



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI0621210-7 A2**

(22) Data de Depósito: 26/04/2006
(43) Data da Publicação: 06/12/2011
(RPI 2135)



(51) *Int.Cl.:*
A61K 31/015

(54) **Título:** MÉTODOS E COMPOSIÇÕES BACTERICIDAS, BACTERIOSTÁTICOS E ANTIINFLAMATÓRIOS

(30) **Prioridade Unionista:** 24/02/2006 US 11/361.589

(73) **Titular(es):** CHIANG, CHUAN-CHI, SHI, GUEY-YUEH, SU, HUI-PIN, WU, HUA-LIN

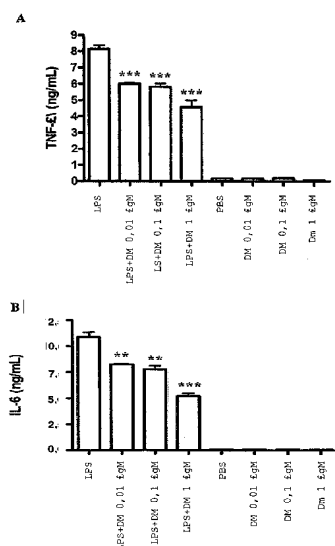
(72) **Inventor(es):** CHIANG, CHUAN-CHI, SHI, GUEY-YUEH, SU, HUI-PIN, WU, HUA-LIN

(74) **Procurador(es):** CRUZEIRO NEWMARC PATENTES E MARCAS LTDA

(86) **Pedido Internacional:** PCT US2006015661 de 26/04/2006

(87) **Publicação Internacional:** WO 2007/097765de 30/08/2007

(57) **Resumo:** MÉTODOS E COMPOSIÇÕES BACTERICIDAS, BACTERIOSTÁTICOS E ANTIINFLAMATÓRIOS. A presente invenção se refere a um método para prover agente bactericida ou bacteriostático, especialmente para tratar doença devido à infecção bacteriana. O método compreende a administração a um paciente, em necessidade deste tratamento, de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um composto de dextrometorfano ou naloxona ou um sal farmacologicamente aceitável ou um análogo do mesmo. O composto é aplicado à superfície da pele ou mucosa do paciente. A invenção também se refere a um método de tratamento de inflamação causada por supressão de secreção de TNF- α , IL- β , ou MCP-1 de macrófago compreendendo a administração a um paciente, em necessidade deste tratamento, de uma quantidade terapeuticamente eficaz de inibidor de NADPH oxidase.





PI0621210-7

"MÉTODOS E COMPOSIÇÕES BACTERICIDAS,

BACTERIOSTÁTICOS E ANTIINFLAMATÓRIOS"

HISTÓRICO DA INVENÇÃO

1. Campo da Invenção

5 A presente invenção se refere a um método para prover agente bactericida ou bacteriostático. A invenção também se refere a um método para tratar inflamação causada por fator- α de necrose tumoral (TNF- α) e interleucina-6 (IL-6) ou proteína quimiotática de monócito-1 (MCP-1) de macrófago.

10 Acne é desenvolvida em adolescentes em uma incidência de 90%, mas também é encontrada em adultos por volta dos vinte ou trinta anos de idade em raros intervalos. Acne (ou Acne vulgar) é uma doença inflamatória crônica ou um distúrbio desenvolvido na glândula sebácea e folículos capilares, nos quais
15 a etiopatologia inclui excesso de secreção de sebo, desceratinização da epiderme de folículos capilares, crescimento excessivo de bactéria anaeróbica de colonização da pele, *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*) e outras causas. A acne é geralmente encontrada na face, peito, costas, pescoço, bráquio, as
20 partes mais visíveis da pele, e é caracterizada como comedo, pústula, lúpus, pequena protuberância ou cicatriz.

A acne aflige milhões de pessoas em todo o mundo. Terapias atualmente disponíveis têm uma variedade de desvantagens, variando de efeitos adversos (tais como bolhas,
25 fotossensibilidade, reações alérgicas) em pacientes até a ausência de eficácia ou eficácia mínima em pacientes (por exemplo, devido à resistência microbiana aos agentes terapêuticos). Consequentemente, ainda existe a necessidade de um meio

terapêutico alternativo para tratamento ou controle de acne, especialmente acne vulgar.

Como um resultado do crescimento bacteriano nestas impatações córneas, as rupturas de folículo iniciam a fase inflamatória da doença que toma a forma de pústulas, pápulas, cistos e nódulos. Embora muitas abordagens diferentes tenham sido usadas para o tratamento deste problema, nenhuma foi universalmente eficaz e a maioria possui efeitos colaterais indesejados.

Dextrometorfano (DM, (+)-3-metoxi-17-metil-9a, 13a, 14a-morfinano), um agente antitussígeno comercializado sem prescrição médica, é um antagonista não competitivo do receptor N-metil-D-aspartato (NMDA) e é protetor contra o efeito adverso de Hcy (homocisteína) e seus metabólitos. DM, o isômero D do agonista de opiato levorfanol, não tem nenhum dos efeitos analgésicos ou sedativos associados com os opiatos. DM, agindo como um antagonista nos receptores NMDA, suprime a transmissão de impulsos nervosos e sinais nervosos mediados através dos receptores NMDA. Adicionalmente, foi também relatado que DM suprime a atividade nos canais neuronais de cálcio.

DM é um antitussígeno usado no tratamento e alívio de sintomas da tosse associados com doença das vias respiratórias superiores, tais como gripe ou resfriado comum. Ele está comercialmente disponível na forma de seu sal de bromidrato, DM-Br (bromidrato de dextrometorfano). O sal dissolve prontamente nos sucos digestivos onde o DM é alimentado para a corrente sangüínea. A modificação biológica e/ou eliminação do medicamento do corpo começa imediatamente. As doses usuais para liberação

imediate do medicamento do corpo variam de aproximadamente 15 a aproximadamente 30 mg administrados a cada 4 a 6 horas.

DM é um opióide sintético. Normalmente, o bromidrato de DM é usado farmacologicamente, embora outros sais não estejam excluídos. A preparação de (+)-3-metoxi-17-metil-9a, 13a, 14a-morfinano foi revelada na Patente Norte-Americana Nº 2.676.177 (Schnider et al.) e em Hafliger et al., *Helv. Chil. Acta* 39, 1956:2053.

Administração transdérmica de DM, mas não como agente antitussígeno, é conhecida, por exemplo, a partir da Patente Norte-Americana Nº 5.260.066 para bandagens de criogel.

Dextrometorfano (DM) é amplamente usado como um xarope para tosse, e demonstrou ser suficientemente seguro em seres humanos para permitir seu uso como um medicamento comercializado sem prescrição médica. Ele é bem tolerado na forma de dosagem oral, tanto sozinho quanto com quinidina, até 120 miligramas (mg) por dia, e um efeito benéfico pode ser observado ao receber uma dose substancialmente menor (por exemplo, 30 mg/dia) (Patente Norte-Americana Nº 5.206.248).

