



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 112021001731-3 A2



(22) Data do Depósito: 31/07/2019

(43) Data da Publicação Nacional: 27/04/2021

(54) Título: COMPOSIÇÕES DE BISMUTO-TIOL E MÉTODOS DE USO

(51) Int. Cl.: A01N 37/18; A01N 43/16; A01N 43/78.

(30) Prioridade Unionista: 04/02/2019 US 62/800,925; 31/07/2018 US 62/712,563.

(71) Depositante(es): MICROBION CORPORATION.

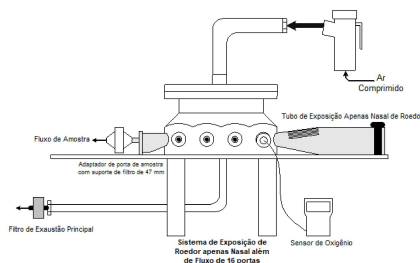
(72) Inventor(es): BRETT HUGH JAMES BAKER; JEFFREY W. MILLARD.

(86) Pedido PCT: PCT US2019044489 de 31/07/2019

(87) Publicação PCT: WO 2020/028558 de 06/02/2020

(85) Data da Fase Nacional: 29/01/2021

(57) Resumo: COMPOSIÇÃO DE BISMUTO-TIOL E MÉTODOS DE USO. A presente invenção refere-se a compostos de bistirol e a preparações farmacêuticas dos mesmos. A invenção também se refere a métodos para tratar, gerir ou atenuar a gravidade de infecções pulmonares em um indivíduo, sendo que o método compreende administrar ao indivíduo uma composição de bismuto-tiol (BT) que compreende pelo menos um composto de BT.



Relatório Descritivo de Patente de Invenção para "**COMPOSIÇÕES DE BISMUTO-TIOL E MÉTODOS DE USO**".

REFERÊNCIA CRUZADA A PEDIDOS RELACIONADOS

[0001] Este pedido reivindica o benefício do Pedido Provisório nº U.S. 62/712.563, depositado em 31 de julho de 2018, e do Pedido Provisório nº U.S. 62/800.925, depositado em 4 de fevereiro de 2019, cujo conteúdo é incorporado ao presente documento a título de referência, em suas totalidades.

ANTECEDENTES

[0002] A fibrose cística (CF) se manifesta como uma síndrome clínica caracterizada por infecção pulmonar crônica assim como por anormalidades gastrointestinais, nutricionais e outras anormalidades. A base genética para CF é um distúrbio recessivo monogênico severo bem caracterizado que surge de mutações no gene regulador de condutância transmembranar de fibrose cística (CFTR). Os pacientes têm frequentemente infecções pulmonares crônicas, como com *Pseudomonas aeruginosa*. Finalmente, 80 a 95% de pacientes com CF sucumbem à insuficiência respiratória causada por infecção bacteriana crônica e inflamação de via respiratória concomitante.

[0003] Os pulmões de pacientes com CF são frequentemente colonizados ou infectados na primeira infância e infância com organismos, como *Staphylococcus aureus* e *Haemophilus influenzae*, que podem danificar as superfícies epiteliais, que levam à fixação aumentada de *P. aeruginosa* e substituição eventual pela mesma. Demonstrou-se que a infecção crônica com *P. aeruginosa* é a perpetradora principal de declínio de função pulmonar e mortalidade em pacientes com CF. A infecção crônica com *P. aeruginosa* leva ao dano de superfície epitelial e obstrução de via respiratória, impedindo progressivamente a condutância de via respiratória, o que resulta em um declínio em função pulmonar. *P. aeruginosa* também desenvolve resistência a muitos an-

tibióticos comuns, o que torna difícil a erradicação da infecção. Um fator no desenvolvimento de resistência é a tendência de *P. aeruginosa* e outros patógenos pulmonares associados à CF em formar biofilmes que dificultam a penetração de antibióticos. Além disto, o uso prevalente de antibióticos no tratamento de infecções em geral levou a cepas multirresistentes (MDR) de bactérias, como *P. aeruginosa*, e *Staphylococcus aureus*.

[0004] A terapia de antibiótico inalada a longo prazo é, agora, o padrão de cuidados para tratamento de manutenção crônica em pacientes estáveis. As concentrações de antibiótico eficazes podem ser alcançadas nas vias respiratórias por nebulização, evitando efeitos colaterais de antibióticos intravenosos. Colistimetato sódico, amicacina, aztreonam e tobramicina foram administrados aos pacientes por inalação. Entretanto, há uma necessidade não satisfeita pelo tratamento de infecções microbianas pulmonares (por exemplo, bacterianas ou fúngicas) em pacientes com CF que são de um amplo espectro, duráveis e potentes contra até mesmo a mais resistente das espécies microbianas (por exemplo, bacterianas ou fúngicas).

SUMÁRIO

[0005] A presente invenção refere-se a métodos para tratar, gerir ou atenuar a gravidade de sintomas de fibrose cística (CF) e infecções em um indivíduo, em que o método compreende administrar ao indivíduo uma composição de bismuto-tiol (BT) que compreende pelo menos um composto de BT.

[0006] Em certas modalidades, a presente invenção fornece uma composição farmacêutica adequada para uso em um indivíduo para tratar, gerir ou atenuar a gravidade de sintomas de fibrose cística (CF) e infecções que compreendem uma quantidade eficaz de qualquer um dos compostos descritos no presente documento (por exemplo, um composto da invenção, como um composto de bismuto-tiol, ou um sal

farmaceuticamente aceitável do mesmo) e um ou mais excipientes farmaceuticamente aceitáveis.

[0007] Em certas modalidades, a presente invenção fornece um aerossol que compreende uma pluralidade de gotículas líquidas dispersas em um gás, em que as referidas gotículas líquidas compreendem uma composição de BT que compreende pelo menos um composto de BT suspenso na mesma, em que o composto de BT compreende bismuto e/ou um sal de bismuto e um composto que contém tiol; e em que pelo menos 60%, 65%, 70, 75%, 80%, 90% ou 95% das gotículas líquidas têm um diâmetro aerodinâmico mediano de massa (MMAD) de aproximadamente 0,4 μm a aproximadamente 5 μm .

[0008] Em certas modalidades, a presente invenção fornece um método para tratar, gerir ou atenuar a gravidade dos sintomas de fibrose cística (CF) e infecções em um indivíduo, em que o método compreende administrar ao indivíduo uma composição de bismuto-tiol (BT) que compreende pelo menos um composto de BT, em que a composição é uma suspensão de micropartículas que têm um diâmetro volumétrico médio (VMD) de aproximadamente 0,4 μm a aproximadamente 5 μm e/ou um diâmetro aerodinâmico mediano de massa (MMAD) de aproximadamente 0,4 μm a aproximadamente 5 μm .

[0009] Em certas modalidades, a presente invenção fornece um método para tratar, gerir ou atenuar a gravidade dos sintomas e infecções associados a uma ou mais doenças pulmonares ou infecções em um indivíduo, em que o método compreende administrar ao indivíduo de uma composição de bismuto-tiol (BT) que compreende pelo menos um composto de BT.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[0010] A Figura 1 mostra um esquema de exposição de inalação representativo.

[0011] A Figura 2 mostra uma distribuição de tamanho de partícu-

las de aerossol de uma solução 2,5 mg/ml de BisEDT.

[0012] A Figura 3 mostra uma distribuição de tamanho de partículas de aerossol de uma solução 25 mg/ml de BisEDT.

[0013] A Figura 4 mostra uma distribuição de tamanho de partículas de aerossol de uma solução 50 mg/ml de BisEDT.

[0014] A Figura 5 mostra uma distribuição de tamanho de partículas de aerossol de uma solução 75 mg/ml de BisEDT.

[0015] A Figura 6 mostra uma distribuição de tamanho de partículas de aerossol de uma solução 100 mg/ml de BisEDT.

