preparación del paso c. se filtra mediante poro de 0,22 mieras.

31 El proceso de la reivindicación 30 caracterizado porque comprende además el siguiente paso:

e. la solución filtrada del paso d. de la reivindicación 30 se liofiliza;

32 El proceso de la reivindicación 31 caracterizado porque comprende además el 30 siguiente paso:

f. al momento de su aplicación, ya sea para ser vehiculizada a pulmón mediante nebulizador o para ser aplicada en boca como enjuague bucal, la composición liofilizada del paso e. de la reivindicación 31 se resuspende en agua o en una solución glucosada al 5%.

33 El proceso de la reivindicación 30 caracterizado porque dicho AINE es seleccionado
5 del conjunto comprendido por: Ibuprofeno, naproxeno, flurbiprofeno, ketoprofeno, diclofenac, diflunisal, etodolac, fenoprofen, indometacina, meclofenamato, mefenamic ácido, meloxicam, nabumetone, oxaprozin, piroxicam, sulindac, tolmetin, celecoxib, salicilatos acetilados, salicilatos no acetilados, y sus combinaciones.

DIBUJOS

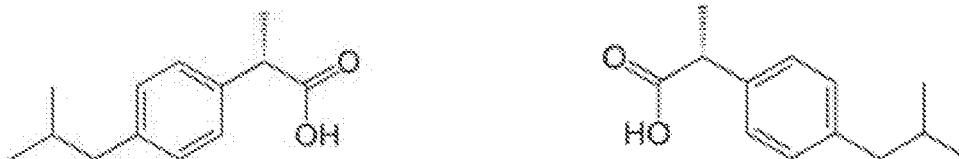


Figura 1

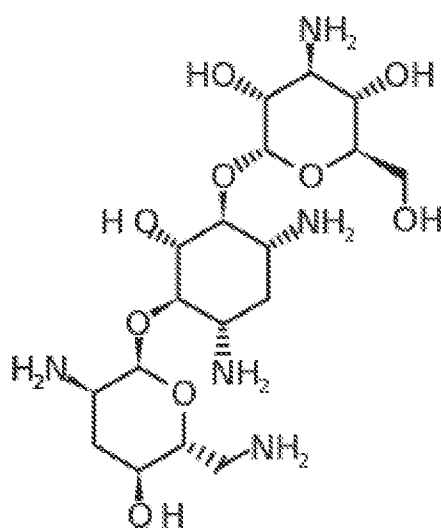


Figura 2