DM é um antagonista de receptor NMDA não competitivo, fraco, que se liga com afinidade de moderada a alta ao local de fenciclidina do complexo receptor. Entretanto, DM tem propriedades farmacológicas adicionais únicas. Estudos de ligação sugerem que ele é um ligante no local 1 sigma de alta afinidade, onde foi proposto inicialmente que ele agia como um antagonista, mas mais recentemente como um agonista (Maurice et al., *Brain Res. Brain Res. Rev.*, 2001; 37:116-32). Ligantes do tipo sigma também modulam respostas NMDA.

Chien-Chuan Wang et al. usaram um modelo de endotoxemia induzido com LPS em ratos. Neste estudo, eles examinaram se uma diminuição na produção de citocina ou NO em sepse está envolvida nos efeitos benéficos de DM em animais com endotoxemia. Seus resultados demonstraram que DM inibe TNF- α (suprimindo, assim, indiretamente, a produção de IL-10), NO, e o ânion de superóxido, resultando na moderação do desenvolvimento de efeitos prejudiciais (incluindo falha circulatória e mortalidade) em endotoxemia induzida por LPS em roedores. Seus resultados indicaram que DM tem efeitos benéficos que podem, potencialmente, serem desenvolvidos como um tratamento para pacientes com sepse (Wang et al., J. Biomed. Sci., 2004; 11:739-747).

Naloxona (nome comercial Narcan) é um medicamento usado para combater os efeitos de superdosagem de opiatos tais como heroína ou morfina. Naloxona foi distribuído como parte de kits de emergência para viciados em heroína, o que demonstrou reduzir as taxas de mortalidade. O medicamento também bloqueia a ação de endorfinas de diminuição de dor que o corpo produz naturalmente. A razão provável para isto é que estas endorfinas operam nos mesmos receptores de opiato.

A Patente Norte-Americana Nº 5.366.980 revelou um método para tratar pacientes humanos que sofriam de dermatite, especificamente dermatite grave, que não responde adequadamente a medicamentos sem prescrição. Estes pacientes são tratados usando DM, um agente antitussígeno normalmente usado em xarope para tosse. Se o paciente for um assim chamado "metabolizador extensivo", um medicamento antioxidante (tal como quinidina) pode ser co-administrado para inibir a atividade degradante de DM de

debrisoquina hidroxilase, uma enzima que converterá rapidamente DM em seu metabólito, dextrorfano. Este tratamento demonstrou ser altamente eficaz para tratar dermatite grave, e na maioria dos pacientes esta combinação de medicamentos não causa efeitos
5 adversos significativos.

O uso de camundongos "knockout" implicou a citocina quimiotática (quimocina), proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1), na atração de recrutamento de macrófago em aterosclerose. Estímulos de ativação de macrófago associados com
10 fatores de risco ateroscleróticos incluem lipoproteína de baixa densidade oxidada (oxLDL, 'colesterol ruim'), produtos finais de glicosilação avançada (AGEs) de diabete, angiotensina II e endotelina. Trabalho substancial esclareceu a ativação de macrófago por OxLDL por meio de receptores limpadores de macrófago
15 (MSRs), especialmente MSRA e CD36. Macrófagos ativados expressam moléculas efetoras que matam células e degradam a matriz extracelular. Estes incluem Fas-L e óxido nítrico (NO). NO de macrófago é derivado do caminho da sintase de óxido nítrico induzível de alta produção (iNOS) e regula para cima Fas de
20 superfície celular de músculo vascular liso (VSMC), preparando-os para apoptose. Macrófagos ativados expressam Fas-L de superfície, similar a linfócitos T citotóxicos e células matadoras naturais. Visto que VSMCs promovem estabilidade de placa, apoptose de VSMC pode promover ruptura de placa. Macrófagos expressam múltiplas
25 metaloproteínases (por exemplo, estromelisina) e serina proteases (por exemplo, urocinase) que degradam a matriz extracelular, enfraquecendo a placa e tornando-a propensa à ruptura.

Macrófagos secretam numerosos outros efetores,

incluindo espécies reativas a oxigênio, eicosanóides, fator de necrose de tumor alfa (TNF- α), interleucina-1 (IL-1) e interleucina-6 (IL-6). Fator de crescimento de transformação derivado de macrófago beta promove fibrose. Tratamentos cardiovasculares existentes incluindo antagonistas de receptor de angiotensina II e inibidores de enzima de conversão de angiotensina, aspirina, agentes de redução de colesterol, especialmente as estatinas, podem inibir macrófagos. A interação de doadores de NO com macrófagos e apoptose é complexa e bifuncional. Agentes antiinflamatórios tradicionais tais como glicocorticóides e ciclofosfamida possuem efeitos colaterais muito graves e são, provavelmente, inadequados.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A presente invenção provê um método para tratamento de doença resultante de infecção bacteriana, compreendendo a administração, a um paciente em necessidade deste tratamento, de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um composto bactericida.

A presente invenção provê ainda um método para tratamento de doença inflamatória causada pela supressão de secreção de TNF- α , IL-6, ou MCP-1 de macrófago, compreendendo a administração a um paciente em necessidade deste tratamento de uma quantidade terapeuticamente eficaz de inibidor de NADPH oxidase.

A presente invenção também provê uma composição que compreende um inibidor de NADPH oxidase e um composto bactericida.

Outros objetivos e características da presente invenção se tornarão aparentes a partir da descrição detalhada a

seguir, considerada em conjunto com os desenhos anexos. Deve ser entendido, entretanto, que os desenhos são designados unicamente para objetivos ilustrativos e não como uma definição dos limites da invenção, para o que deveriam ser consideradas as reivindicações anexas. Deve ser entendido ainda que os desenhos não estão necessariamente em escala e que, a menos que indicado de forma diferente, eles meramente objetivam ilustrar conceitualmente as estruturas e procedimentos descritos aqui.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

Nos desenhos:

A Figura 1 mostra o efeito do tratamento com dextrometorfano na liberação de macrófago induzido por LPS de TNF- α (A) e IL-6 (B). A cultura de célula THP-1 foi pré-tratada durante 1 hora com as concentrações indicadas de dextrometorfano antes da estimulação com 100 ng/mL de LPS. Os sobrenadantes foram colhidos após 24 horas para a medição de TNF- α e IL-6. Os resultados são expressos como a média $\pm$ Padrão de 3 experimentos.

** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ são comparados com as culturas tratadas com LPS.

A Figura 2 mostra o efeito de tratamento com naloxona na liberação de macrófago induzido por LPS de TNF- α (A), IL-6 (B) e MCP-1 (C).

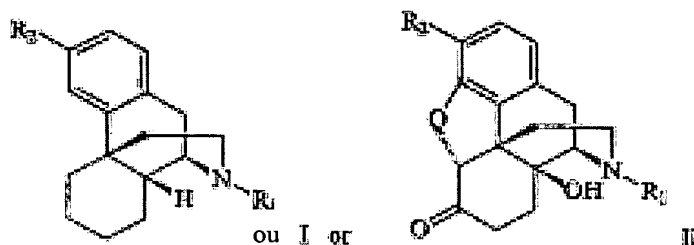
DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A maioria das doenças ou distúrbios causados por infecção bacteriana envolve o crescimento maciço do patógeno e efeitos colaterais indesejados tal como inflamação. Embora exista uma grande quantidade de antibióticos para matar ou inibir o crescimento de patógenos e alguns medicamentos para tratamento de

inflamação, não foi possível atingir um bom desempenho no tratamento de algumas doenças problemáticas tal como a acne.