[0016] A Figura 7 mostra uma distribuição de tamanho de partículas de aerossol de um BisEDT 100 mg/ml em solução de tampão fosfato de mOsmolalidade 300.

[0017] A Figura 8 mostra uma distribuição de tamanho de partículas de aerossol de um BisEDT 50 mg/ml em solução de tampão fosfato de mOsmolalidade 300.

[0018] A Figura 9 mostra uma distribuição de tamanho de partículas de aerossol de um BisEDT 10 mg/ml em solução de tampão fosfato de mOsmolalidade 300.

[0019] A Figura 10 mostra uma distribuição de tamanho de partículas de aerossol de um BisEDT 2,5 mg/ml em solução de tampão fosfato de mOsmolalidade 300.

[0020] A Figura 11 mostra que a distribuição de fármaco inalado de um antibiótico aumenta a exposição pulmonar (B) enquanto reduz a exposição sistêmica (A) dos efeitos colaterais correspondentes.

[0021] A Figura 12 mostra os resultados de teste de MIC de BisEDT contra uma variedade de isolados de CF clinicamente relevantes.

[0022] A Figura 13 é um diagrama que mostra a avaliação de citotoxicidade através tanto da liberação de LDH (do lado de meio de cultura) quanto a resistência elétrica transepitelial (TEER) do lado api-

cal/exposto ao ar.

[0023] A Figura 14 mostra a atividade de compostos de BT contra biofilmes cultivados de MR14, que é um isolado de CF multirresistente de *Pseudomonas aeruginosa*.

[0024] A Figura 15 mostra a atividade de compostos de BT contra biofilmes cultivados de AG14, que é um isolado de CF resistente a aminoglicosídeo de *Pseudomonas aeruginosa*.

[0025] A Figura 16 mostra a atividade de compostos de BT contra biofilmes cultivados a partir de AU197, que é um isolado de CF de *Burkholderia. cenocepacia*.

[0026] A Figura 17 mostra a atividade de compostos de BT contra biofilmes cultivados de AMT0130-8, que representam um isolado de CF do complexo clinicamente relevante *Mycobacterium abscessus* clinicamente relevante (MABSC), que complica frequentemente o tratamento de infecções pulmonares de CF.

[0027] A Figura 18 mostra a atividade de compostos de BT contra biofilmes cultivados de AMT0089-5, que é um MABSC resistente à amicacina e resistente a macrolídeo.

[0028] A Figura 19 mostra a atividade de compostos de BT contra biofilmes cultivados de ATCC-19977, que é *M. abscessus* (resistente a macrolídeo; induzível).

[0029] A Figura 20 mostra a atividade de compostos de BT contra biofilmes cultivados a partir de isolado de CF de MABSC.

[0030] A Figura 21 mostra a atividade de compostos de BT contra biofilmes cultivados de *Achromobacter* spp.

[0031] A Figura 22 mostra a atividade de compostos de BT contra biofilmes cultivados a partir de *Stenotrophomonas maltophilia*.

[0032] A Figura 23 mostra a atividade de compostos de BT contra biofilmes cultivados de *E. coli*.

[0033] A Figura 24 mostra uma vista geral de MucilAir™ que é um

modelo completamente diferenciado do epitélio de via respiratória humana.

[0034] A Figura 25 mostra a porcentagem de citotoxicidade (medição de LDH) de BisEDT em solução em 1, 8, 24 e 48 horas de exposição. As barras que representam 1, 8, 24 e 48 horas são mostradas da esquerda para a direita para cada concentração.

[0035] A Figura 26 mostra o efeito na integridade de tecido de BisEDT em solução em 1, 8, 24 e 48 horas de exposição. As barras que representam 1, 8, 24 e 48 horas são mostradas da esquerda para a direita para cada concentração.

[0036] A Figura 27 mostra a porcentagem de citotoxicidade (medição de LDH) de BisEDT sólido em 1, 8, 24 e 48 horas de exposição. As barras que representam 1, 8, 24 e 48 horas são mostradas da esquerda para a direita para cada concentração.

[0037] A Figura 28 mostra o efeito na integridade de tecido de BisEDT sólido em 1, 8, 24 e 48 horas de exposição. As barras que representam 1, 8, 24 e 48 horas são mostradas da esquerda para a direita para cada concentração.

[0038] A Figura 29 mostra a porcentagem de citotoxicidade (medição de LDH) de BisEDT sólido em 1, 8, 24 e 48 horas de exposição. As barras que representam 1, 8, 24 e 48 horas são mostradas da esquerda para a direita para cada concentração.

[0039] A Figura 30 mostra o efeito na integridade de tecido de BisEDT sólido em 1, 8, 24 e 48 horas de exposição. As barras que representam 1, 8, 24 e 48 horas são mostradas da esquerda para a direita para cada concentração.

[0040] A Figura 31 mostra o efeito de esputo na atividade de extermínio bacteriano de tobramicina.

[0041] A Figura 32 mostra que a atividade bacteriana de BisEDT parece ser parcialmente inibida por esputo de paciente com CF.

[0042] A Figura 33 mostra que a atividade bacteriana de BisBDT parece ser parcialmente inibida por esputo de paciente com CF.

[0043] A Figura 34 mostra um gráfico de concentração de BisEDT de tecido pulmonar vs. tempo após uma dose única depositada no pulmão de 100 µg/kg em ratos.

[0044] A Figura 35 mostra a concentração de BisEDT de sangue total vs. tempo (100 µg/kg IV ou 100 µg/kg por inalação ou 250 µg/kg por dose oral).

[0045] A Figura 36 mostra BisEDT sanguíneo de rato vs tempo após a dose de inalação única (µg/kg depositado no pulmão).

[0046] A Figura 37 mostra concentração de BisEDT de pulmão de rato (ng/g) em sacrifício (24 ou 30 horas após a dose inalada única).

[0047] A Figura 38 mostra a Distribuição de Tamanho de Partícula para o veículo.

[0048] A Figura 39 mostra a Distribuição de Tamanho de Partícula para Tobramicina.

[0049] A Figura 40 mostra Distribuição de Tamanho de Partícula para BisEDT.

[0050] A Figura 41 mostra um diagrama esquemático exemplificativo do sistema de exposição de cão.

[0051] A Figura 42 mostra figuras de eficácia em rato que mostram a dose administrada cumulativa (total) (depositada no pulmão) nos dias 3 e 5.

[0052] Figura 43 mostra uma tabela de ensaios representativa em que cada composto é testado individualmente (Coluna 12 e Linha H) e em combinação em razões variáveis de concentração de fármaco.

DESCRIÇÃO DETALHADA

DEFINIÇÕES

[0053] A menos que definido de outro modo, todos os termos técnicos e científicos usados no presente documento têm o significado

comumente entendido por uma pessoa versada na técnica da presente invenção. As referências a seguir dotam um indivíduo versado na técnica de uma definição geral de muitos dos termos usados nesta invenção: Singleton *et al.*, Dictionary of Microbiology and Molecular Biology (2ª edição 1994); The Cambridge Dictionary of Science and Technology (Walker ed., 1988); The Glossary of Genetics, 5ª edição, R. Rieger *et al.* (eds.), Springer Verlag (1991); e Hale & Marham, The Harper Collins Dictionary of Biology (1991). Conforme usado no presente documento, os seguintes termos têm os significados atribuídos aos mesmos abaixo, a menos que especificado de outro modo.

[0054] Conforme usado no presente documento, o verbo "compreende" é conforme usado nesta descrição e nas reivindicações e suas conjugações são usadas em seu sentido não limitante para significar que os itens que seguem a palavra são incluídos, mas os itens não especificamente mencionados não são excluídos. A presente invenção pode adequadamente "compreender", "consistir em", ou "consistir essencialmente em", as etapas, elementos, e/ou reagentes descritos nas reivindicações.

[0055] A menos que especificamente declarado ou óbvio do contexto, conforme usado no presente documento, o termo "ou" é entendido como inclusivo. A menos que especificamente declarado ou óbvio a partir do contexto, conforme usado no presente documento, os termos "um", "uma", "o" e "a" são entendidos como no singular ou plural.