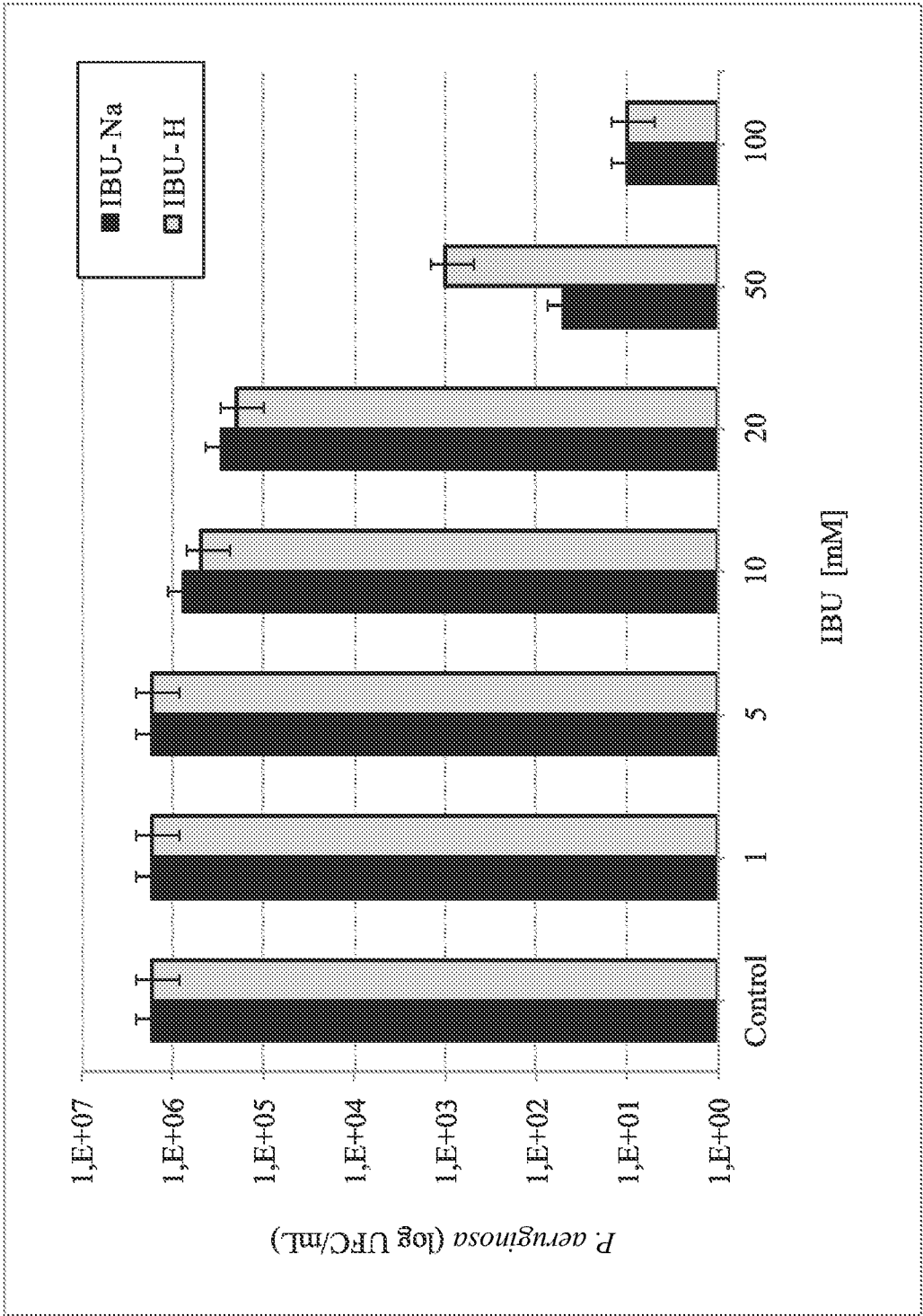


Figura 3

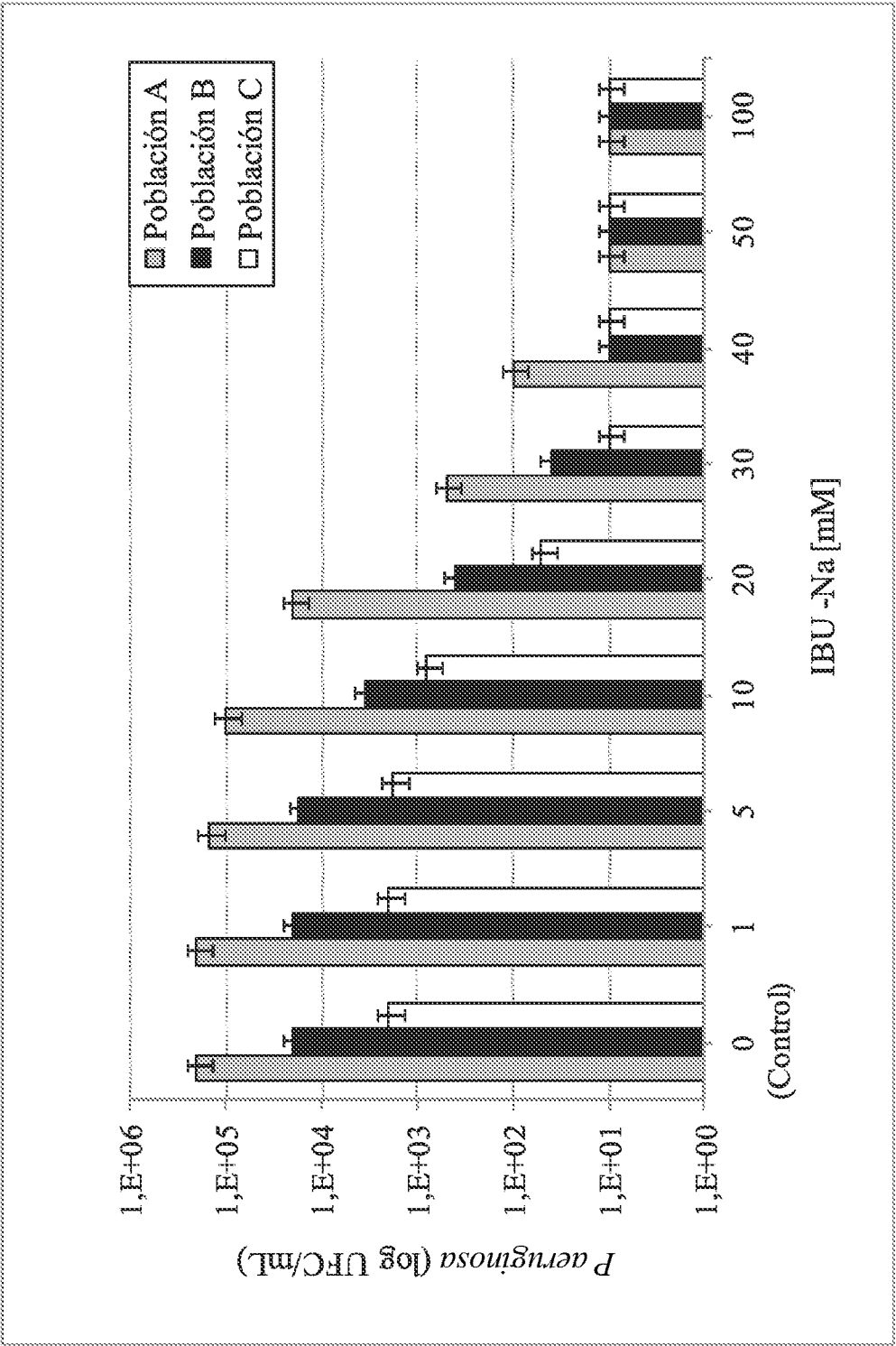


Figura 4

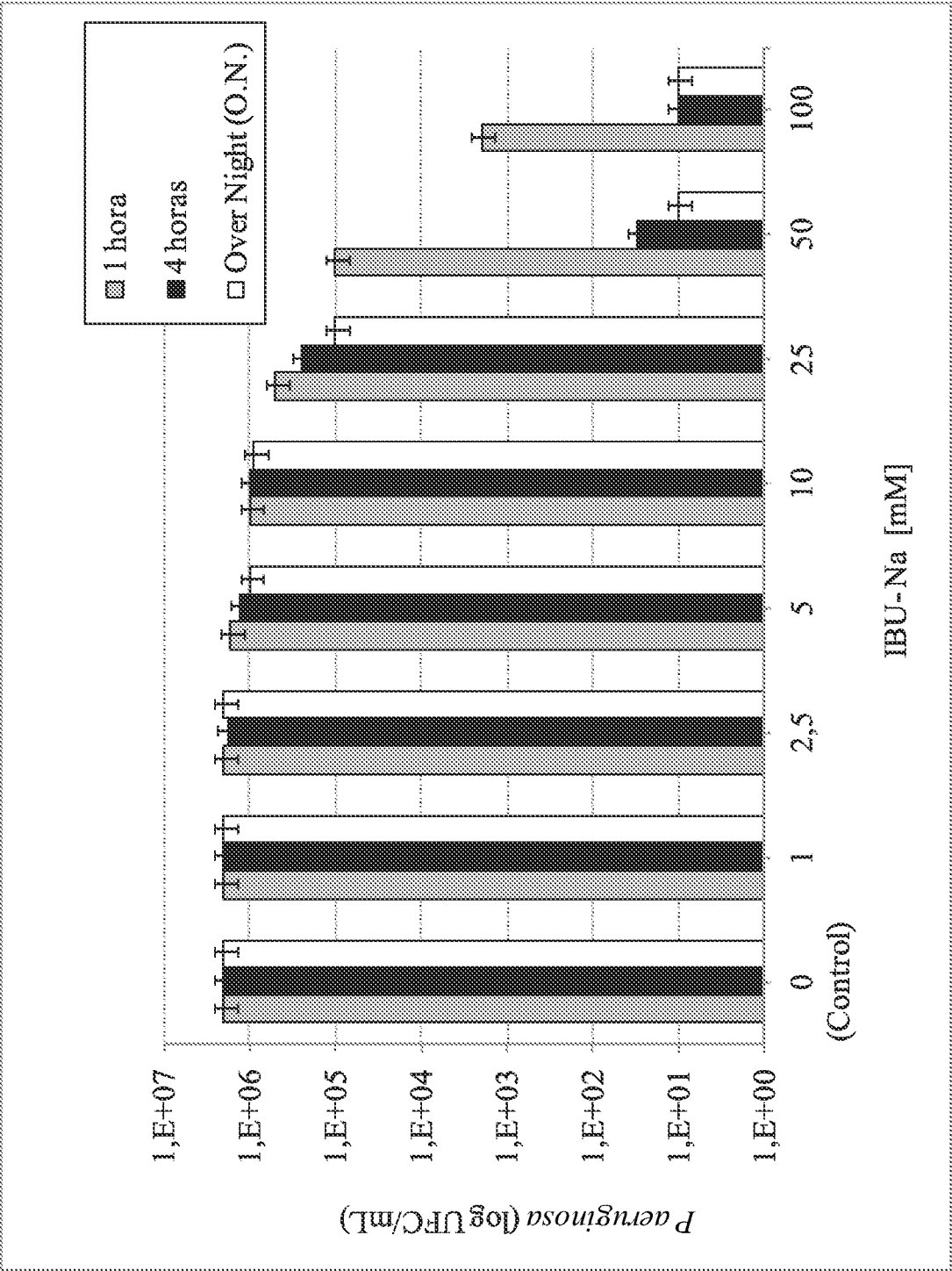


Figura 5

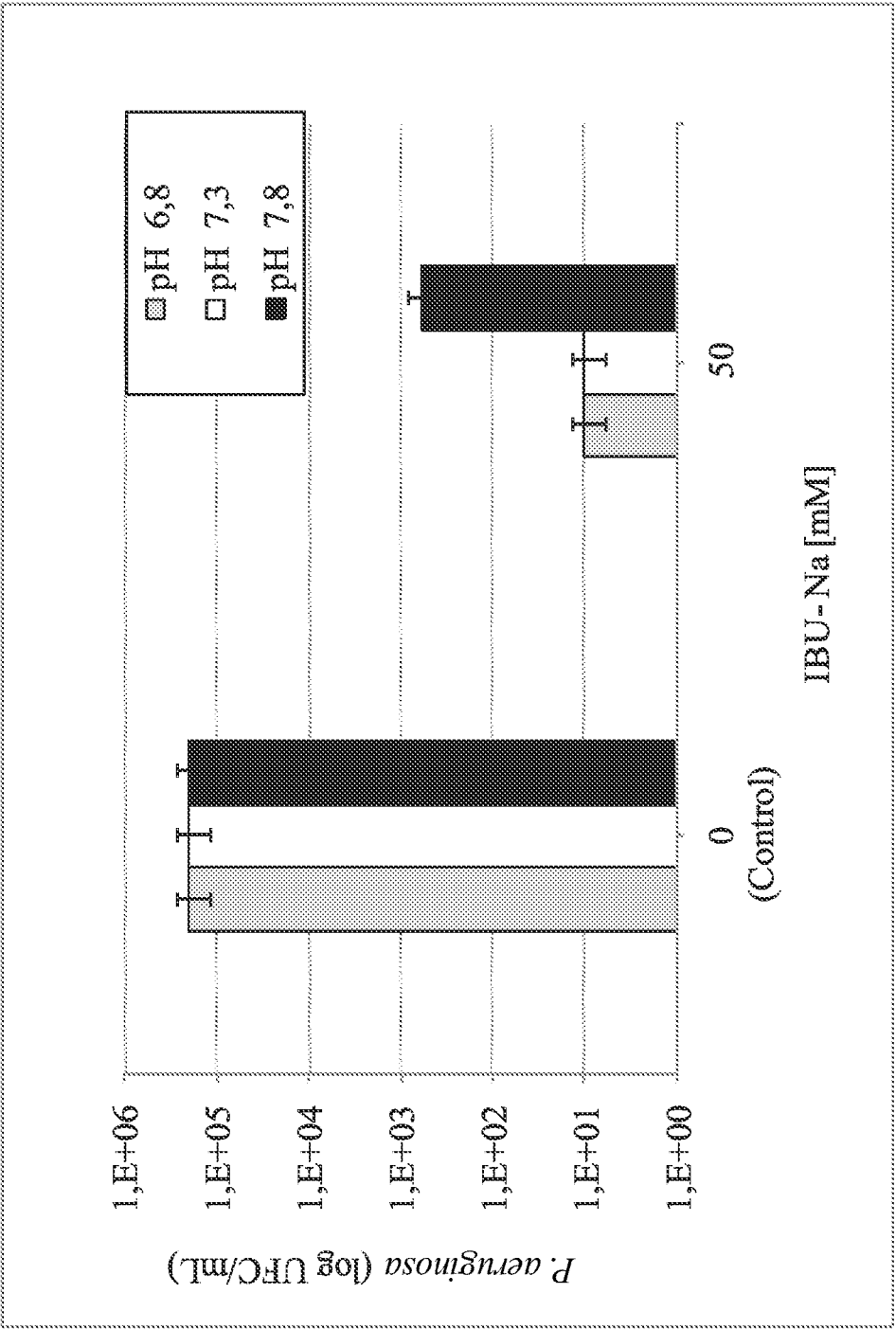


Figura 6

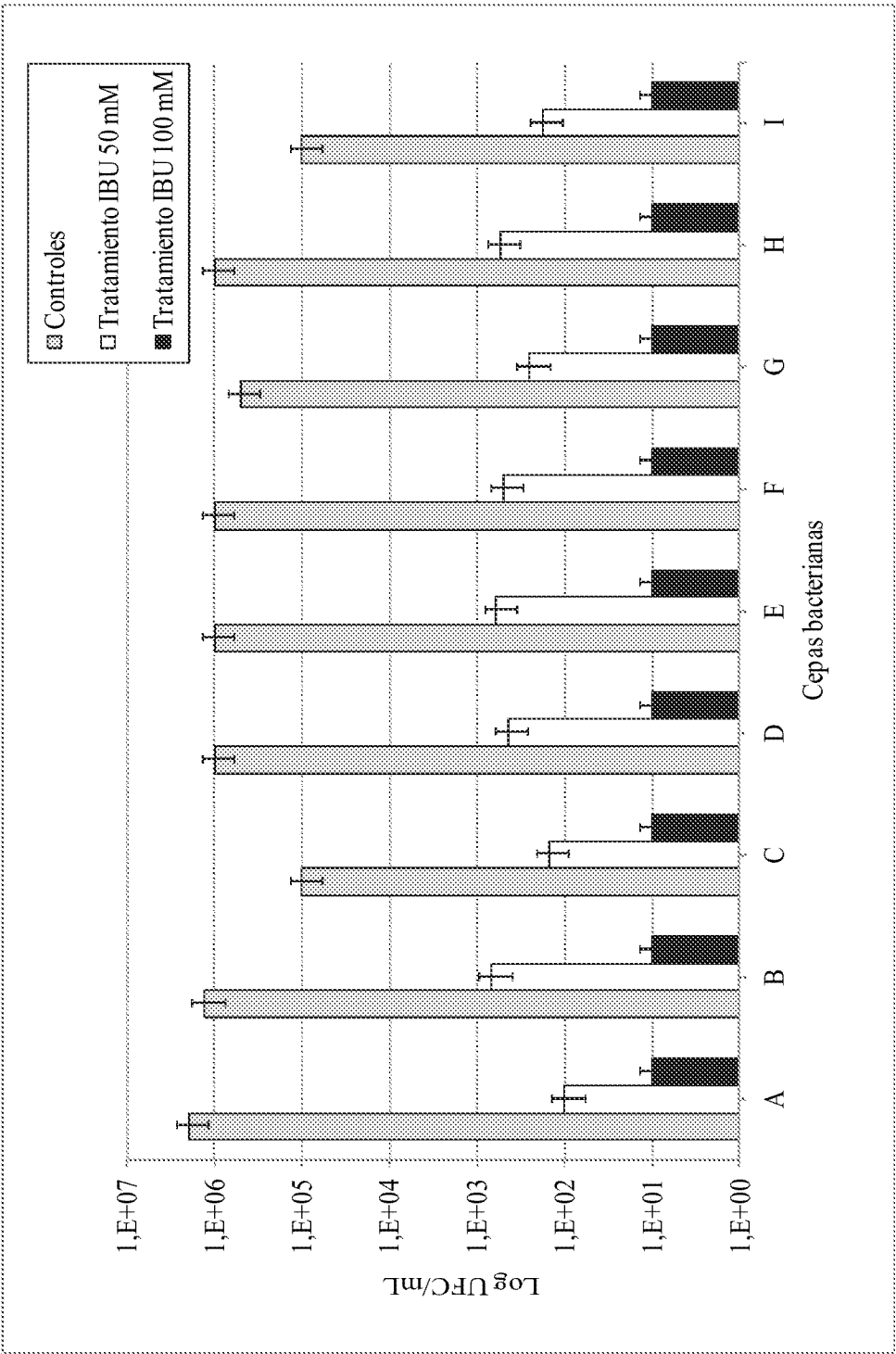


Figura 7

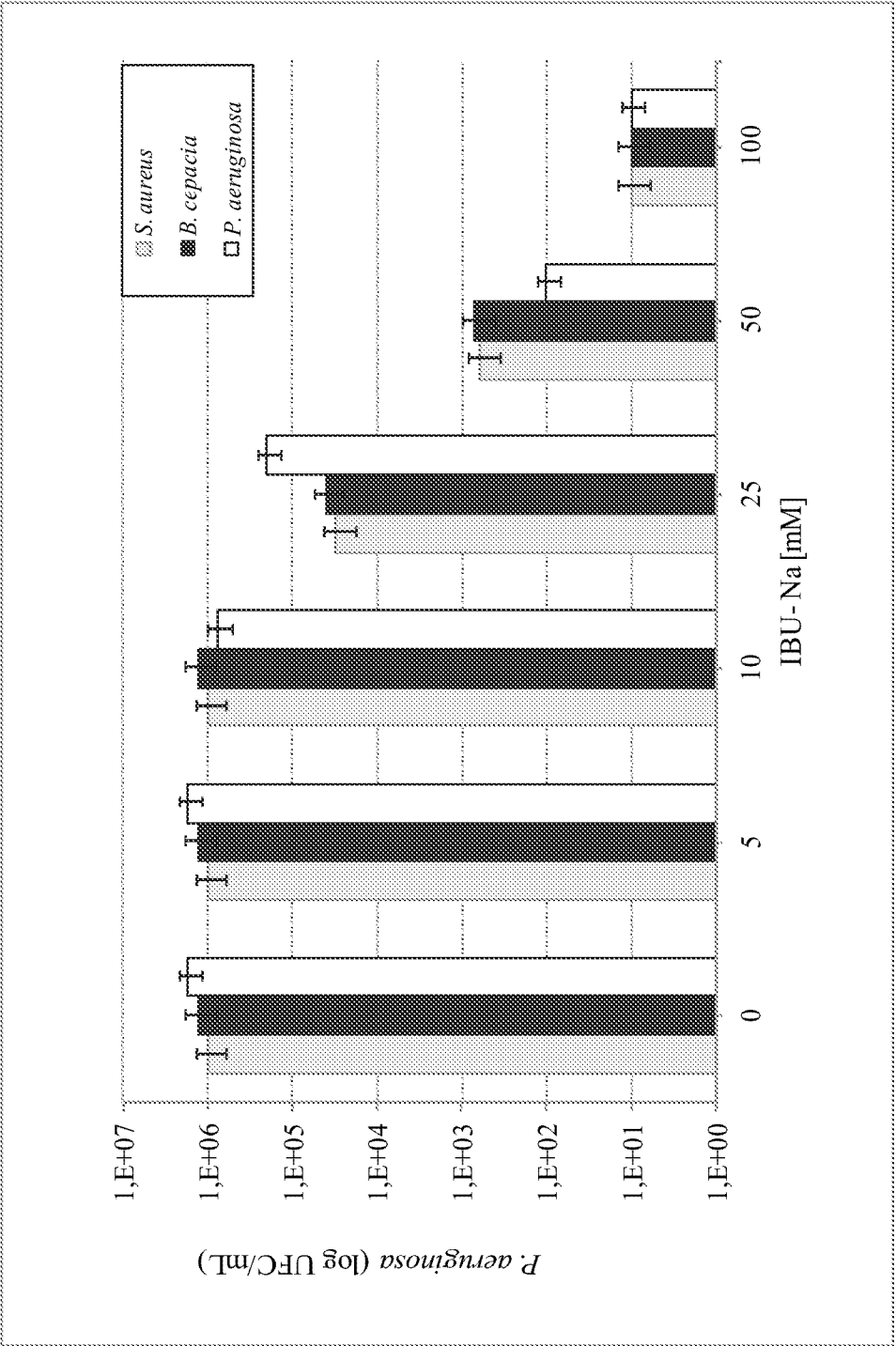


Figura 8

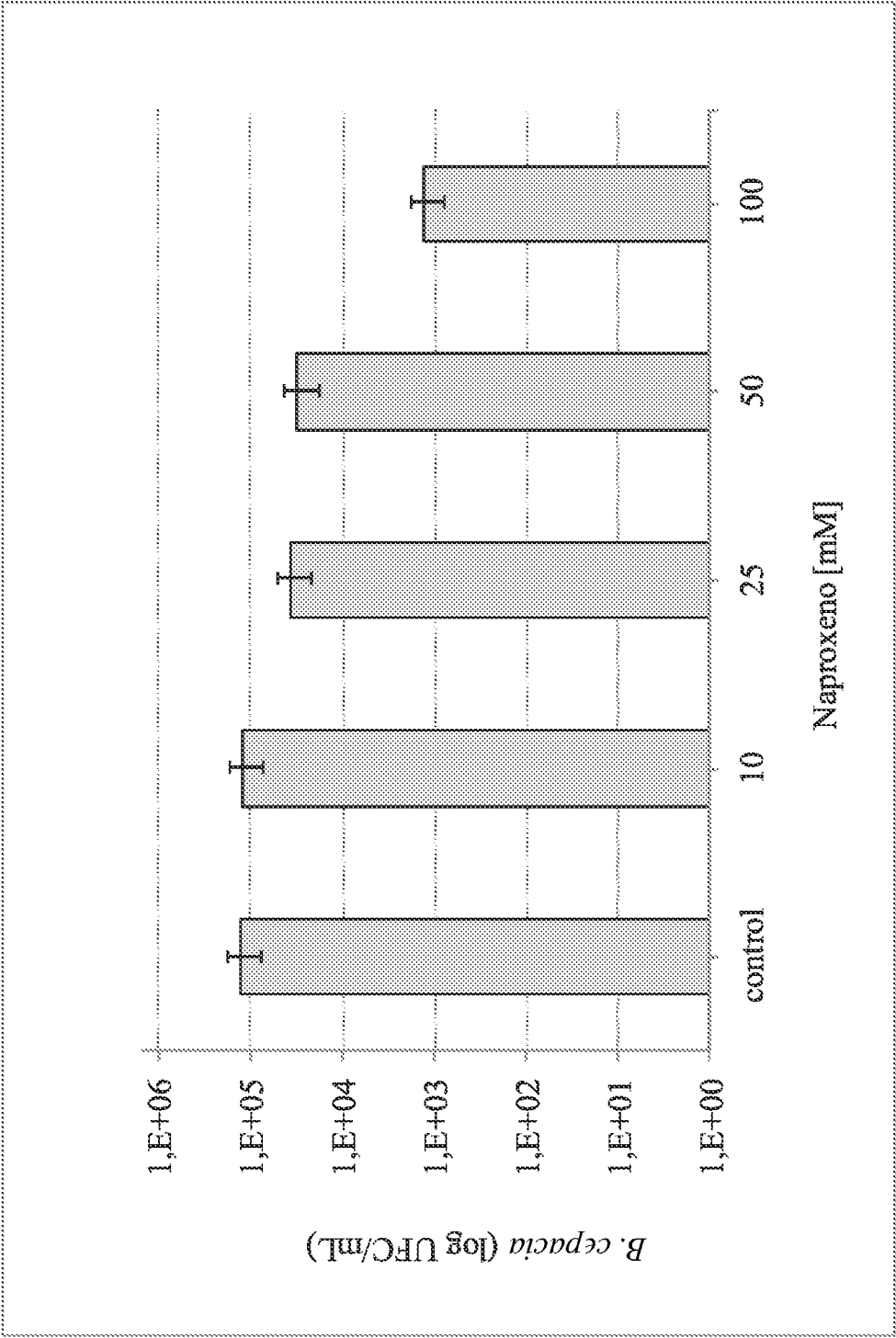


Figura 9

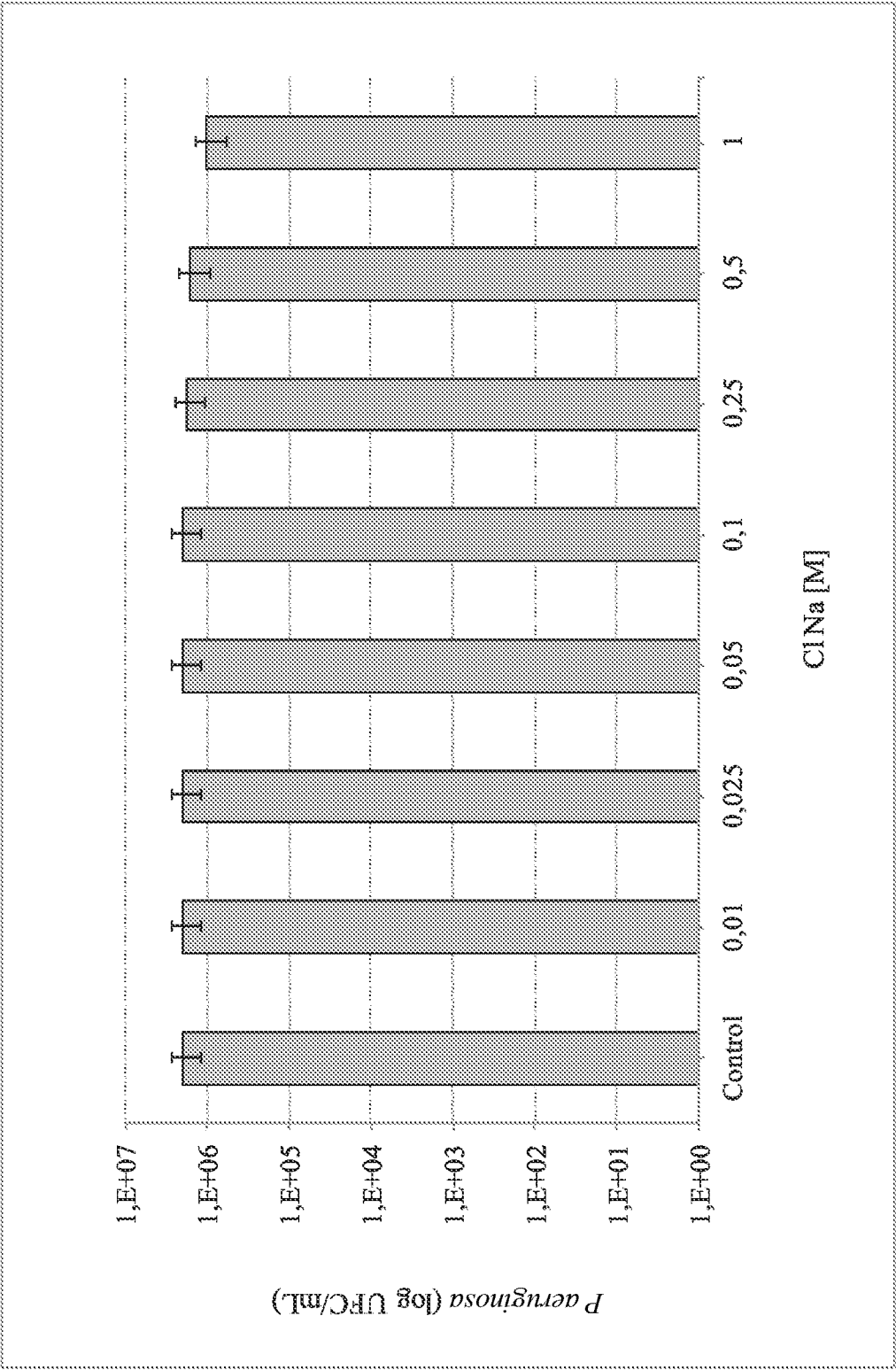


Figura 10

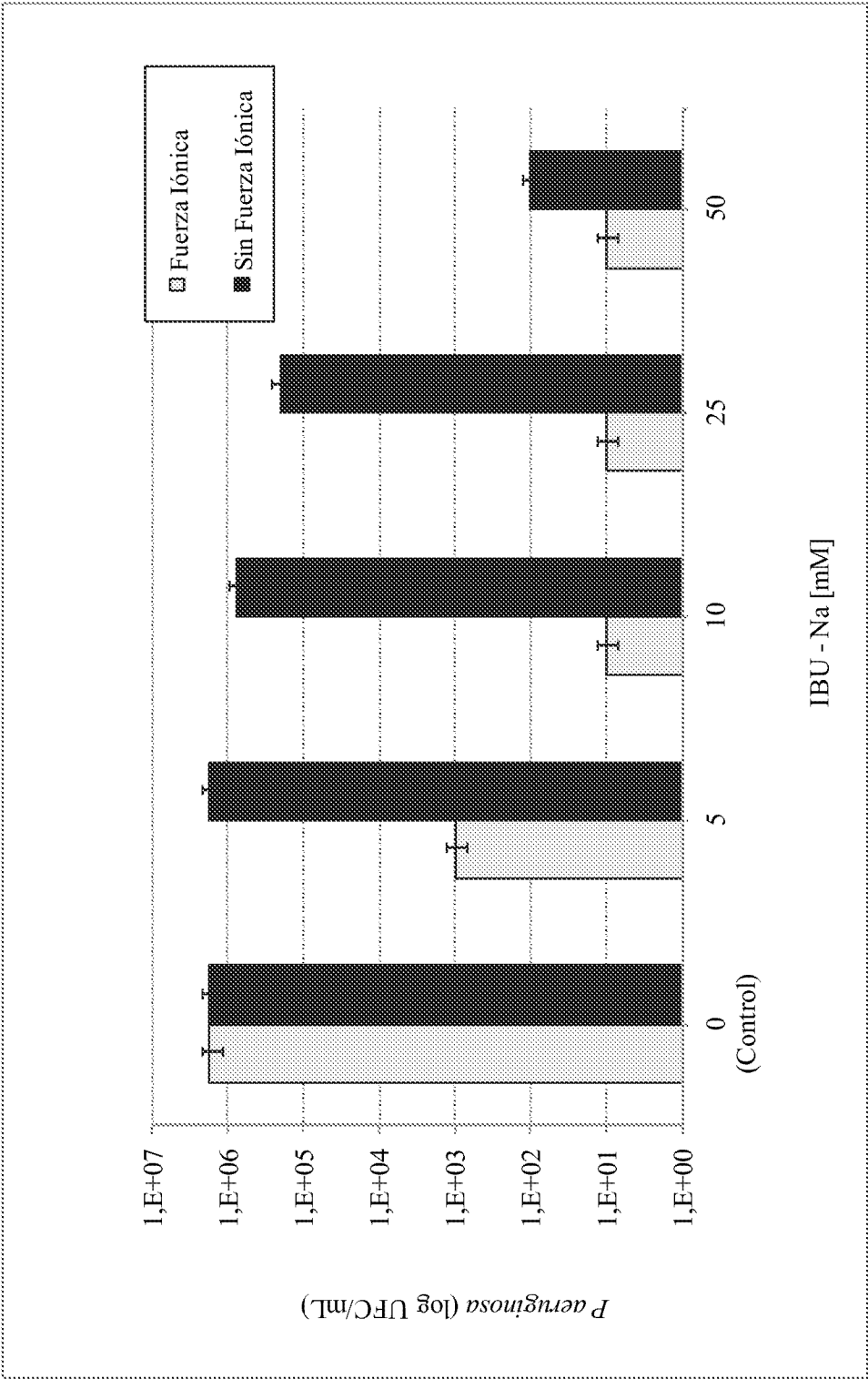


Figura 11

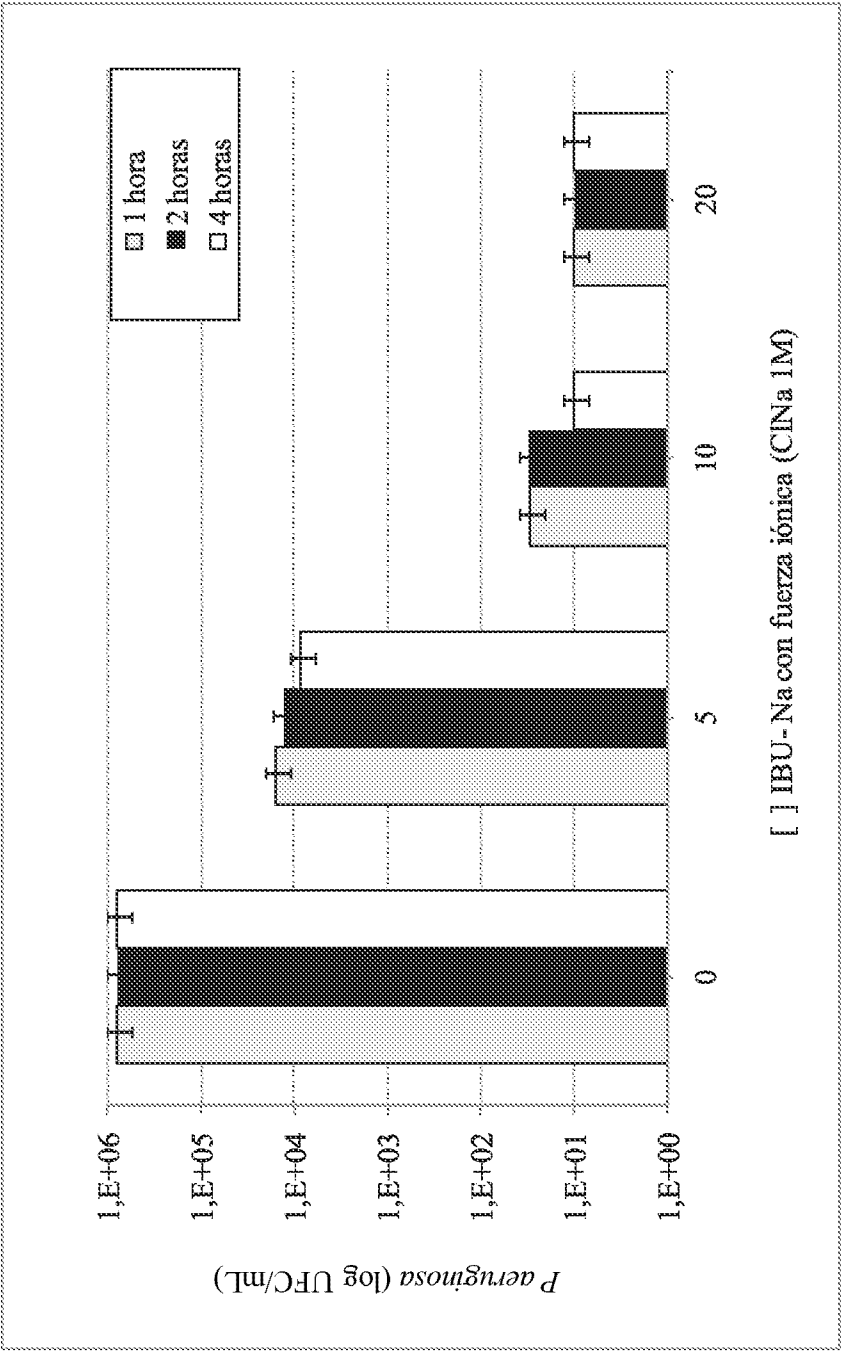


Figura 12

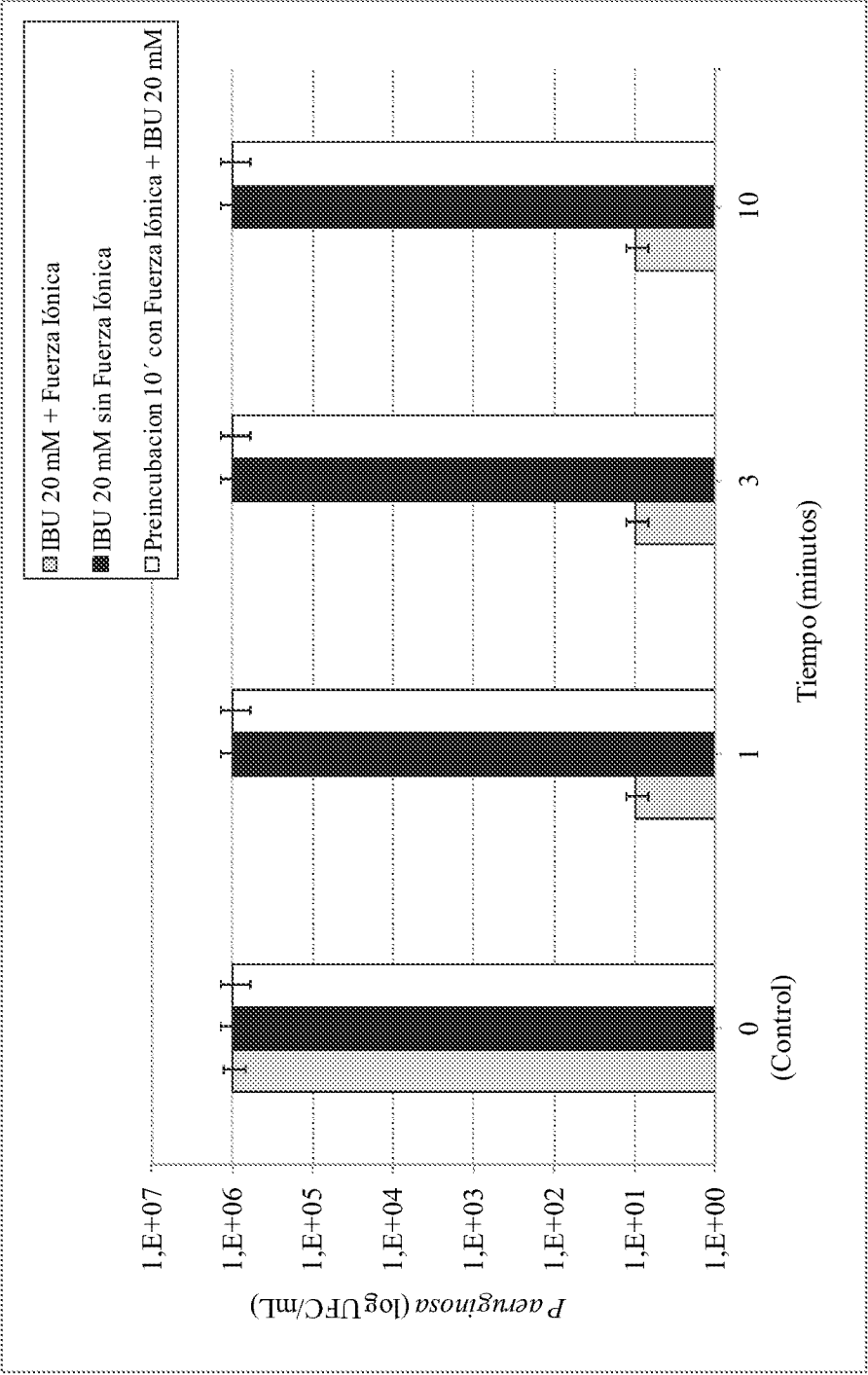


Figura 13

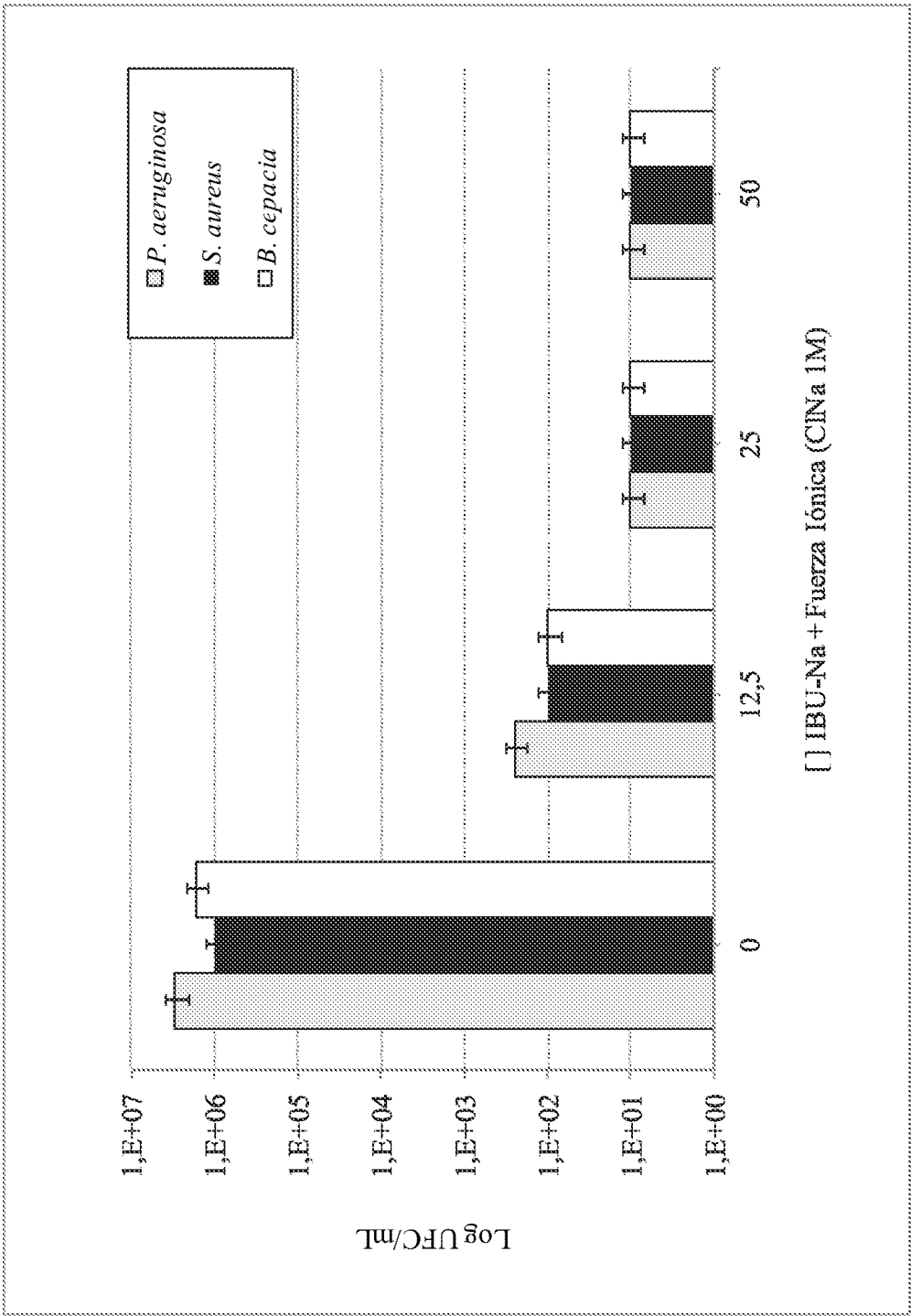


Figura 14

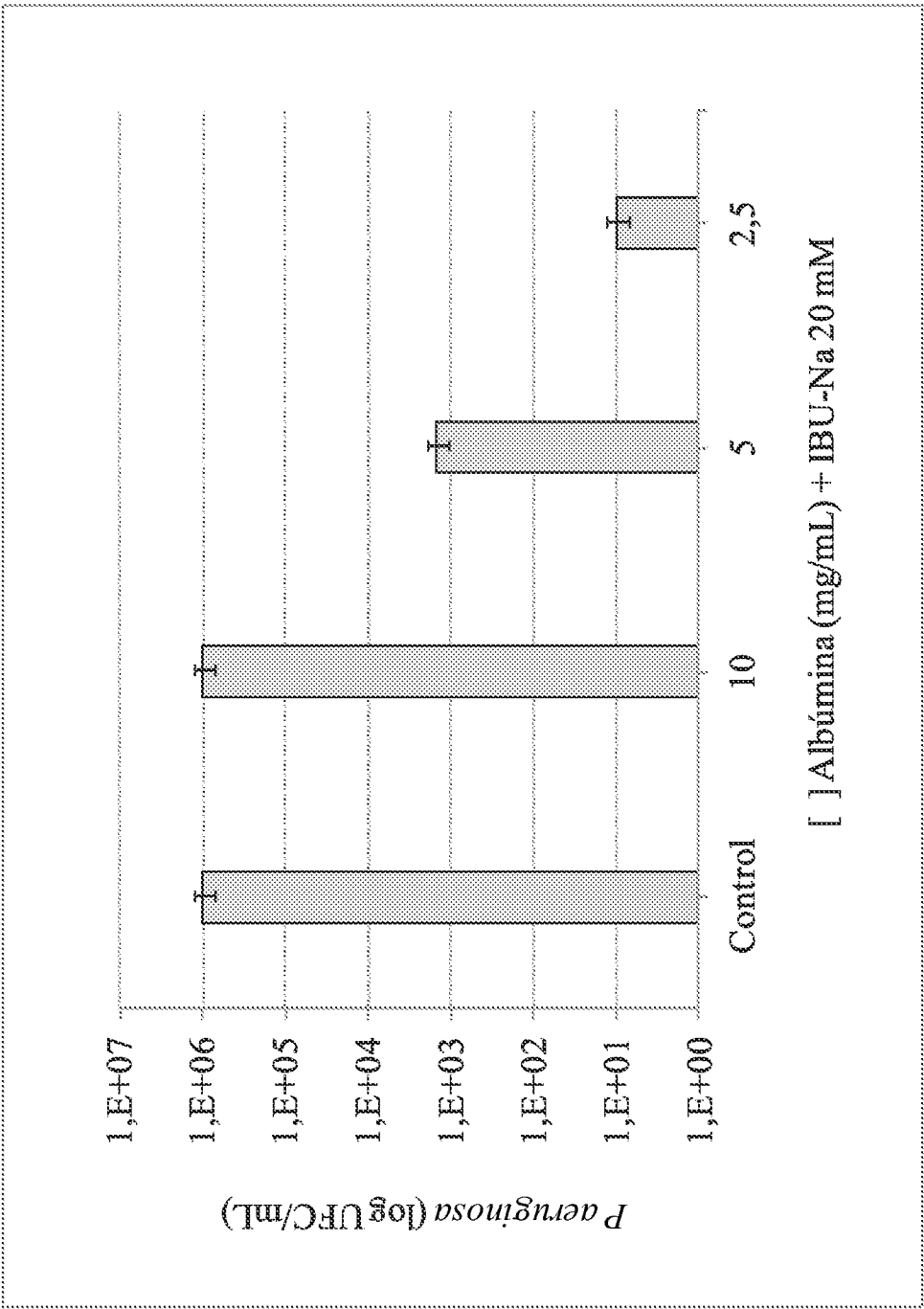


Figura 15

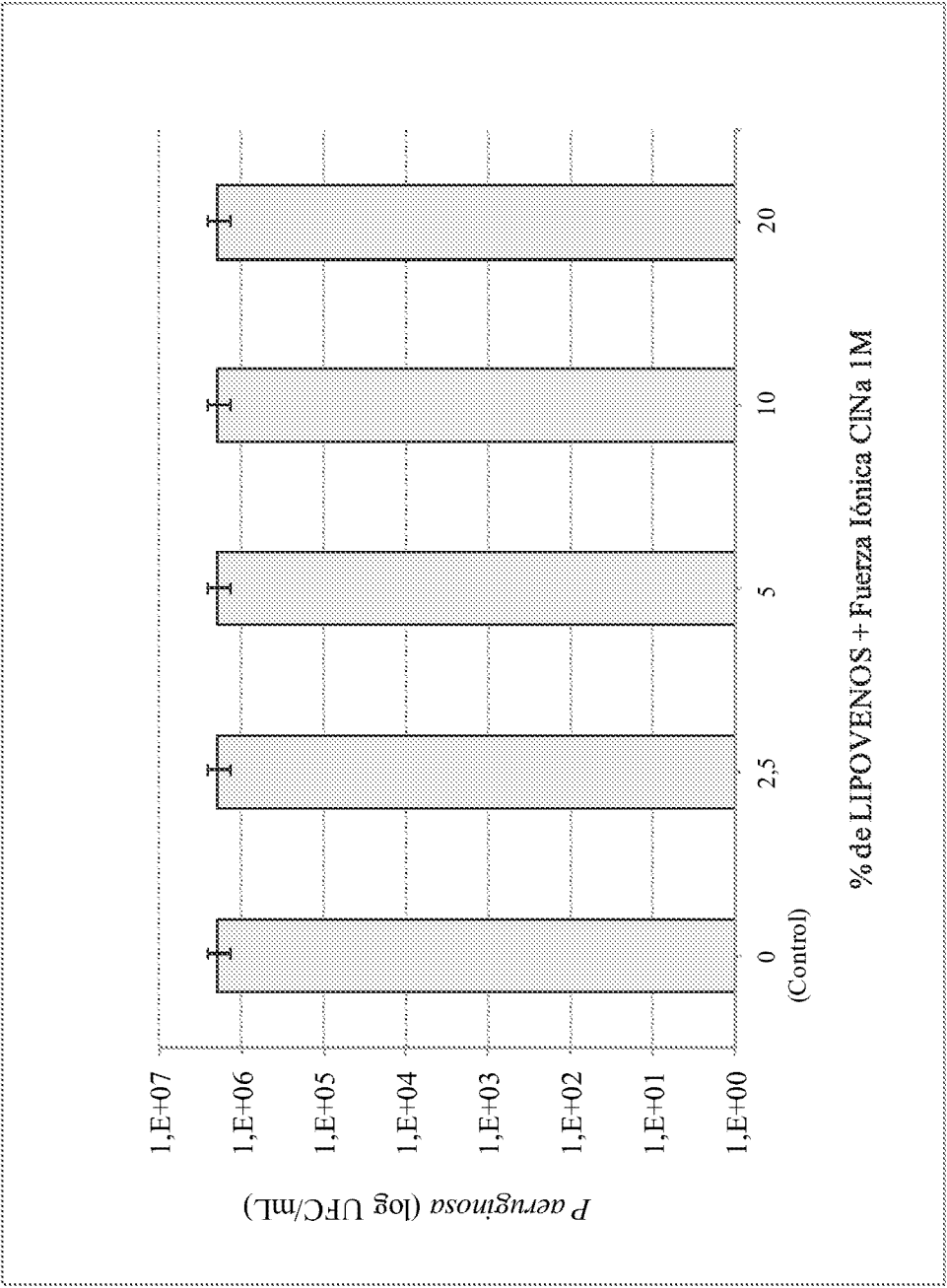


Figura 16

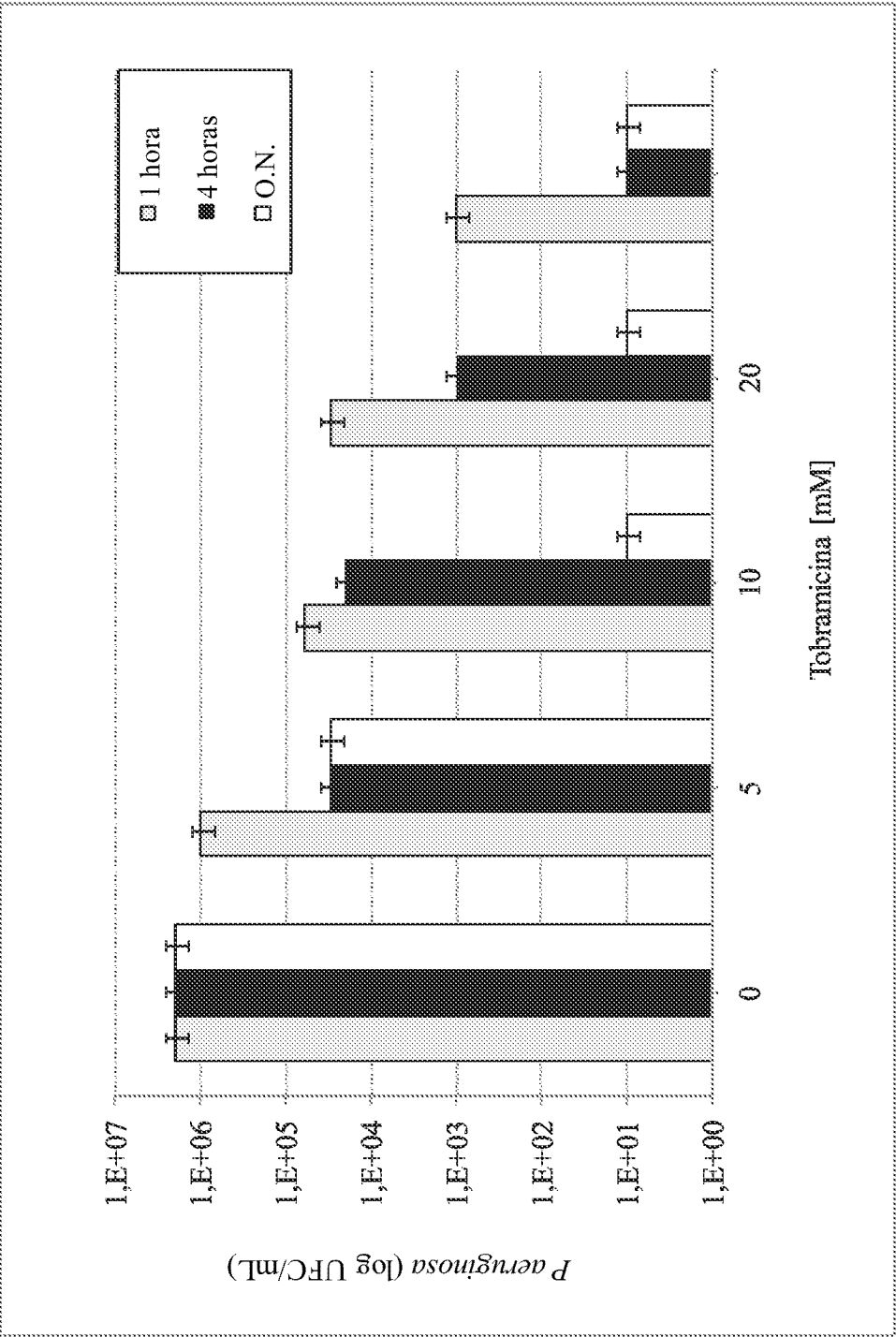


Figura 17

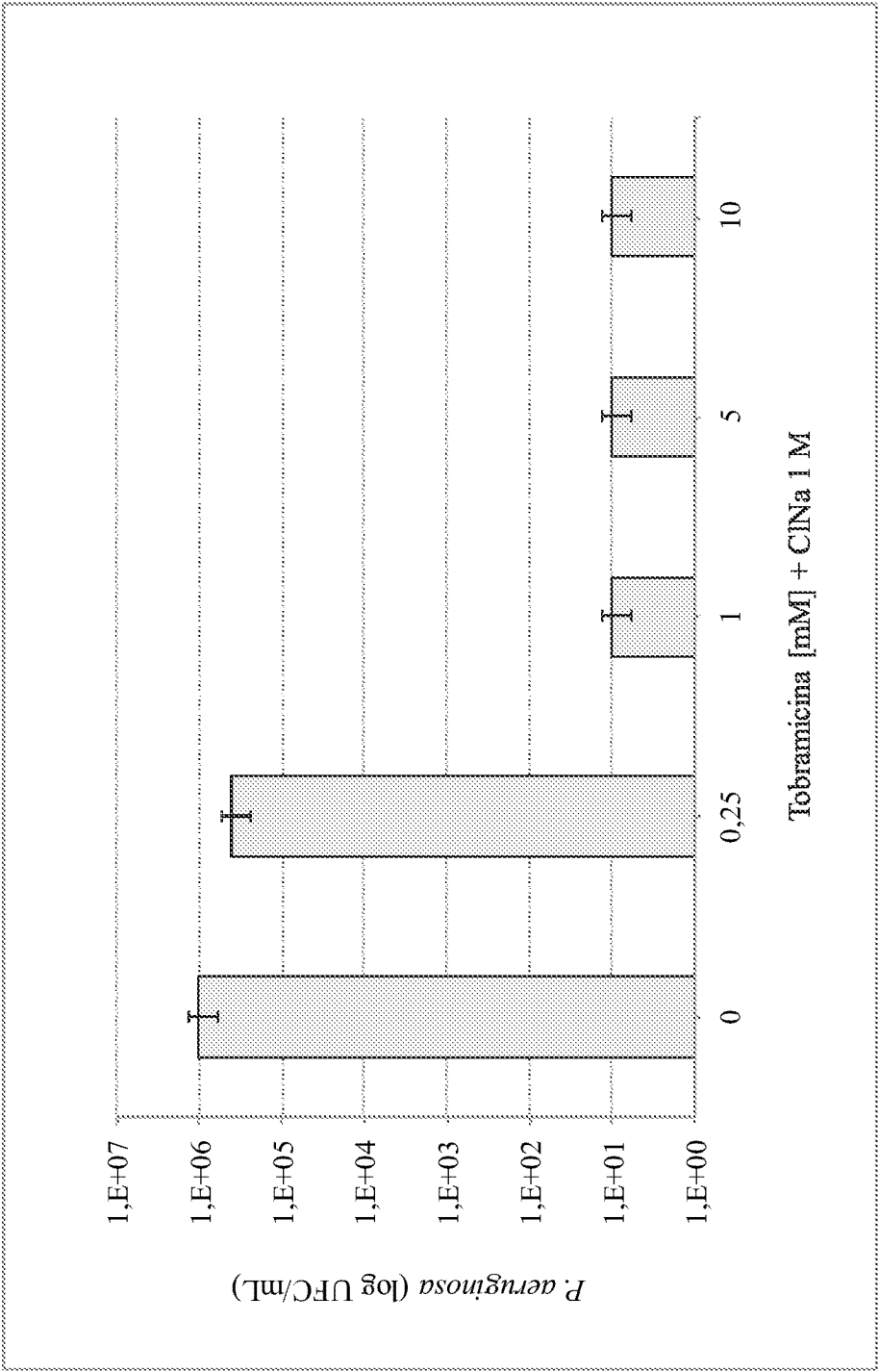


Figura 18

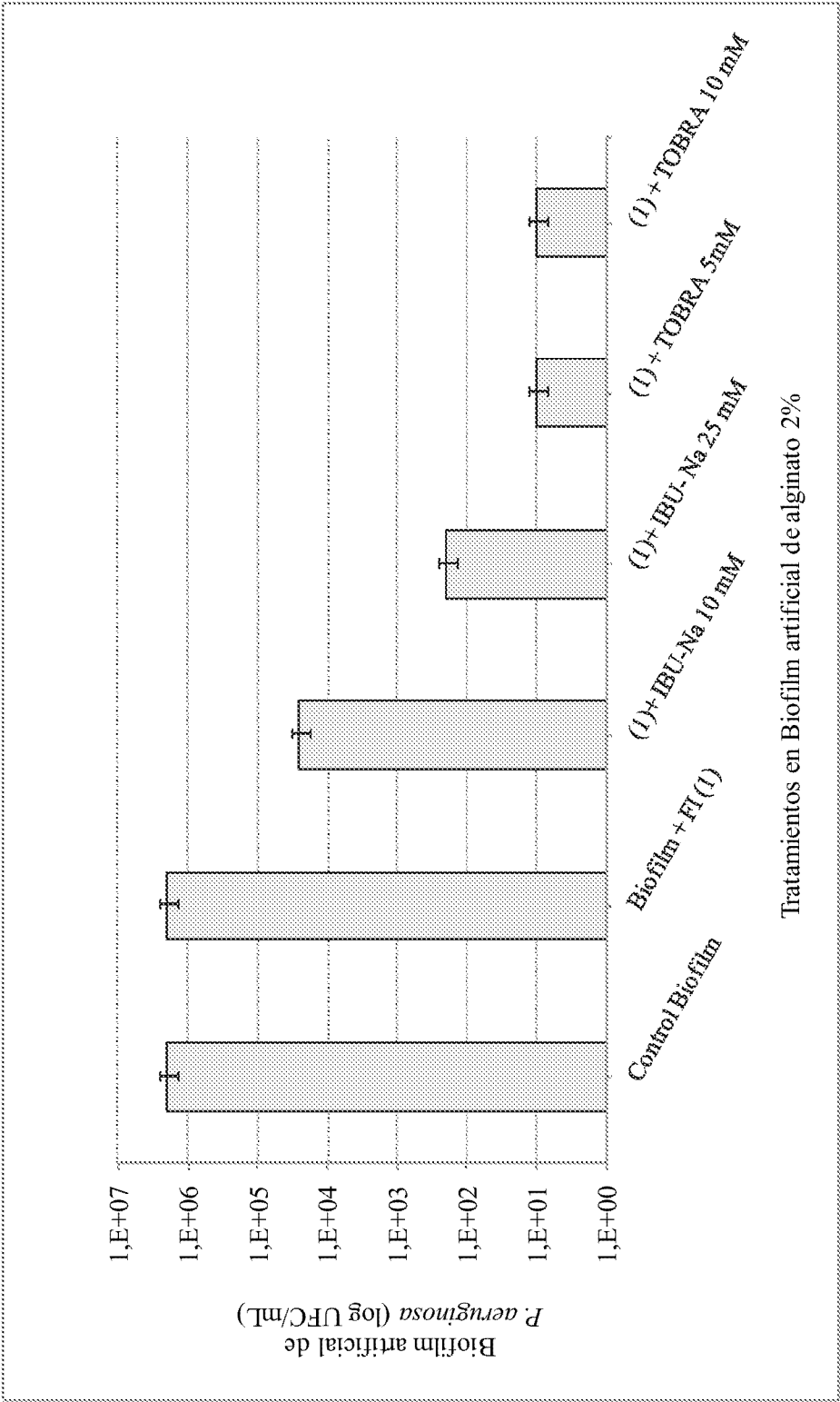


Figura 19

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ES2016/070702

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K31/192 (2006.01)