A presente invenção mostra que o morfinano substituído (tal como dextrometorfano) tem atividades bactericidas e bacteriostáticas em bactérias (tal como *Propionibacterium acnes*).

Consequentemente, a presente invenção se refere a um método para tratar uma doença devido à infecção bacteriana, compreendendo a administração, a um paciente em necessidade deste tratamento, de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um composto da fórmula I ou fórmula II, ou de um sal farmaceuticamente aceitável ou análogo do mesmo,



onde

R_1 é alquila C_{1-6} , alquenila C_{2-6} , ciclo alquila- C_{3-6} alquila- C_{1-6} , ou alquilenos C_{2-6} e R_2 é H, OH, alquila C_{1-6} , alcoxi C_{1-6} , alquenila C_{2-6} ou alquilenos C_{2-6} .

O sal preferido de fórmula I é bromidrato de dextrometorfano ou fosfato de dextrometorfano. O composto preferido de fórmula II é 17-alil-4, 5 α -epóxi-3, 14-diidroxi-morfinan-6-ona (naloxona) ou 17-(ciclopropilmetil)-4-, 5 α -epóxi-3, 14-diidroxi-morfinan-6-ona (naltrexona). O composto preferido de fórmula I é (+)-3-metoxi-17-metil-9 α , 13 α , 14 α -morfinano (dextrometorfano). A maioria dos opiáceos analgésicos que

causam dependência, tais como morfina, codeína e heroína, são estereoisômeros levorrotatórios (eles giram luz polarizada na direção denominada de esquerda). Eles possuem quatro anéis moleculares em uma configuração conhecida como uma estrutura "morfinano". Muitos análogos de dextrorrotatórios de morfina causam muito menos dependência que os compostos levorrotatórios. Alguns destes análogos dextrorrotatórios, incluindo dextrometorfano e dextrorfano, são enantiômeros da estrutura de morfinano. Nestes enantiômeros, o anel que se estende para fora dos átomos de carbono 9 e 13 é orientado da direção oposta daquela ilustrada na estrutura acima.

A presente invenção também se refere a um método para tratamento de doença inflamatória causada pela supressão de secreção de TNF- α , IL-6 ou MCP-1 de macrófago compreendendo a administração, a um paciente em necessidade deste tratamento, de uma quantidade terapeuticamente eficaz de inibidor de NADPH oxidase.

De acordo com um método da presente invenção, onde a bactéria infecciosa é gram-positiva ou gram-negativa, *Propionibactérias* são bactérias anaeróbicas de crescimento lento, não formadoras de esporo, e gram-positivas. Elas podem ter o formato de haste ou serem ramificadas e podem ocorrer sozinhas, aos pares, ou em grupos. Elas geralmente produzem ácido láctico, ácido propiônico, e ácido acético de glicose. *Propionibacterium* *acnes* é uma bactéria gram-positiva que habita a pele humana de um adulto. Ela reside dentro dos folículos sebáceos, usualmente como um comensal inofensivo, mesmo se estiver envolvida na formação de acne. Ela também está associada a outras doenças como

endocardites, úlceras córneas, entre outras. Entretanto, *Bacteroides fragilis*, uma haste gram-negativa, constitui de 1% a 2% da microflora bacteriana de colônia normal em seres humanos. Ela está frequentemente associada com infecções extra-intestinais tais como abscessos e infecções do tecido mole, assim como doenças diarréicas em animais e seres humanos. Portanto, a melhor configuração da bactéria infecciosa é *Propionibacterium acnes* ou *Bacteroides fragilis*. A melhor configuração de bactérias infecciosas é *Propionibacterium acnes* que causa acne.

10 Uma dose da composição farmacêutica contém pelo menos uma quantidade terapeuticamente eficaz do composto ativo (isto é, um composto da fórmula I ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo), e preferivelmente é constituída de uma ou mais unidades de dosagem farmacêutica. A dose selecionada pode ser 15 administrada a um mamífero, por exemplo, um paciente humano, em necessidade deste tratamento, em uma quantidade terapeuticamente eficaz de um composto da fórmula I ou de um sal farmaceuticamente aceitável ou um análogo do mesmo, por meio de qualquer método conhecido ou adequado de administração da dose, incluindo 20 topicamente, por exemplo, como um unguento ou creme; oralmente; retalmente, por exemplo, como um supositório; parenteralmente por injeção; ou continuamente por infusão intravaginal, intranasal, intrabronquial, intra-aural, ou intra-ocular. A melhor configuração do composto é aplicada à pele ou superfície mucosa dos mamíferos que sofrem de infecção bacteriana. A melhor 25 configuração do mamífero é um paciente humano.

Uma "quantidade terapeuticamente eficaz" é considerada como uma quantidade de um composto inventivo que,

quando administrada a um mamífero em necessidade da mesma, seja suficiente para efetuar tratamento para condições de doenças aliviadas pela inibição da atividade das bactérias. A quantidade de um composto dado da invenção que será terapeuticamente eficaz
5 irá variar dependendo de fatores tais como o composto específico, a condição da doença e a gravidade da mesma, a identidade do mamífero em necessidade da mesma, cuja quantidade pode ser rotineiramente determinada por profissionais.

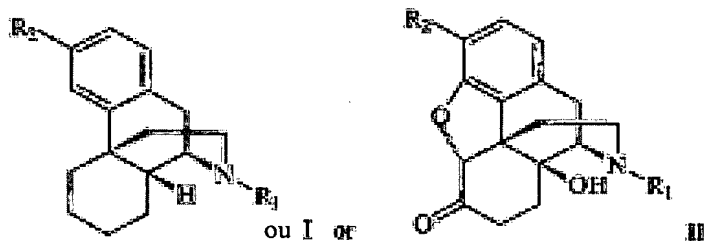
A quantidade eficaz do composto aplicado a um
10 paciente em necessidade deste tratamento varia de 10000 ppm a 1 ppm, preferivelmente de 5000 ppm a 1 ppm, mais preferivelmente de 1000 ppm a 1 ppm e mais preferivelmente, é de 1 ppm.