[0056] Ao longo do presente relatório específico, os termos "cerca de" e/ou "aproximadamente" podem ser usados em combinação com valores e/ou faixas numéricas. O termo "cerca de" é entendido como valores próximos de um valor declarado. Adicionalmente, as expressões "menos do que cerca de [um valor]" ou "maior do que cerca de [um valor]" devem ser entendidos em vista da definição do termo "cerca de" fornecido no presente documento. Os termos "cerca de" e

"aproximadamente" podem ser usados intercambiavelmente.

[0057] Um grupo "alquila" ou "alcano" é um hidrocarboneto não aromático ramificado ou de cadeia linear que é completamente saturado. Tipicamente, um grupo alquila ramificado ou de cadeia linear tem de 1 a aproximadamente 20 átomos de carbono, por exemplo, de 1 a aproximadamente 10, a menos que definido de outro modo. Exemplos de grupos alquila de cadeia ramificada ou cadeia linear incluem metila, etila, n-propila, iso-propila, n-butila, sec-butila, terc-butila, pentila, hexila, pentila e octila. Um grupo alquila de cadeia linear ou ramificada C1-C6 também é denominado um grupo "alquila inferior".

[0058] Além disto, o termo "alquila" (ou "alquila inferior") conforme usado ao longo do relatório descritivo, exemplos e reivindicações é destinado a incluir tanto "alquilas não substituídas" quanto "alquilas substituídas", em que o último se refere a porções químicas de alquila que têm substituintes que substituem um hidrogênio em um ou mais carbonos da cadeia principal de hidrocarboneto. Tais substituintes, se não especificados de outro modo, podem incluir, por exemplo, um halogênio, uma hidroxila, uma carbonila (como uma carboxila, uma alcoxycarbonila, uma formila, ou uma acila), uma tiocarbonila (como um tioéster, um tioacetato, ou um tioformato), um alcóxi, uma fosforila, um fosfato, um fosfonato, um fosfinato, um amino, um amido, uma amidina, uma imina, um ciano, um nitro, um azido, uma sulfidril, um alquil-tio, um sulfato, um sulfonato, uma sulfamoila, um sulfonamido, uma sulfonila, uma heterociclila, uma aralquila, ou uma porção química aromática ou heteroaromática. Será entendido por aqueles versados na técnica que as porções químicas substituídas na cadeia de hidrocarboneto podem ser substituídas por si próprias, se apropriado. Por exemplo, os substituintes de uma alquila substituída podem incluir formas substituídas e não substituídas de grupos amino, azido, imino, amido, fosforila (incluindo fosfonato e fosfinato), sulfonila (incluindo

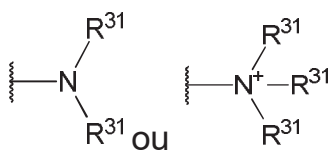
sulfato, sulfonamido, sulfamoila e sulfonato), e silila, assim como éteres, alquiltios, carbonilas (incluindo cetonas, aldeídos, carboxilatos e ésteres), -CF₃, -CN e semelhantes. Alquilas substituídas exemplificativas são descritas abaixo. As cicloalquilas podem ser adicionalmente substituídas com alquilas, alquenilas, alcóxis, alquiltios, aminoalquilas, alquilas substituídas por carbonila, -CF₃, -CN e semelhantes.

[0059] O termo "C_{x-y}" quando usado em combinação com uma porção química, como acila, acilóxi, alquila, alquenila, alquinila ou alcóxi é destinado a incluir grupos que contêm de x a y carbonos na cadeia. Por exemplo, o termo "C_{x-y}-alquila" se refere a grupos de hidrocarboneto saturados substituídos ou não substituídos, incluindo grupos alquila de cadeia linear e alquila de cadeia ramificada que contêm de x a y carbonos na cadeia, incluindo grupos de haloalquila, como trifluorometila e 2,2,2-trifluoroetila, etc. C0 alquila indica um hidrogênio em que o grupo está em uma posição terminal, uma ligação se interno. Os termos "C2-yalquenila" e "C2-yalquinila" se referem a grupos alifáticos insaturados não substituídos ou substituídos análogos em comprimento e substituição possível às alquilas descritas acima, mas que contêm pelo menos uma ligação dupla ou tripla, respectivamente.

[0060] O termo "alquilamino", conforme usado no presente documento, se refere a um grupo amino substituído por pelo menos um grupo alquila.

[0061] O termo "alquiltio", conforme usado no presente documento, se refere a um grupo tiol substituído por um grupo alquila e pode ser representado pela fórmula geral alquilS-.

[0062] Os termos "amina" e "amino" são reconhecidos pela técnica e se referem tanto a aminas quanto sais não substituídos ou substituídos dos mesmos, por exemplo, uma porção química que pode ser representada por



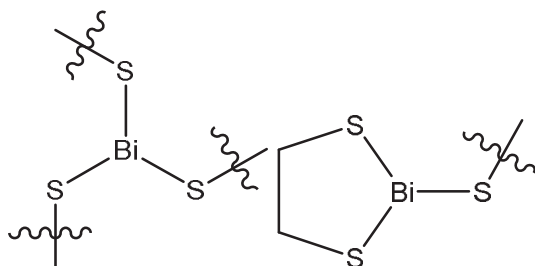
em que cada R³¹ representa independentemente um hidrogênio ou um grupo hidrocarbonila, ou dois R³¹ são tomados juntos com o átomo N ao qual são ligados para completar um heterociclo que tem de 4 a 8 átomos na estrutura de anel. O termo "aminoalquila", conforme usado no presente documento, se refere a um grupo alquila substituído por um grupo amino.

[0063] O termo "arila" conforme usado no presente documento, inclui grupos aromáticos de anel único substituído ou não substituído em que cada átomo do anel é carbono. Em algumas modalidades, o anel é um anel de 5 a 7 membros, por exemplo, um anel de 6 membros. O termo "arila" também inclui sistemas de anel policíclicos que têm dois ou mais anéis cíclicos nos quais dois ou mais carbonos são comuns para dois anéis contíguos, em que pelo menos um dos anéis é aromático, por exemplo, os outros anéis cíclicos podem ser cicloalquilas, cicloalquenilas, cicloalquinilas, arilas, heteroarilas e/ou heterociclicas. Os grupos arila incluem benzeno, naftaleno, fenantreno, fenol, anilina e semelhantes.

[0064] O termo "bismuto" se refere ao 83º elemento da tabela periódica, ou átomos ou íons do mesmo. Bismuto pode ocorrer no estado metálico ou no estado ionizado, como no estado de oxidação III ou V. Os íons de bismuto podem formar complexos com ânions, para produzir sais de bismuto, ou para formar ânions complexos que são, então, complexados adicionalmente com um ou mais cátions adicionais. O bismuto também pode formar ligações covalentes a outros átomos, como enxofre.

[0065] Conforme descrito no presente documento, um "composto de bismuto-tiol" ou "composto de BT" é um composto que tem um átomo de bismuto ligado covalentemente a um, dois ou três outros

átomos de enxofre presentes em um ou mais compostos de tiol. O termo "tiol" se refere a um composto que contém carbono, ou fragmento do mesmo, que contém um grupo -SH e pode ser representado pela fórmula geral R-SH . Esses compostos de tiol incluem compostos com um, dois, três ou mais átomos S. Os compostos de tiol podem ter outra funcionalidade, como alquila, hidroxila, carbociclila, heterociclila, arila, heteroarila, amino, e outros substituintes. Os compostos de tiol que têm dois ou mais átomos S podem quelar o átomo de bismuto, de modo que dois átomos S da mesma molécula se liguem covalentemente com o átomo de bismuto. Os compostos de bismuto-tiol são mostrados abaixo:



[0066] Os termos "carbociclo", e "carbocíclico", conforme usado no presente documento, se refere a um anel saturado ou insaturado em que cada átomo do anel seja carbono. O termo carbociclo inclui tanto os carbociclos aromáticos quanto os carbociclos não aromáticos. Os carbociclos não aromáticos incluem ambos os anéis de cicloalcano, em que todos os átomos de carbono são saturados, e anéis de cicloalqueno, que contêm pelo menos uma ligação dupla.