A61K33/14 (2006.01)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Mínimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPODOC, INVENES, WPI, EMBASE, BISOSI, MEDLINE, NPL, XPESP, XPESP2

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 4607038 A (OGATA KAZUMI et al.) 19/08/1986, example 5.	1-14, 18-33
X	CN 102138893 A (SHAANXI HONGFUYIYUE PHARMACEUTICAL CO LTD) 03/08/2011, (abstract) [on line] [retrieved the 15.12.2016]. Retrieved from: EPO WPI Database; DW 201164; n° acceso 2011-K83076.	1-14, 18-33
X	WO 2012099479 A1 (BAYER NEW ZEALAND LTD et al.) 26/07/2012, examples.	1, 3, 7-10, 12-14, 20-27, 29-33
A	US 5885597 A (BOTKNECHT JONAH et al.) 23/03/1999, example 4.	

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.	
"E" earlier document but published on or after the international filing date	
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means.	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
19/12/2016

Date of mailing of the international search report
(20/12/2016)

Name and mailing address of the ISA/

Authorized officer
N. Vera Gutiérrez

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Facsimile No.: 91 349 53 04

Telephone No. 91 3495544

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2016/070702

C (continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	AL-JANABI ALI ABDUL HUSSEIN S In vitro antibacterial activity of Ibuprofen and acetaminophen.. Journal of global infectious diseases India May 2010 00/05/2010 VOL: 2 No: 2 Pags: 105 - 108; 30/04/2010, ISSN 0974-8245 (Electronic) Doi: doi:10.4103/0974-777X.62880 pubmed:20606962	1-33
A	GUZMAN, Juan D., et al.; Antitubercular specific activity of ibuprofen and the other 2-arylpropanoic acids using the HT-SPOTi whole-cell phenotypic assay. BMJ Open, 2013, volume 3, número 6; ISSN 2044-6055 (Electronic); doi:10.1136/bmjopen-2013-002672 pubmed:23794563	1-33

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2016/070702

Information on patent family members

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US4607038 A	19.08.1986	PT80004 A PT80004 B NL8500561 A NL192821B B KR920001461B B1 JPS60184013 A JPH0216728B B2 IT1 185522 B GB2154876 A GB2154876 B FR2560523 A1 FR2560523 B 1 ES8607722 A1 DE3507024 A1 DE3507024 C2 CH662945 A5 CA1256375 A BE901792 A1 AU3941785 A AU580586B B2	01.03.1985 18.09.1987 01.10.1985 03.11.1997 