O termo "sal farmaceuticamente aceitável" usado aqui significa qualquer sal que seja farmaceuticamente aceitável e
15 tenha as propriedades farmacológicas desejadas. Estes sais incluem sais que podem ser derivados de um ácido inorgânico ou orgânico, ou de uma base inorgânica ou orgânica, incluindo aminoácidos, que não sejam tóxicos ou indesejáveis de qualquer maneira. Sais inorgânicos adequados incluem aqueles formados com metais
20 alcalinos, por exemplo, sódio e potássio, magnésio, cálcio e alumínio. Sais orgânicos adequados incluem aqueles formados com bases orgânicas tais como bases de amina, por exemplo, etanolamina, dietanolamina, trietanolamina, trometamina, N-metilglicamina e similares. Estes sais também incluem sais de
25 adição ácida formados com ácidos inorgânicos (por exemplo, ácido clorídrico e ácido bromídrico) e ácidos orgânicos (por exemplo, ácido acético, ácido cítrico, ácido maléico, e ácidos alcano e areno sulfônicos, tais como ácido metanossulfônico, ácido

benzenossulfônico, ácido sulfônico, e ácido fosfático). Quando existirem dois grupos ácidos presentes, um sal farmaceuticamente aceitável pode ser um mono-ácido-mono-sal ou di-sal; e similarmente, onde existirem mais que dois grupos ácidos presentes, alguns ou todos estes grupos podem ser salificados.

Foi descoberto que o uso de inibidor de NADPH oxidase em doença inflamatória causada pela supressão de secreção de TNF- α , IL-6, ou MCP-1 de macrófagos.

O termo "inibidor de NADPH oxidase" usado aqui é definido para abranger todos os compostos, incluindo sais farmaceuticamente aceitáveis dos mesmos, derivados dos mesmos, dímeros dos mesmos, e pró-medicamentos dos mesmos, que podem ser convertidos metabolicamente em um inibidor de NADPH oxidase ou impulso oxidativo. Qualquer inibidor de NADPH oxidase pode ser usado no método da presente invenção, contanto que ele seja seguro e eficaz. Exemplos adequados destes compostos incluem aqueles apresentados na WO 97/19679 ou na Patente Norte-Americana Nº 6090851. O inibidor de NADPH oxidase preferido é um composto da fórmula I ou fórmula II ou um sal farmaceuticamente aceitável ou um análogo do mesmo.



onde

R₁ é alquila C₁₋₆, alquenila C₂₋₆, ciclo alquila-C₃₋₆ alquila-C₁₋₆, ou alquilenos C₂₋₆ e

R₂ é H, OH, alquila C₁₋₆, alcoxi C₁₋₆, alquenila C₂₋₆

ou alquileno C_{2-6} .

O inibidor de NADPH oxidase mais preferido é (+)-3-metoxi-17-metil-9 α , 13 α , 14 α -morfinano (dextrometorfano), 17-alil-4,5 α -epóxi-3,14-diidroxiomorfinan-6-ona (naloxona) ou 17-
5 (ciclopropilmetil)-4,5 α -epóxi-3,14-diidroxiomorfinan-6-ona (naltrexona). O inibidor de NADPH oxidase mais preferido é bromidrato de dextrometorfano ou fosfato de dextrometorfano.

O papel principal do macrófago é a remoção dos patógenos e restos necróticos. A última função é mais importante
10 em inflamação crônica. Macrófagos também apresentam fragmentos de patógenos (denominados antígenos) que eles ingeriram com moléculas MHC classe II em suas membranas celulares. Células T ajudantes reconhecem isto e liberam uma notificação de linfocina para as células B. As células B, então, criam e liberam anticorpos
15 específicos para o antígeno específico, e assim para o patógeno. Macrófagos novamente assumem um papel porque eles são especialmente atraídos a células com anticorpos anexados.

A ativação de macrófago é o processo de alteração da morfologia e atividade funcional de macrófagos, de modo que
20 eles se tornam avidamente fagocíticos. Ele é iniciado por linfocinas, tal como o fator de ativação de macrófago (maf) e o fator inibitório de migração de macrófago (mmif), complexos imunes, c3b, e vários peptídeos, polissacarídeos, e adjuvantes imunológicos. O fator de estimulação de colônia de macrófago é um
25 fator de crescimento de glicoproteína que faz que a linha de célula comprometida prolifere e mature em macrófagos.

Devido a seu papel na fagocitose, macrófagos estão envolvidos em muitas doenças do sistema imunológico. Por

exemplo, eles participam na formação de granulomas, lesões inflamatórias que podem ser causadas por um grande número de doenças.

Foram descritos alguns distúrbios, em sua maioria, raros, de fagocitose ineficaz e função de macrófago. Ativação anormal de funções de macrófago está associada com doenças auto-imunes, assim como com processos inflamatórios crônicos e agudos.

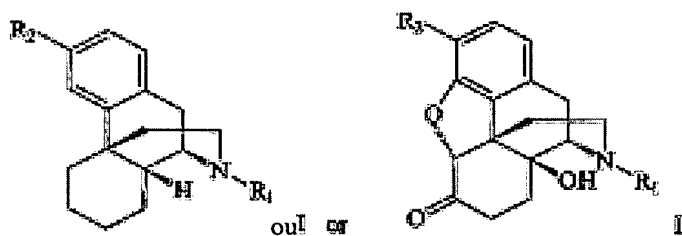
Neutrófilos polimorfonucleares (PMNs) têm um papel importante nas doenças inflamatórias. Eles agem como uma primeira linha de defesa contra microorganismos infecciosos invasores. Para este objetivo, PMNs contêm grânulos cheios com enzimas proteolíticas e outras enzimas citotóxicas. Além de liberar enzimas, PMNs também são capazes de fagocitose e de converter oxigênio em espécies de oxigênio altamente reativas (ROS). Após fagocitose, microorganismos ingeridos podem ser mortos dentro do fagossoma por uma ação combinada de atividade enzimática e produção de ROS. Embora a formação de ROS por PMNs estimulados seja uma resposta fisiológica que é vantajosa para o hospedeiro, isto pode também ser prejudicial em muitos estados inflamatórios nos quais estes radicais façam surgir danos excessivos de tecido. Portanto, existe uma pesquisa em andamento para compostos antiinflamatórios que sejam capazes de impedir esta produção de ROS danosa sem afetar as outras capacidades de eliminação do PMN.

Um mecanismo usado por PMNs para controlar micróbios é o impulso respiratório. Por este mecanismo, oxigênio molecular é convertido em ânions de superóxido por uma enzima de componentes múltiplos denominada NADPH oxidase. Durante a

fagocitose, a NADPH oxidase é acumulada na membrana do fagossoma e ânions de superóxido e outros ROS são acumulados dentro do fagossoma, muito próximos dos micróbios ingeridos.

É surpreendente que alguns inibidores de NADPH oxidase (tal como dextrometorfano) não apenas mostram atividade antiinflamatória, mas podem prover atividade bactericida ou bacteriostática. Este efeito é especialmente importante e útil no tratamento de acnes ou outras superfícies da pele ou mucosa.

Consequentemente, a presente invenção provê uma composição que compreende um inibidor de NADPH oxidase e um composto da fórmula I ou fórmula II, ou um sal farmaceuticamente aceitável ou um análogo do mesmo



onde

R₁ é alquila C₁₋₆, alquenila C₂₋₆, ciclo alquila C₃₋₆ alquila-C₁₋₆, ou alquileno C₂₋₆,

R₂ é H, OH, alquila C₁₋₆, alcoxi C₁₋₆, alquenila C₂₋₆ ou alquileno C₂₋₆, e veículo farmaceuticamente aceitável.