[0067] O termo "carbociclo" anéis bicíclicos de 8 a 12 membros e monocíclicos de 5 a 7 membros. Cada anel de um carbociclo bicíclico pode ser selecionado dentre anéis saturados, insaturados e aromáticos. Carbociclo inclui moléculas bicíclicas em que um, dois ou três ou mais átomos são compartilhados entre os dois anéis. O termo "carbociclo fundido" se refere a um carbociclo bicíclico no qual cada um dos anéis compartilha dois átomos adjacentes com o outro anel. Cada anel de um carbociclo fundido pode ser selecionado dentre anéis satura-

dos, insaturados e aromáticos. Em uma modalidade exemplificativa, um anel aromático, por exemplo, fenila, pode ser fundido a um anel saturado ou insaturado, por exemplo, ciclo-hexano, ciclopentano, ou ciclo-hexeno. Qualquer combinação de anéis bicíclicos saturados, insaturados e aromáticos, conforme a valência permite, é incluído na definição de carbocíclico. Os "carbociclos" exemplificativos incluem ciclopentano, ciclo-hexano, biciclo[2.2.1]heptano, 1,5-ciclo-octadieno, 1,2,3,4-tetra-hidronaftaleno, biciclo[4.2.0]oct-3-eno, naftaleno e adamantano. Os carbociclos fundidos exemplificativos incluem decalina, naftaleno, 1,2,3,4-tetra-hidronaftaleno, biciclo[4.2.0]octano, 4,5,6,7-tetra-hidro-1H-indeno e biciclo[4.1.0]hept-3-eno. "Carbociclos" podem ser substituídos em quaisquer uma ou mais posições com capacidade para portar um átomo de hidrogênio.

[0068] Um grupo "cicloalquila" é um hidrocarboneto cíclico que é completamente saturado. "Cicloalquila" inclui anéis monocíclicos e bicíclicos. Tipicamente, um grupo cicloalquila monocíclico tem de 3 a aproximadamente 10 átomos de carbono, mais tipicamente 3 a 8 átomos de carbono, a menos que definido de outro modo. O segundo anel de uma cicloalquila bicíclica pode ser selecionado dentre anéis saturados, insaturados e aromáticos. Cicloalquila inclui moléculas bicíclicas em que um, dois ou três ou mais átomos são compartilhados entre os dois anéis. O termo "cicloalquila fundida" se refere a uma cicloalquila bicíclica na qual cada um dos anéis compartilha dois átomos adjacentes com o outro anel. O segundo anel de uma cicloalquila bicíclica fundida pode ser selecionada dentre anéis saturadas, insaturadas e aromáticas. Um grupo "cicloalquenila" é um hidrocarboneto cíclico que contém uma ou mais ligações duplas.

[0069] Os termos "halo" e "halogênio", conforme usado no presente documento, significam halogênio e incluem cloro, fluoro, bromo e iodo.

[0070] Os termos "hetaralquila" e "heteroaralquila", conforme usado no presente documento, se referem a um grupo alquila substituído por um grupo hetarila.

[0071] O termo "heteroalquila", conforme usado no presente documento, se refere a uma cadeia saturada ou insaturada de átomos de carbono e pelo menos um heteroátomo, em que nenhum heteroátomo é adjacente.

[0072] Os termos "heteroarila" e "hetarila" incluem estruturas de anel único aromático substituído ou não substituído, por exemplo, anéis de 5 a 7 membros, por exemplo, anéis de 5 a 6 membros, cujas estruturas de anel incluem pelo menos um heteroátomo, por exemplo, um a quatro heteroátomos, por exemplo, um ou dois heteroátomos. Os termos "heteroarila" e "hetarila" também incluem sistemas de anel policíclicos que têm dois ou mais anéis cíclicos nos quais dois ou mais carbonos são comuns para dois anéis contíguos, em que pelo menos um dos anéis é heteroaromático, por exemplo, os outros anéis cíclicos podem ser cicloalquilas, cicloalquenilas, cicloalquinilas, arilas, heteroarilas e/ou heterociclilas. Os grupos heteroarila incluem, por exemplo, pirrol, furano, tiofeno, imidazol, oxazol, tiazol, pirazol, piridina, pirazina, piridazina e pirimidina, e semelhantes.

[0073] O termo "heteroátomo", conforme usado no presente documento, significa um átomo de qualquer elemento diferente de carbono ou hidrogênio. Os heteroátomos preferenciais são nitrogênio, oxigênio e enxofre.

[0074] Os termos "heterociclila", "heterociclo", e "heterocíclico" se referem a estruturas de anel não aromático substituído ou não substituído, por exemplo, anéis de 3 a 10 membros, por exemplo, anéis de 3 a 7 membros, cujas estruturas de anel incluem pelo menos um heteroátomo, por exemplo, um a quatro heteroátomos, por exemplo, um ou dois heteroátomos. Os termos "heterociclila" e "heterocíclico" também

incluem sistemas de anel policíclicos que têm dois ou mais anéis cíclicos nos quais dois ou mais carbonos são comuns para dois anéis contíguos, em que pelo menos um dos anéis é heterocíclico, por exemplo, os outros anéis cíclicos podem ser cicloalquilas, cicloalquenilas, cicloalquinilas, arilas, heteroarilas e/ou heterociclilas. Grupos heterociclila incluem, por exemplo, piperidina, piperazina, pirrolidina, morfolina, lactonas, lactamas e semelhantes.

[0075] O termo "heterociclilalquila", conforme usado no presente documento, se refere a um grupo alquila substituído por um grupo heterociclo.

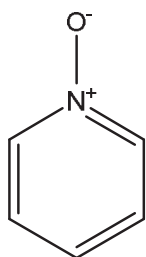
[0076] O termo "hidrocarbila", conforme usado no presente documento, se refere a um grupo que é ligado através de um átomo de carbono que não tem um substituinte =O ou =S, e tem tipicamente pelo menos uma ligação de carbono-hidrogênio e uma cadeia principal primariamente de carbono, mas pode incluir opcionalmente heteroátomos. Desse modo, grupos, como metila, etoxietila, 2-piridila e trifluorometila são considerados como hidrocarbila com os propósitos deste pedido, mas substituintes, como acetila (que tem um substituinte =O no carbono de ligação) e etóxi (que é ligado através de oxigênio, não carbono) não são. Os grupos de hidrocarbila incluem, mas sem limitação, arila, heteroarila, carbociclo, heterociclila, alquila, alquenila, alquinila, e combinações dos mesmos.

[0077] O termo "inferior", quando usado em combinação com uma porção química, como acila, acilóxi, alquila, alquenila, alquinila, ou alcóxi, é destinado a incluir grupos em que há dez ou menos átomos não hidrogênio no substituinte, por exemplo, seis ou menos. Uma "alquila inferior", por exemplo, se refere a um grupo alquila que contém dez ou menos átomos de carbono, por exemplo, seis ou menos. Em certas modalidades, substituintes acila, acilóxi, alquila, alquenila, alquinila ou alcóxi definidos no presente documento são, respectivamen-

te, acila inferior, acilóxi inferior, alquila inferior, alquenila inferior, alquinila inferior, ou alcóxi inferior, caso apareçam sozinhos ou em combinação com outros substituintes, como nas declarações hidroxialquila e aralquila (cujo caso, por exemplo, os átomos no grupo arila não são contados quando contando os átomos de carbono no substituinte de alquila).