14.02.1992 19.09.1985 18.04.1990 12.11.1987 18.09.1985 04.11.1987 06.09.1985 25.11.1988 16.11.1986 12.09.1985 21.07.1994 13.11.1987 27.06.1989 17.06.1985 05.09.1985 19.01.1989
----- CN102138893 A -----	----- 03.08.2011 -----	----- NONE -----	----- ----- -----
WO20 12099479 A1	26.07.2012	BR112013018557 A2 ZA201305780 B CL2013002086 A1 GT20 1300 182 A KR20 1400 12646 A PE00352014 A1 CR20 130401 A CO6801732 A2 MX20 13008407 A CN103327984 A CN103327984B B NZ588686 A AU2012207698 A1	22.11.2016 30.04.2014 25.07.2014 28.07.2014 03.02.2014 16.02.2014 04.02.2014 29.11.2013 26.09.2013 25.09.2013 17.08.2016 26.07.2013 18.04.2013
----- US5885597 A -----	----- 23.03.1999 -----	----- NONE -----	----- ----- -----

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES2016/070702

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

A61K31/192 (2006.01)

A61K33/14 (2006.01)

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61K

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

EPODOC, INVENES, WPI, EMBASE, BISOSI, MEDLINE, NPL, XPESP, XPESP2

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