Em uma configuração preferida, tanto o inibidor de NADPH oxidase quanto um composto da fórmula I são direcionados para (+)-3-metoxi-17-metil-9α, 13α, 14α-morfinano (dextrometorfano), 17-alil-4, 5α-epóxi-3, 14-diidroxiomorfinan-6-ona (naloxona) ou 17-(ciclopropilmetil)-4, 5α-epóxi-3,14-diidroxiomorfinan-6-ona (naltrexona).

A composição da presente invenção poderia ser feita na forma de creme, ungüento, loção, óleo mineral, cosmético, xampu, creme antipruriginoso, adesivo para a pele, ou outras formas que possam ser espalhadas na epiderme ou por meio de administração transdérmica.

O método da presente invenção pode ser usado para cura de feridas, que é selecionada do grupo consistindo de incisões, lacerações, abrasões, feridas por perfuração, bolhas, rasgamentos da pele, locais de doador ou de enxerto, feridas por corte, feridas por queimadura ou feridas por radiação.

Os exemplos abaixo são não limitativos e são meramente representativos de vários aspectos e características da presente invenção.

Exemplo

Exemplo 1: Efeito antimicrobiano de DM sobre *Propionibacterium acnes* (bactérias anaeróbicas gram-positivas)

Solução de estoque de DM preparada em 500.000 ppm (50%). Foram adicionados 0,25 mg de DM em 250µl de DMSO e agitados até ficarem bem misturados. Então, 500.000 ppm de DM foram serialmente diluídas. 5 ml de *Propionibacterium acnes* foram centrifugados em cultura RCM (Meio Clostridial Reforçado). A concentração de célula de bactéria foi ajustada no meio através de diluição de 20 vezes sobre $OD_{595}=0,1 \times 10^6$ CFU/ml. 200 µl de célula de bactéria foram dispersos no meio em alíquotas a cada placa de 96 poços. Meio misturado incluindo célula de bactéria e 2 µl de DM, testes triplicados em cada concentração. Bactérias foram cultivadas sob condição anaeróbica a 37°C durante 96 horas e o valor foi medido em OD_{595} . MIC significava a menor concentração de

agente antibacteriano que foi suficiente para suprimir o crescimento de bactéria (por exemplo, inibição de crescimento).

Dispersão de 0,1 ml de meio incluindo célula de bactéria cujo valor OD₅₉₅ era de aproximadamente 0,1x10⁶ CFU/ml em placa de ágar RCM. 0,8 cm de papel filtro foi fixado e 20 µl de DM foi despejado no mesmo. Bactérias foram cultivadas sob condição anaeróbica a 37°C durante 96 horas e o tamanho do círculo antibiótico foi medido.

Resultado

Tabela 1: Teste MIC de *P. acnes* (Teste de Concentração de Inibição Mínima, Unidades de DM testadas são expressas como ppm e porcentagem (%)).

(+ : Inibição de Crescimento; --: Sem Inibição de Crescimento)

DM (ppm)	5000	2500	1250	1000	500	250	125
Porcentagem de DM (%)	5	2,5	1,25	1	0,5	0,25	0,125
Inibição de crescimento	+	+	+	+	+	--	--

Tabela 2: Resultado de difusão de disco de DM em inibição de crescimento bacteriano anaeróbico: cepa bacteriana *P. acnes* sob condição anaeróbica a 37°C durante 96 horas.

Disco N°	Conc. de DM	Diâmetro da zona limpa
5	5% DM	34 mm
6	2,5% DM	12 mm
7	1,25% DM	--
8	0,1% Triclosan	30 mm

Exemplo 2: Efeito antimicrobiano de DM em

***Bacteroides fragilis* (bactéria anaeróbica gram-negativa)**

Bacteroides fragilis que cresceram em 18-24 horas no caldo anaeróbico de tioglicolato foi usada para formular a suspensão de célula de bactéria de Mac Faland 0,5. Solução de estoque de 0,5g/ml de DMSO foi diluída com caldo de Tioglicolato anaeróbico. 1000 µl de caldo de Tioglicolato anaeróbico foi adicionado em 1000 µl de diluente DM com proporção de 1:1, e, então, foi colocado no incubador anaeróbico para incubar durante 24 horas.

10 Tabela 3: Teste MIC de *B. fragilis* (teste de Concentração Mínima de Inibição, Unidades de DM testado são expressas como ppm e porcentagem (%)).

(+ : Inibição de Crescimento; --: Sem Inibição de Crescimento)

DM (ppm)	5000	2500	1250	1000	500	Controle Negativo
Porcentagem de DM (%)	5	2,5	1,25	0,6	0,3	
Inibição de crescimento	+	+	+	--	--	--

15 "Controle Negativo" significa caldo de Tioglicolato mais bactéria sem DM.

Exemplo 3: Efeito antibacteriano de DM em bactéria *E. coli* aeróbica gram-negativa

20 Base para Teste de Suscetibilidade de difusão de disco antimicrobiano é feito de ágar Mueller Hinton II obtido da Becton, Dickinson and Company, França.

Ágar de Mueller-Hinton-II é preparado pela

suspensão de 38 g do pó em 1 L de água duplamente destilada. O ágar é colocado em autoclave a 121°C durante 15 minutos. O ágar foi colocado em cada placa de ágar e foi deixado solidificar. *E. coli* de 1×10^5 CFU em 100 µl de meio foi espalhada na placa de ágar e foi deixada crescer durante 96 horas.

Tabela 4: Resultado de difusão de disco DM em inibição de crescimento bacteriano aeróbico: cepa bacteriana *E. coli* a 37°C durante 96 horas.

Conc. de DM	Diâmetro da zona limpa
10% DM	18 mm
5% DM	13 mm
2,5% DM	9,5 mm
1,2% de DM	--

Exemplo 4: Efeito antibacteriano de DM em bactéria gram-positiva *Staphylococcus aureus*

A base para Teste de Suscetibilidade de difusão de disco antimicrobiano é ágar Mueller Hinton II obtido da Becton, Dickinson and Company, França.

Ágar de Mueller-Hinton-II é preparado pela suspensão de 38 g do pó em 1 L de água duplamente destilada. O ágar é colocado em autoclave a 121°C durante 15 minutos. O ágar foi colocado em cada placa de ágar e foi deixado solidificar. *S. aureus* de 10^5 CFU em 100 µl de meio foi espalhada na placa de ágar e foi deixada crescer durante 96 horas.

Tabela 5: Resultado de difusão de disco DM em inibição de crescimento bacteriano aeróbico: cepa bacteriana *S. aureus* a 37°C durante 96 horas.

Conc. de DM	Diâmetro da zona limpa
10% DM	14 mm
5% DM	10 mm
2,5% DM	--
1,2% de DM	--

Exemplo 5:**Métodos e Resultados**

As células de monócitos THP-1 foram cultivadas e diferenciadas em macrófagos. Os macrófagos foram pré-tratados com várias concentrações de Dextrometorfano ou naloxona durante 1 hora e subsequentemente incubados com lipopolissacarídeo (LPS) durante 24 horas. Pré-tratamento com dextrometorfano ou naloxona reduziu significativamente a concentração de fator- α de necrose tumoral (TNF- α), interleucina-6 (IL-6) e proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1) no meio de células THP-1 após estimulação com LPS.