[0078] Os termos "policiclila", "policiclo" e "policíclico" se referem a dois ou mais anéis (por exemplo, cicloalquilas, cicloalquenilas, cicloalquinilas, arilas, heteroarilas e/ou heterociclilas) em que dois ou mais átomos são comuns a dois anéis contíguos, por exemplo, os anéis são "anéis fundidos". Cada um dos anéis do policiclo pode ser substituído ou não substituído. Em certas modalidades, cada anel do policiclo contém de 3 a 10 átomos no anel, por exemplo, de 5 a 7.

[0079] O termo "N-óxido" se refere a um grupo zwitteriônico que contém um átomo de nitrogênio no estado de oxidação +1 ligado a um átomo de oxigênio no estado de oxidação -1. Um exemplo não limitante de um N-óxido é N-óxido pirídio mostrado abaixo. Conforme usado no presente documento, o termo "N-óxido" abrange substituintes de outros grupos que têm esta funcionalidade.



[0080] O termo "substituído" se refere a porções químicas que têm substituintes que substituem um hidrogênio em um ou mais carbonos da cadeia principal. Será entendido que "substituição" ou "substituído por" inclui a condição implícita de que tal substituição esteja de acordo com a valência permitida do átomo substituído e do substituinte, e que a substituição resulte em um composto estável, por exemplo, que não é espontaneamente submetida à transformação, como por redispersi-

ção, ciclização, eliminação, etc. Conforme usado no presente documento, o termo "substituído" é contemplado por incluir todos os substituintes permissíveis de compostos orgânicos. Em um aspecto amplo, os substituintes permissíveis incluem acíclicos e cíclicos, ramificados e não ramificados, carbocíclicos e heterocíclicos, aromáticos e substituintes não aromáticos de compostos orgânicos. Os substituintes permissíveis podem ser um ou mais e os mesmos ou diferentes para compostos orgânicos apropriados. Com propósitos desta invenção, os heteroátomos, como nitrogênio, podem ter substituintes de hidrogênio e/ou quaisquer substituintes permissíveis de compostos orgânicos descritos no presente documento que satisfazem as valências dos heteroátomos. Os substituintes podem incluir quaisquer substituintes descritos no presente documento, por exemplo, um halogênio, uma hidroxila, uma carbonila (como uma carboxila, uma alcóxicarbonila, uma formila, ou uma acila), uma tiocarbonila (como um tioéster, um tioacetato, ou um tioformato), um alcóxi, uma fosforila, um fosfato, um fosfonato, um fosfinato, um amino, um amido, uma amidina, uma imina, um ciano, um nitro, um azido, uma sulfidril, um alquiltio, um sulfato, um sulfonato, uma sulfamoila, um sulfonamido, uma sulfonila, uma heterociclila, uma aralquila, ou uma porção química aromática ou heteroaromática. Será entendido por aqueles versados na técnica que os substituintes podem ser substituídos por si próprios, se apropriado. A menos que especificamente declarado como "não substituído", referências a porções químicas no presente documento são entendidas como incluindo variantes substituídas. Por exemplo, a referência a um grupo "arila" ou porção química inclui implicitamente tanto as variantes substituídas quanto não substituídas.

[0081] O termo "tioalquila", conforme usado no presente documento, se refere a um grupo alquila substituído por um grupo tiol. Um "composto tiol", conforme discutido acima, pode incluir uma tioalquila

como um substituinte na estrutura de composto. Um composto tiol pode ter, por exemplo, um, dois, três ou mais grupos tioalquila.

[0082] O termo "tioéter", conforme usado no presente documento, é equivalente a um éter, em que o oxigênio é substituído por um enxofre.

[0083] O termo "indivíduo" ao qual a administração é contemplada inclui, mas sem limitação, seres humanos (isto é, um masculino ou feminino de qualquer grupo de idade, por exemplo, um indivíduo pediátrico (por exemplo, infante, criança, adolescente) ou indivíduo adulto (por exemplo, adulto jovem, adulto de meia-idade ou idoso)) e/ou outros primatas (por exemplo, macacos cynomolgus, macacos rhesus); mamíferos, incluindo mamíferos comercialmente relevantes, como gado, porcos, cavalos, carneiros, cabras, gatos e/ou cães; e/ou aves, incluindo aves comercialmente relevantes, como frangos, patos, gansos, codornas e/ou perus. Os indivíduos preferenciais são seres humanos.

[0084] Conforme usado no presente documento, a expressão "administração conjunta" se refere a qualquer forma de administração de dois ou mais compostos terapêuticos diferentes de modo que o segundo composto seja administrado enquanto o composto terapêutico anteriormente administrado ainda seja eficaz no corpo (por exemplo, os dois compostos são simultaneamente eficazes no paciente, o que pode incluir efeitos sinérgicos dos dois compostos). Por exemplo, os compostos terapêuticos diferentes podem ser administrados na mesma formulação ou em uma formulação separada, concomitante ou sequencialmente. Em certas modalidades, os compostos terapêuticos diferentes podem ser administrados em uma hora, 12 horas, 24 horas, 36 horas, 48 horas, 72 horas, ou uma semana.

[0085] "Coadministração" se refere à administração dos dois agentes em qualquer maneira em que os efeitos farmacológicos de ambos os agentes são manifestados no paciente ao mesmo tempo. Desse

modo, a administração concomitante não necessita que uma composição farmacêutica única, a mesma forma de dosagem, ou até a mesma via de administração seja usada para administração de ambos os agentes ou que os dois agentes sejam administrados precisamente ao mesmo tempo. Entretanto, em algumas situações, a coadministração será alcançada mais convenientemente pela mesma forma de dosagem e a mesma via de administração, substancialmente ao mesmo tempo.

[0086] Conforme usado no presente documento, um produto terapêutico que "previne" um distúrbio ou afecção se refere a um composto que, em uma amostra estatística, reduz a ocorrência do distúrbio ou afecção na amostra tratada em relação a uma amostra de controle não tratada, ou atrasa o início ou reduz a gravidade de um ou mais sintomas do distúrbio ou afecção em relação à amostra de controle não tratada.

[0087] O termo "tratar" significa um ou mais dentre suavizar, aliviar, atrasar, reduzir, melhorar, ou gerir pelo menos um sintoma de uma afecção em um indivíduo. O termo "tratar" também pode significar um ou mais dentre reter, atrasar o início (isto é, o período antes da manifestação clínica da afecção) ou reduzir o risco de desenvolver ou piorar uma afecção.

[0088] O termo "gerir" inclui tratamentos terapêuticos conforme definido acima. Gerir inclui alcançar um nível de estado estável de infecção conforme determinado por métodos conhecidos na técnica. O estado estável pode incluir a avaliação de um ou mais dentre a gravidade da infecção (ou infecções), o tamanho e a localização da infecção (ou infecções), o número de patógenos microbianos diferentes presentes na infecção (ou infecções), o nível de patógenos tolerantes ou resistentes a antibióticos, o grau de resposta ao tratamento, como com uma composição de BT descrita no presente documento, o grau

de formação de biofilme e redução, e os efeitos colaterais experimentados pelo indivíduo. Durante o gerenciamento de uma infecção, a infecção pode flutuar de aumento para atenuação em gravidade, na quantidade ou grau de infecção, quantidade de efeitos colaterais experimentados pelo indivíduo, ou outros indícios resultantes de indivíduo. Por um período de tempo, como dias, mês ou anos, o grau de gerenciamento da infecção pode ser determinado pela avaliação dos fatores acima para avaliar se o curso clínico de infecção melhorou, é bacteriostático, ou se piorou. Em algumas modalidades, gerir uma infecção inclui tratamento bem-sucedido de patógeno microbiano (ou patógenos microbianos) que é tolerante a fármaco ou resistente a fármaco de outro modo.