X	US 4607038 A (OGATA KAZUMI et al.) 19/08/1986, ejemplo 5.	1-14, 18-33
X	CN 102138893 A (SHAANXI HONGFUYIYUE PHARMACEUTICAL CO LTD) 03/08/2011, (resumen) [en línea] [recuperado el 15.12.2016]. Recuperado de: EPO WPI Datábase; DW 201 164; nº acceso 201 1-K83076.	1-14, 18-33
X	W O 2012099479 A1 (BAYER NEW ZEALAND LTD et al.) 26/07/2012, ejemplos.	1, 3, 7-10, 12-14, 20-27, 29-33
A	US 5885597 A (BOTKNECHT JONAH et al.) 23/03/1999, ejemplo 4.	

IHI En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos ☒ Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

* Categorías especiales de documentos citados:	"T"	documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.		
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.		
"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).	"X"	documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.	"Y"	documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia,
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.	"¿fe"	documento que forma parte de la misma familia de patentes.

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.
19/12/2016

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional.
20 de diciembre de 2016 20/12/2016)

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional
OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Nº de fax: 91 349 53 04

Funcionario autorizado
N. Vera Gutiérrez
Nº de teléfono 91 3495544

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

PCT/ES2016/070702

C (Continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría *	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones n°
A	AL-JANABI ALI ABDUL HUSSEIN S In vitro antibacterial activity of Ibuprofen and acetaminophen. Journal of global infectious diseases India May 2010 00/05/2010 VOL: 2 No: 2 Pags: 105 - 108; 30/04/2010, ISSN 0974-8245 (Electronic) Doi: doi:10.4103/0974-777X.62880 pubmed:20606962	1-33
A	GUZMAN, Juan D., et al.; Antitubercular specific activity of ibuprofen and the other 2-arylpropanoic acids using the HT-SPOTi whole-cell phenotypic assay. BMJ Open, 2013, volumen 3, número 6; ISSN 2044-6055 (Electronic); doi:10.1136/bmjopen-2013-002672 pubmed:23794563	1-33

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Informaciones relativas a los miembros de familias de patentes