Preparação de Material

Meio RPMI 1640, forbol 12-miristato-13-acetato (PMA), LPS (*Escherichia coli* 0111:B4) e naloxona foram adquiridos da Sigma. A linha de célula de monócitos THP-1 humana foi adquirida da Food Industry Research and Development Institute, Hsin Chu, Tailândia. Os níveis de fator- α de necrose tumoral (TNF- α), interleucina-6 (IL-6) e proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1) no meio foram determinados com kits ELISA baseados em anticorpo monoclonal adquiridos da R&D Systems (Minneapolis, MN, EUA), e todos os experimentos com animais foram aprovados pelo "Institutional Animal Care and Use Committee".

Cultura de Célula

As células THP-1 foram desenvolvidas em meio RPMI-1640 contendo 10% de soro fetal bovino a 37°C em 5% de CO₂. As células foram diferenciadas em macrófagos após tratamento com 100 nM de PMA para a cultura durante 24 horas. A suspensão de
5 célula (5x10⁵) foi adicionada em 0,5mL em cada poço das placas de cultura de tecido. LPS foi dissolvido em água estéril e armazenado a -70°C em alíquotas. No grupo de tratamento, a cultura de célula THP-1 foi pré-tratada durante 1 hora com várias concentrações de dextrometorfano ou naloxona e seguido por tratamento com 10 µg/mL
10 de LPS por até 24 horas. No grupo de controle, a cultura de célula foi tratada apenas com 10 µg/mL de LPS durante 24 horas. Os sobrenadantes foram colhidos. Os níveis de TNF-α, IL-6 e MCP-1 nos sobrenadantes foram determinados usando kits ELISA.

Efeito de DM em ativação de macrófago induzido 15 por LPS

A reação inflamatória pode ser inibida pelo dextrometorfano para menos que 0,01µM. A célula de THP-1 tratada com LPS a 1 unidade/ml na presença de dextrometorfano durante 24 horas e o TNF-α e IL-6 liberados no meio de cultura foram medidos
20 por ELISA (Figura 1). A Figura 1 mostra o efeito do tratamento com dextrometorfano na liberação de macrófago induzido por LPS de TNF-α (A) e IL-6 (B). A cultura de célula de THP-1 foi pré-tratada durante 1 hora com as concentrações indicadas de dextrometorfano antes da estimulação com 100 ng/mL de LPS. Os sobrenadantes foram
25 colhidos após 24 horas para a medição de TNF-α e IL-6. Os resultados são expressos como ± Média Padrão de 3 experimentos.

** p<0,01 e *** p<0,001 são comparados com

culturas tratadas com LPS.

Efeito de naloxona na ativação de macrófago induzido por LPS

O efeito do tratamento com naloxona na liberação
5 de macrófago induzido por LPS de TNF- α (A), IL-6 (B) e MCP-1 (C).

A cultura de célula de THP-1 foi pré-tratada durante 1 hora com as concentrações indicadas de naloxona antes da estimulação com 100 ng/mL de LPS. Os sobrenadantes foram colhidos após 24 horas para a medição de TNF- α , IL-6 e MCP-1. Os resultados
10 são expressos como $\pm$ Média Padrão de 3 experimentos. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ são comparados com culturas tratadas com LPS (Figura 2).

Os técnicos no assunto observarão prontamente que a presente invenção está bem adaptada para executar os objetivos e
15 alcançar as finalidades e vantagens mencionadas, assim como aquelas inerentes à mesma. As linhas de célula, animais, e processos e métodos para produzir as mesmas são representativos das configurações preferidas, são exemplificativos e não objetivam limitar o escopo da invenção. Modificações à mesma e outros usos
20 ocorrerão aos técnicos no assunto. Estas modificações estão abrangidas pelo espírito da invenção e são definidas pelo escopo das reivindicações.

Ficará prontamente aparente a um técnico no assunto que várias substituições e modificações podem ser
25 efetuadas à invenção revelada aqui sem se afastar do escopo e espírito da invenção.

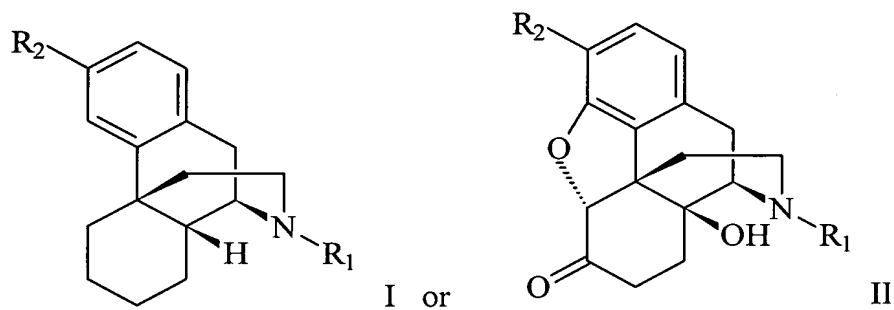
Todas as patentes e publicações mencionadas na especificação são indicativas dos níveis dos técnicos no assunto à

qual a invenção pertence. Todas as patentes e publicações são incorporadas aqui por referência na mesma extensão como se cada publicação individual tivesse sido específica e individualmente indicada para ser incorporada por referência.

5 A invenção ilustrativamente descrita aqui pode ser praticada adequadamente na ausência de qualquer elemento ou elementos, limitação ou limitações, que não sejam especificamente revelados aqui. Os termos e expressões que foram empregados são usados como termos de descrição e não de limitação, e não existe
10 intenção de que o uso destes termos e expressões exclua quaisquer equivalentes das características mostradas e descritas ou de porções das mesmas, mas é reconhecido que várias modificações são possíveis dentro do escopo da invenção reivindicada. Dessa
15 maneira, deve ser entendido que embora a presente invenção tenha sido especificamente revelada por configurações preferidas e características opcionais, modificação e variação dos conceitos aqui revelados podem ser utilizadas pelos técnicos no assunto, e estas modificações e variações são consideradas incluídas no escopo desta invenção conforme definido pelas reivindicações
20 anexas.

REIVINDICAÇÕES

1. Uso de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um composto da fórmula I ou da fórmula II, ou de um sal farmaceuticamente aceitável ou um análogo do mesmo,



5 caracterizado por ser na preparação de um medicamento para aplicação terapêutica em um paciente com infecção bacteriana, onde R_1 é alquila C_{1-6} , alquenila C_{2-6} , ciclo alquila C_{3-6} alquila- C_{1-6} , ou alquileno C_{2-6} , e R_2 é H, OH, alquila C_{1-6} , alcoxi C_{1-6} , alquenila C_{2-6} ou alquileno C_{2-6} .

10 2. Uso, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o composto da fórmula I é (+)-3-metoxi-17-metil-9 α , 13 α , 14 α -morfinano (dextrometorfano).

15 3. Uso, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o sal é bromidrato de dextrometorfano ou fosfato de dextrometorfano.