[0089] O termo "atenuar a gravidade" de infecção (ou infecções) se refere a uma melhora no curso clínico da infecção em qualquer base mensurável. Tal base pode incluir índices mensuráveis, como reduzir a extensão de infecção (ou infecções), a possibilidade de a infecção (ou infecções) ser considerada aguda, o número e identidade de patógenos microbianos que causam a infecção (ou infecções), a extensão de biofilmes microbianos (por exemplo, bacterianos ou fúngicos) e efeitos colaterais experimentados pelo indivíduo. Em algumas modalidades, atenuar a gravidade de uma infecção é determinada por medições, como redução em contagens de infecção de esputo (por exemplo, uma redução em CFU no esputo). Em algumas modalidades, atenuar a gravidade envolve deter um declínio estável no resultado para alcançar a infecção estabilizada (ou infecções estabilizadas), resultando no indivíduo realizando gerenciamento bem-sucedido da infecção (ou infecções). Em outras modalidades, atenuar a gravidade pode resultar em tratamento substancial a completo da infecção (ou infecções). Em algumas modalidades, atenuar a gravidade se refere a uma atenuação de exacerbações associadas à doença ou infecção (por

exemplo, por uma diminuição de 1% a 99% em exacerbações). Em algumas modalidades, atenuar a gravidade pode se referir a um aumento em função pulmonar (por exemplo, por um aumento de 1% a 99% em função pulmonar).

[0090] Conforme usado no presente documento, o termo "exacerbação" se refere a um aumento na gravidade de sintomas durante um curso de uma doença que é mais associada a uma piora de qualidade de vida. As exacerbações são relativamente frequentes em pacientes com doenças pulmonares crônicas, como CF. Por definição, exacerbações são simplesmente uma piora e/ou aumento em sintomas.

[0091] Em algumas modalidades, atenuar a gravidade de infecções e/ou sintomas pode se referir a resultados relatados por paciente ("PROs"). Um instrumento de PRO é definido como qualquer medida de uma situação de saúde do indivíduo que é elicitada do paciente e determina como o paciente "se sente ou funciona em relação à sua condição de saúde". PROs são particularmente úteis no relato de resultados em CF e a possibilidade de a gravidade de sintomas ter sido reduzida ou atenuada. Tais sintomas podem ser eventos observáveis, comportamentos ou sentimentos (por exemplo, capacidade de andar rapidamente, falta de apetite, expressões de raiva), ou resultados não observáveis que são conhecidos apenas pelo paciente (por exemplo, percepções de dor, sentimentos de depressão).

[0092] Uma "quantidade eficaz", conforme usado no presente documento, se refere a uma quantidade que é suficiente para alcançar um efeito biológico desejável. Uma "quantidade terapeuticamente eficaz", conforme usado no presente documento, se refere a uma quantidade que é suficiente para alcançar um efeito terapêutico desejável. Por exemplo, uma quantidade terapeuticamente eficaz pode se referir a uma quantidade que é suficiente para melhorar pelo menos um sinal ou sintoma de infecção (por exemplo, infecção respiratória).

[0093] Uma "resposta" a um método de tratamento pode incluir uma diminuição em ou amenização de sintomas negativos, uma diminuição no progresso de uma infecção ou sintomas dos mesmos, um aumento em sintomas benéficos ou resultados clínicos, uma atenuação de efeitos colaterais, estabilização da infecção, e remediação parcial ou completa de infecção, entre outros.

[0094] "Susceptibilidade ou sensibilidade a antibiótico" se refere à possibilidade de uma bactéria ser tratada de modo bem-sucedido por um dado antibiótico. De modo similar, "Susceptibilidade ou sensibilidade antifúngica" se refere à possibilidade de um fungo ser tratado de modo bem-sucedido por um dado antibiótico. O teste quanto à susceptibilidade pode ser realizado por métodos conhecidos na técnica, como o método Kirby-Bauer, o método Stokes e os métodos de diluição de caldo de ágar. A eficácia de um antibiótico no extermínio das bactérias ou impedimento de bactérias de se multiplicar pode ser observado como áreas de quantidade reduzida ou estável, respectivamente, de crescimento bacteriano em um meio, como uma pastilha, ágar, ou cultura de caldo.

[0095] "Tolerância antimicrobiana" se refere à capacidade de um micróbio, como bactérias ou fungos, para resistir naturalmente ao extermínio por antibióticos. A mesma não é causada por micróbios mutantes, mas, em vez disso, por células microbianas que existem em um estado transiente, dormente, não divisório. A tolerância a antibiótico ou fármaco é causada por uma pequena subpopulação de células microbianas denominadas insistentes. Os insistentes não são mutantes, mas, em vez disso, são células dormentes que podem sobreviver aos tratamentos antimicrobianos que exterminam a maior parte de seus irmãos geneticamente idênticos. As células persistentes entraram em um estado fisiológico de crescimento não ou extremamente crescente que torna as mesmas insensíveis (refratárias ou tolerantes) à

ação de fármacos antimicrobianos. De modo similar, "tolerância a antibiótico" se refere à capacidade de uma bactéria para resistir naturalmente a ser exterminado por antibióticos e "tolerância a antifúngico" se refere à capacidade de um fungo de resistir naturalmente a ser exterminado por antibióticos.

[0096] "Resistência antimicrobiana" se refere à capacidade de um micróbio de resistir aos efeitos de medicamento que pôde tratar anteriormente de modo bem-sucedido o micróbio. Os micróbios resistentes a múltiplos antimicrobianos são chamados multirresistentes (MDR). A resistência surge através de um dos três mecanismos: resistência natural em certos tipos de bactérias, mutação genética, ou por uma espécie que adquire resistência a partir de outra. As mutações podem levar à inativação de fármaco, alteração do sítio de ligação do fármaco, alteração de vias metabólicas e diminuir a permeabilidade de fármaco.

[0097] Conforme usado no presente documento, os termos "atividade antibacteriana", "atividade antifúngica" e "atividade antimicrobiana", com referência a uma composição de BT da presente invenção, se refere à capacidade de exterminar e/ou inibir o crescimento ou reprodução de um micro-organismo particular. Em certas modalidades, a atividade antibacteriana ou antimicrobiana é avaliada cultivando-se as bactérias, por exemplo, bactérias Gram-positivas (por exemplo, *S. aureus*), bactérias Gram-negativas (por exemplo, *A. baumannii*, *E. coli*, e/ou *P. aeruginosa*) ou bactérias não classificadas como Gram-positivas ou Gram-negativas, ou fungos de acordo com as técnicas padrão (por exemplo, em cultura líquida ou em placas de ágar), colocando a cultura em contato com uma composição de BT da presente invenção e monitorando o proliferação celular após o referido contato. Por exemplo, em uma cultura líquida, as bactérias podem ser proliferadas para uma densidade óptica ("OD") representativa de um ponto

intermediário em crescimento exponencial da cultura; a cultura é exposta a uma ou mais concentrações de um ou mais compostos de BT da presente invenção, ou variantes dos mesmos, e a OD é monitorada em relação a uma cultura de controle. A OD diminuída em relação a uma cultura de controle é representativa de atividade antibacteriana (por exemplo, exibe atividade de extermínio lítico). De modo similar, permite-se que as colônias bacterianas se formem em uma placa de ágar, a placa exposta a uma composição de BT da presente invenção, ou variantes da mesma, e proliferação subsequente das colônias avaliadas em relação a placas de controle. O tamanho diminuído de colônias, ou números totais diminuídos de colônias, indicam atividade antibacteriana.

[0098] "Biofilme" se refere a qualquer consórcio sintrófico de micro-organismos em que as células aderem umas às outras e também frequentemente a uma superfície. Estas células aderentes se tornam embebidas de uma matriz extracelular pegajosa que é composta de substâncias poliméricas extracelulares (EPS). Mediante a formação de biofilmes, a resistência microbiana a antibióticos é até 1.000 vezes maior em comparação com aquela de bacterianas planctônicas. Os agregados bacterianos são agrupamentos de células lateralmente alinhadas que podem iniciar o desenvolvimento de biofilme, que tem uma estrutura 3D mais complexa e densa. Em algumas modalidades, o biofilme pode compreender uma ou mais espécies de bactérias (*por exemplo, Pseudomonas aeruginosa e Staphylococcus aureus*) e/ou um ou mais filos diferentes (*por exemplo, bactérias, vírus e fungos*).