Solicitud internacional nº

PCT/ES2016/070702

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
US4607038 A	19.08.1986	PT80004 A PT80004 B NL8500561 A NL192821B B KR920001461B B1 JPS60184013 A JPH0216728B B2 IT1 185522 B GB2154876 A GB2154876 B FR2560523 A1 FR2560523 B 1 ES8607722 A1 DE3507024 A1 DE3507024 C2 CH662945 A5 CA1256375 A BE901792 A1 AU3941785 A AU580586B B2	01.03.1985 18.09.1987 01.10.1985 03.11.1997 14.02.1992 19.09.1985 18.04.1990 12.11.1987 18.09.1985 04.11.1987 06.09.1985 25.11.1988 16.11.1986 12.09.1985 21.07.1994 13.11.1987 27.06.1989 17.06.1985 05.09.1985 19.01.1989
----- CN102138893 A -----	----- 03.08.2011 -----	----- NINGUNO -----	----- ----- -----
WO20 12099479 A1	26.07.2012	BR112013018557 A2 ZA201305780 B CL2013002086 A1 GT20 1300 182 A KR20 1400 12646 A PE00352014 A1 CR20 130401 A CO6801732 A2 MX20 13008407 A CN103327984 A CN103327984B B NZ588686 A AU2012207698 A1	22.11.2016 30.04.2014 25.07.2014 28.07.2014 03.02.2014 16.02.2014 04.02.2014 29.11.2013 26.09.2013 25.09.2013 17.08.2016 26.07.2013 18.04.2013
----- US5885597 A -----	----- 23.03.1999 -----	----- NINGUNO -----	----- ----- -----