4. Uso, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o composto da fórmula II é 17-alil-4, 5 α -epóxi-3, 14-diidroximorfinan-6-ona (naloxona) ou 17-(ciclopropilmetil)-4, 5 α -epóxi-3, 14-diidroximorfinan-6-ona (naltrexona).

20 5. Uso, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a bactéria é *Propionibacterium acnes* ou *Bacteroides fragilis*.

6. Uso, de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que a *Propionibacterium acnes* causa acne.

7. Uso, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o composto é aplicado à superfície da pele ou mucosa
5 do paciente.

8. Uso, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o paciente é um ser humano.

9. Uso, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a quantidade eficaz do composto varia de 10000 ppm
10 a 1 ppm.

10. Uso, de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de que a quantidade eficaz do composto varia de 5000 ppm a 1 ppm.

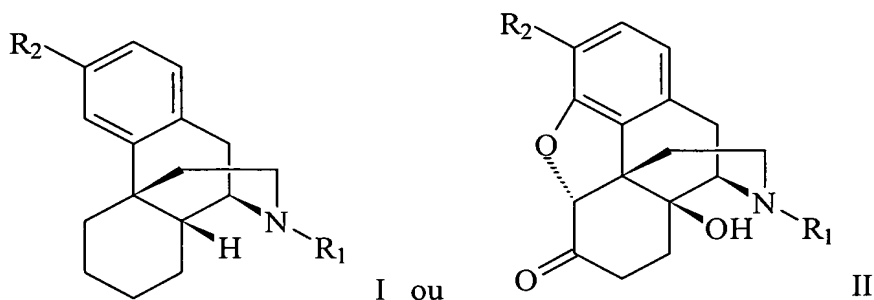
11. Uso, de acordo com a reivindicação 1,
15 caracterizado pelo fato de que pode ser usado para cura de feridas.

12. Uso, de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que a cura das feridas é direcionada às feridas selecionadas do grupo consistindo de incisões, lacerações, abrasões, feridas por perfuração, bolhas, rasgamentos da pele, locais
20 de doador ou enxerto, feridas por corte, feridas por queimadura ou feridas por radiação

13. Uso de uma quantidade terapeuticamente eficaz de inibidor de NADPH oxidase, caracterizado por ser para a preparação de um medicamento para tratamento de doença inflamatória causada pela
25 supressão de secreção de fator- α de necrose tumoral (TNF- α), e interleucina-6 (IL-6) ou proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1) de macrófago de um paciente.

14. Uso, de acordo com a reivindicação 13,

caracterizado pelo fato de que o inibidor de NADPH oxidase é um composto da fórmula I ou fórmula II, ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo ou um análogo do mesmo



onde R_1 é alquila C_{1-6} , alquenila C_{2-6} , ciclo alquila C_{3-6} , alquila- C_{1-6} , ou alquilenos C_{2-6} , e R_2 é H, OH, alquila C_{1-6} , alcoxi C_{1-6} , alquenila C_{2-6} ou alquilenos C_{2-6} .

15. Uso, de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelo fato de que o composto da fórmula I é (+)-3-metoxi-17-metil-9 α , 13 α , 14 α -morfinano (dextrometorfano).

10 16. Uso, de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelo fato de que o sal é bromidrato de dextrometorfano ou fosfato de dextrometorfano.

15 17. Uso, de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelo fato de que o composto da fórmula II é 17-alil-4, 5 α -epóxi-3, 14-diidroximorfinan-6-ona (naloxona) ou 17-(ciclopropilmetil)-4, 5 α -epóxi-3, 14-diidroximorfinan-6-ona (naltrexona).

18. Uso, de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato de que a doença é acne.

20 19. Uso, de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato de que o inibidor é aplicado à superfície da pele ou mucosa do paciente.

20. Uso, de acordo com a reivindicação 13,

caracterizado pelo fato de que o paciente é um ser humano.

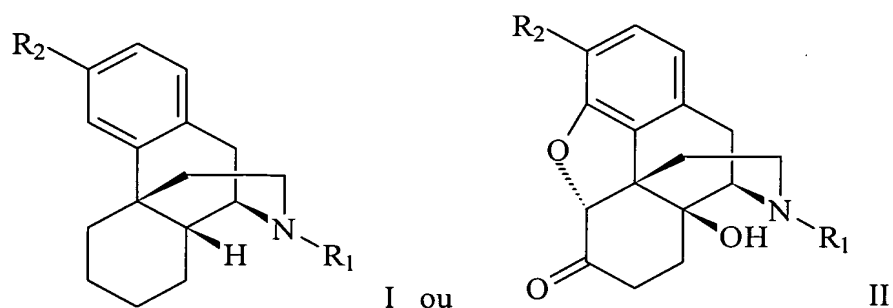
21. Uso, de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato de que a quantidade eficaz do composto varia de 10000 ppm a 1 ppm.

5 22. Método, de acordo com a reivindicação 21, caracterizado pelo fato de que a quantidade eficaz do composto varia de 5000 ppm a 1 ppm.

23. Método, de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato de que pode ser usado para cura de feridas.

10 24. Método, de acordo com a reivindicação 23, caracterizado pelo fato de que a cura das feridas é direcionada às feridas selecionadas do grupo consistindo de incisões, lacerações, abrasões, feridas por perfuração, bolhas, rasgamento da pele, locais de doador ou enxerto, feridas por corte, feridas por queimadura ou
15 feridas por radiação.

25. Composição, caracterizada pelo fato de que compreende um inibidor de NADPH oxidase e um composto da fórmula I ou fórmula II, ou um sal farmaceuticamente aceitável ou um análogo do mesmo



20 onde R_1 é alquila C_{1-6} , alquenila C_{2-6} , ciclo alquila C_{3-6} alquila- C_{1-6} , ou alquileno C_{2-6} , e R_2 é H, OH, alquila C_{1-6} , alcoxi C_{1-6} , alquenila C_{2-6} ou alquileno C_{2-6} , e veículo farmaceuticamente aceitável.

26. Composição, de acordo com a reivindicação 25, caracterizada pelo fato de que o composto da fórmula I é (+)-3-metoxi-17-metil-9 α , 13 α , 14 α -morfinano (dextrometorfano).

27. Composição, de acordo com a reivindicação 25, caracterizada pelo fato de que o sal é bromidrato de dextrometorfano ou fosfato de dextrometorfano.