[0099] Conforme usado no presente documento, a discussão de patógenos bacterianos ou fúngicos também abrange qualquer micróbio (bactérias e/ou fungos) que contribui para o estado patológico nos pulmões. Isto inclui tanto os micróbios reconhecidos quanto não reconhecidos, e também podem incluir as bactérias ou fungos que não são

patógenos, mas que facilitam simplesmente a atividade e a presença de patógenos e seus biofilmes. Como exemplo, as modalidades direcionadas à inibição de viabilidade celular ou proliferação celular de células planctônicas do patógeno bacteriano ou fúngico também estendem a inibição de viabilidade celular ou proliferação celular de células planctônicas dos micróbios bacterianos e/ou fúngicos que simplesmente facilitam a atividade e a presença de patógenos e seus biofilmes.

[00100] "Superfície de via respiratória" e "superfície pulmonar", conforme usado no presente documento, incluem superfícies de via respiratória pulmonar, como os brônquios e bronquíolos, superfícies alveolares, e superfícies nasais e sinusais.

[00101] "Solução salina", conforme usado no presente documento, se refere a uma solução compreendida de, que consiste em, ou que consiste essencialmente em cloreto de sódio na água. A solução salina pode ser hipertônica, isotônica ou hipotônica. Em algumas modalidades, a solução salina pode compreender cloreto de sódio em uma quantidade de aproximadamente 0,1% a aproximadamente 40% em peso, ou qualquer faixa na mesma, como, mas sem limitação, cerca de 0,1% a aproximadamente 10%, aproximadamente 0,5% a aproximadamente 15%, aproximadamente 1% a aproximadamente 20%, aproximadamente 5% a aproximadamente 25%, aproximadamente 10% a aproximadamente 40%, ou aproximadamente 15% a aproximadamente 35% em peso (em mg/100 ml). Em certas modalidades, o cloreto de sódio está incluído em uma solução em uma quantidade de aproximadamente 0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,4%, 0,5%, 0,6%, 0,7%, 0,8%, 0,9%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40% em peso (em mg/100 ml), ou qualquer faixa na mesma.

[00102] "Solução salina hipertônica", conforme usado no presente

documento, se refere a uma solução compreendida de, que consiste em, ou que consiste essencialmente em superior a 0,9% em peso de cloreto de sódio em água. Em geral, o cloreto de sódio está incluído na solução em uma quantidade de aproximadamente 0,9% a aproximadamente 40% em peso, ou qualquer faixa na mesma, como, mas sem limitação, aproximadamente 1% a aproximadamente 15%, aproximadamente 5% a aproximadamente 20%, aproximadamente 5% a aproximadamente 25%, aproximadamente 10% a aproximadamente 40%, ou aproximadamente 15% a aproximadamente 35% em peso. Em certas modalidades, cloreto de sódio está incluído na solução em uma quantidade de aproximadamente 0,9%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40% em peso, ou qualquer faixa nos mesmos.

[00103] "Solução salina hipotônica", conforme usado no presente documento, se refere a uma solução compreendida de, que consiste em, ou que consiste essencialmente em inferior a 0,9% em peso de cloreto de sódio na água. Em algumas modalidades, cloreto de sódio é incluído na solução em uma quantidade de aproximadamente 0,9%, 0,8%, 0,7%, 0,6%, 0,5%, 0,4%, 0,3%, 0,2%, 0,1% em peso, ou qualquer faixa na mesma.

[00104] "Solução salina isotônica", conforme usado no presente documento, se refere a uma solução compreendida de, que consiste em, ou que consiste essencialmente em 0,9% em peso de cloreto de sódio na água.

[00105] De acordo com algumas modalidades, solução salina (por exemplo, solução salina hipertônica) pode incluir um excipiente. Um excipiente pode ser um excipiente farmacologicamente aceitável. "Farmacologicamente aceitável" conforme usado no presente documento

significa que o composto ou composição é adequado para administração a um indivíduo para alcançar os tratamentos descritos no presente documento, sem efeitos colaterais prejudiciais indevidos em luz da gravidade da doença e necessidade do tratamento. Os excipientes exemplificativos incluem, mas sem limitação, um tampão e/ou um agente de tamponamento (por exemplo, um ânion, um cátion, um composto orgânico, um sal, etc.). Os tampões exemplificativos incluem, mas sem limitação, tampões à base de ácido carbônico/carbonato/bicarbonato, tampões à base de hidrogenoftalato dissódico/di-hidrogeno-ortofosfato sódico, tampões à base de tris(hidroximetil) aminometano/ácido clorídrico, tampões à base de barbitone sódico/ácido clorídrico, e qualquer combinação dos mesmos. Os agentes tamponantes exemplificativos incluem, mas sem limitação, ácido carbônico, carbonato, bicarbonato, hidrogenoftalato dissódico, di-hidrogeno-ortofosfato sódico, tris(hidroximetil)aminometano, ácido clorídrico, barbitone sódico, CO₂ dissolvido (por exemplo, CO₂ formulado em um pH superior a 6,6), e qualquer combinação dos mesmos. Em certas modalidades, solução salina compreende um excipiente de tampão bicarbonato, como um ânion bicarbonato (HCO₃). Em algumas modalidades, solução salina hipertônica pode incluir bicarbonato de sódio, carbonato de sódio, ácido carbônico, e/ou CO₂ dissolvido formulado em um pH de superior a 6,5. Os ingredientes adicionais podem ser incluídos conforme desejável dependendo da condição particular em tratamento, conforme discutido adicionalmente abaixo.

[00106] Conforme usado no presente documento, o termo "diâmetro volumétrico médio" ou "VMD" de um aerossol é o diâmetro de tamanho de partícula identificado de modo que metade da massa das partículas de aerossol seja contida nas partículas com diâmetro maior do que o VMD, e metade da massa das partículas de aerossol seja contida nas partículas com diâmetro menor do que o VMD. VMD é tipicamente

medido por difração de laser.

[00107] "Diâmetro aerodinâmico mediano de massa" ou "MMAD" é uma medida do tamanho aerodinâmico de uma partícula de aerossol dispersa. O diâmetro aerodinâmico é usado para descrever uma partícula submetida à aerossolização em termos de seu comportamento de repouso, e é o diâmetro de uma esfera de densidade unitária que tem a mesma velocidade de sedimentação, geralmente no ar, como a partícula em questão. O diâmetro aerodinâmico abrange o formato de partícula, densidade e tamanho físico de uma partícula. Conforme usado no presente documento, MMAD se refere ao ponto intermediário ou médio da distribuição de tamanho de partícula aerodinâmica de uma partícula submetida à aerossolização determinada por impacto de cascata e/ou tempo de voo do laser e/ou impactador em cascata.

[00108] "Diâmetro médio de massa" ou "MMD" é uma medida de tamanho médio de partícula. Qualquer número de técnicas comumente empregadas pode ser usado para medir o tamanho médio de partícula.

[00109] Conforme usado no presente documento, "D90" se refere ao valor de 90% de diâmetro de partícula (a micropartícula ou partícula submetida à aerossolização). Por exemplo, se $D_{90} = 1 \mu\text{m}$, 90% das partículas são menores do que $1 \mu\text{m}$. De modo similar, "D80" se refere aos 80% de valor de diâmetro de partícula (a micropartícula ou partícula submetida à aerossolização), "D70" se refere aos 70% de valor de diâmetro de partícula (a micropartícula ou partícula submetida à aerossolização), "D60" se refere aos 60% de valor de diâmetro de partícula (a micropartícula ou partícula submetida à aerossolização), "D50" se refere aos 50% de valor de diâmetro de partícula (a micropartícula ou partícula submetida à aerossolização), "D40" se refere aos 40% de valor de diâmetro de partícula (a micropartícula ou partícula submetida à aerossolização), "D30" se refere aos 30% de valor de diâmetro de partícula (a micropartícula ou partícula submetida à aerossolização),

"D20" se refere aos 20% de valor de diâmetro de partícula (a micropartícula ou partícula submetida à aerossolização), "D10" se refere aos 10% de valor de diâmetro de partícula (a micropartícula ou partícula submetida à aerossolização).