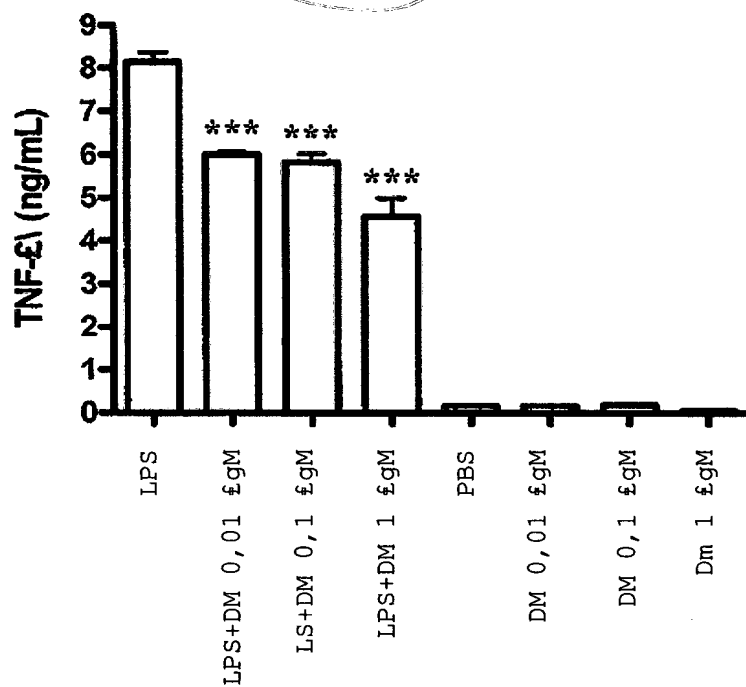
28. Composição, de acordo com a reivindicação 25, caracterizada pelo fato de que o composto da fórmula II é 17-alil-4, 5 α -epóxi-3, 14-diidroxiomorfinan-6-ona (naloxona) ou 17-(ciclopropilmetil)-4, 5 α -epóxi-3, 14-diidroxiomorfinan-6-ona (naltrexona).

29. Composição, de acordo com a reivindicação 25, caracterizada pelo fato de que o inibidor de NADPH oxidase é dextrometorfano, naloxona ou naltrexona.

30. Composição, de acordo com a reivindicação 25, caracterizada pelo fato de que está na forma de creme, ungüento, loção, óleo mineral, cosmético, xampu, creme antipruriginoso, adesivo para a pele, ou outras formas para dispersão na epiderme ou administração transdérmica.

Fig. 1

A



B

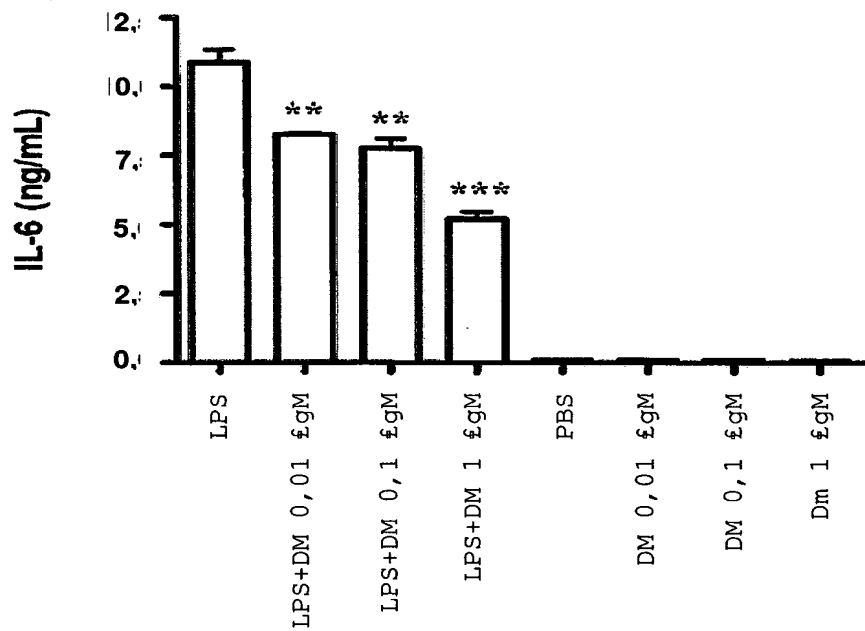
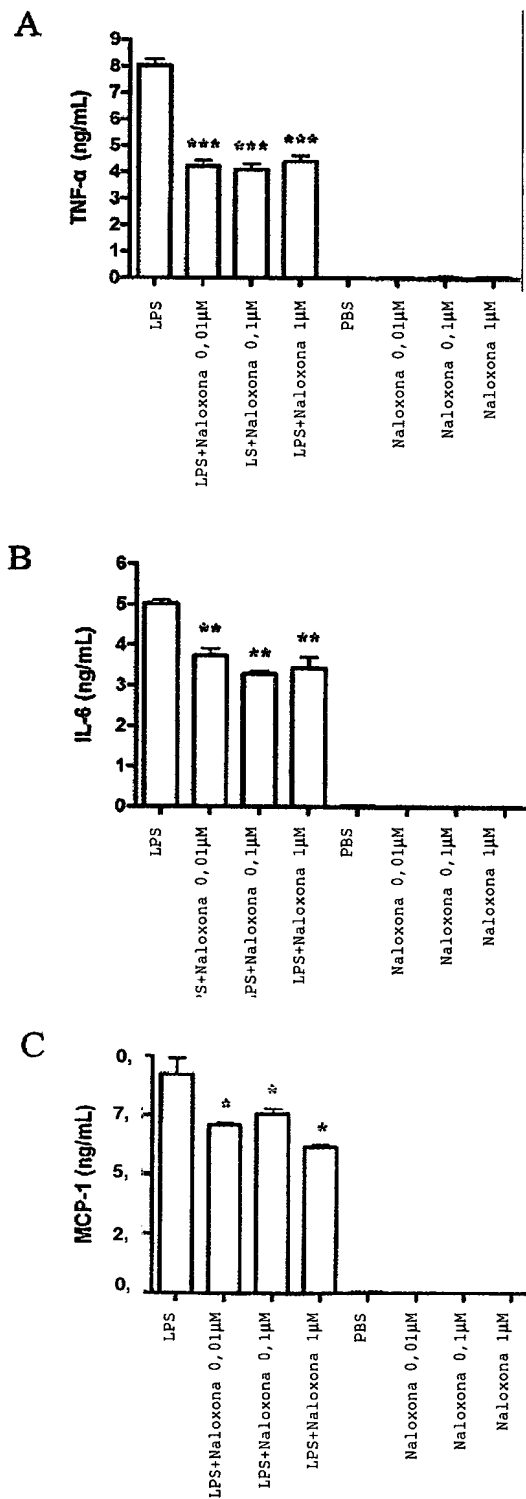


Fig. 2



RESUMO

"MÉTODOS E COMPOSIÇÕES BACTERICIDAS, BACTERIOSTÁTICOS E ANTIINFLAMATÓRIOS"

A presente invenção se refere a um método para
 5 prover agente bactericida ou bacteriostático, especialmente para
 tratar doença devido à infecção bacteriana. O método compreende a
 administração a um paciente, em necessidade deste tratamento, de
 uma quantidade terapêuticamente eficaz de um composto de
 dextrometorfano ou naloxona ou um sal farmaceuticamente aceitável
 10 ou um análogo do mesmo. O composto é aplicado à superfície da pele
 ou mucosa do paciente. A invenção também se refere a um método de
 tratamento de inflamação causada por supressão de secreção de TNF-
 α , IL- β , ou MCP-I de macrófago compreendendo a administração a um
 paciente, em necessidade deste tratamento, de uma quantidade
 15 terapêuticamente eficaz de inibidor de NADPH oxidase.