[00110] Conforme usado no presente documento, "monodisperso" se refere a uma coletânea de partículas (dispersão a granel ou de aerossol) que compreende partículas de um MMD e/ou MMAD e/ou VMD substancialmente uniformes.

[00111] Conforme usado no presente documento, o termo "eficiência de deposição" se refere à porcentagem da dose distribuída que é depositada na área de interesse. Desse modo, a eficiência de deposição de um método e/ou sistema para distribuir um medicamento submetido à aerossolização nos pulmões é a quantidade em massa do aerossol depositado nos pulmões divididos pela quantidade total do aerossol distribuída pelo sistema para as narinas.

[00112] Conforme usado no presente documento, "substancialmente" ou "substancial" se refere à extensão completa ou quase completa ou grau de uma ação, característica, propriedade, estado, estrutura, item, ou resultado. Por exemplo, um objeto que é "substancialmente" envolvido significaria que o objeto está completamente envolvido ou quase completamente envolvido. O grau permissível exato de desvio de totalidade absoluta pode, em alguns casos, depender do contexto específico. Entretanto, de modo geral, a proximidade de conclusão será tal que terá o mesmo resultado geral se a completção absoluta e total for obtida. O uso de "substancialmente" é igualmente aplicável quando usado em uma conotação negativa para se referir à falta completa ou próxima de ação, característica, propriedade, estado, estrutura, item, ou resultado. Por exemplo, uma composição que é "substancialmente livre de" outros agentes ativos não teria completamente outros agentes ativos, ou quase não teria completamente outros agentes

ativos cujo efeito seria o mesmo do que se não tivesse completamente outros agentes ativos. Em outras palavras, uma composição que é "substancialmente livre de" um ingrediente ou elemento ou outro agente ativo pode ainda conter tal item enquanto ainda não houver efeito mensurável do mesmo.

MÉTODOS DE USO

[00113] Fibrose cística (CF), um distúrbio recessivo autossômico, é causada por deficiência funcional do canal de cloreto de membrana plasmática ativado por cAMP, regulador de condutância transmembrana de fibrose cística (CFTR), que resulta em complicações pulmonares e outras.

[00114] Em pacientes com fibrose cística, a ausência ou disfunção de CFTR leva à disfunção de glândula exócrina e uma doença multisistêmica caracterizada pela insuficiência pancreática e má-absorção, assim como depuração mucociliar anormal no pulmão, mucostase, infecção pulmonar crônica e inflamação, função pulmonar diminuída e, finalmente, falha respiratória.

[00115] A perda de um canal de CFTR funcional na membrana plasmática rompe homeostase iônica e a hidratação de superfície de via respiratória que levam à função pulmonar reduzida. O volume líquido periciliar reduzido e a viscosidade de muco aumentada impedem que a depuração mucociliar resulte em inflamação e infecção crônica.

[00116] Em indivíduos saudáveis, a depuração de bactérias pulmonares depende da ação combinada de dois recursos anatômicos: (i) a superfície apical ciliada do epitélio de via respiratória e (ii) uma camada de muco que alinha o lúmen de via respiratória. Os cílios de via respiratória se chocam de modo síncrono, criando uma corrente estável que move continuamente a camada mucosa para cima, em direção à nasofaringe. A camada mucosa é bifásica, que consiste em uma camada superior viscosa que serve para reter particulados e micro-

organismos e uma

[00117] camada mais fluida inferior em que os cílios se chocam. Quando funciona de modo normal, este sistema de depuração retém corpos estranhos no muco e carrega os mesmos subsequentemente para a nasofaringe,

[00118] em que os mesmos são expectorados e engolidos.

[00119] Entretanto, as características de secreção anormais das células de via respiratória de CF devido ao desequilíbrio iônico causado pela proteína de CFTR mutante alteram a viscosidade do fluido de via respiratória, de modo que a camada "periciliar" normalmente serosa se torne mais espessa, inibindo a ação de elevador que elimina corpos estranhos. As bactérias são retidas na mucosa e resultam em uma infecção contínua nos pulmões.

[00120] Os pacientes com CF produzem rotineiramente o esputo a partir dos pulmões através da tosse, auxiliado por outras terapias físicas designadas a liberar o muco dos pulmões. Muitos dos organismos que são isolados de esputo de CF são patógenos que colonizam de modo frequente e benigno o trato respiratório superior (por exemplo, *H. influenzae* não tipável) ou o nariz (por exemplo, *S. aureus*) ou são organismos ambientais comuns que se comportam como patógenos, apenas sob certas situações oportunistas (por exemplo, *P. aeruginosa*). As bactérias diferentes e o nível de infecção nos pulmões podem ser determinativos de sintomas do paciente com CF e resultados. Por exemplo, a presença de *S. aureus* e a ausência de *P. aeruginosa* prediz a sobrevivência a longo prazo em pacientes com CF após a idade de 18 anos. Além disto, o potencial para aumentar a colonização de *P. aeruginosa* como uma consequência de supressão de infecção por *S. aureus* pode ser relevante para alguns pacientes.

[00121] De todas as bactérias que podem colonizar nos pulmões de pacientes com CF, infecção crônica de via respiratória por *P. aerugi-*

nosa e a resposta inflamatória acompanhante são os problemas clínicos principais

[00122] para pacientes com CF hoje. Embora a quimioterapia de antibiótico e a quimioprofilaxia tenham a morbidez e mortalidade precoce reduzidas de pacientes com CF a partir desta infecção, a capacidade intrínseca de

[00123] *P. aeruginosa* de desenvolver a resistência a muitos antibióticos comumente usados contribui provavelmente para a incapacidade de erradicar *P. aeruginosa* do pulmão de pacientes com CF e permite finalmente que este micróbio seja altamente problemático para estes pacientes.

[00124] Os pacientes com CF podem adquirir *P. aeruginosa* em seus tratos respiratórios em qualquer momento, com a maioria dos estudos indicando que 70 a 80% pacientes com CF são infectados por sua adolescência. A infecção por *P. aeruginosa* provavelmente ocorre inicialmente dentro dos primeiros 3 anos de vida. Após o início de infecção crônica, os pacientes experimentam exacerbações episódicas que podem se beneficiar da quimioterapia de antibiótico. A infecção pode resultar de contatos sociais ou pode ser adquirida por hospital, mas a diversidade de clones de *P. aeruginosa* isolados de pacientes com CF sugere que a maioria dos isolados clínicos se originam no ambiente. Os pacientes com CF cronicamente infectados por *P. aeruginosa* mostram um declínio de função pulmonar mais abrupto (expressado como volume expiratório forçado em declínio de 1 segundo (FEV1) ao longo do tempo), um número superior de exacerbações pulmonares, mais admissões hospitalares e mortalidade superior em relação a pacientes livres de *P. aeruginosa*. Os efeitos de *P. aeruginosa* são mais severos se a infecção crônica se desenvolver precocemente.

[00125] As infecções de *P. aeruginosa* podem mudar ao longo do

tempo para desenvolver um fenótipo mucoide, o que pode iniciar o estágio de infecção crônica de fibrose cística. Os resultados de fenótipo de mucoide resultam da produção bacteriana de um polissacarídeo conhecido tanto como alginoide quanto como exopolissacarídeo mucoide (MEP) e tem uma função importante em evasão bacteriana da resposta imune de hospedeiro. O MEP/alginato em si pode promover a sobrevivência bacteriana diante de efetores imunes hospedeiros. A superprodução de alginato por *P. aeruginosa* é correlacionada ao início de deterioração significativa em função pulmonar. Além disto, *P. aeruginosa* pode se proliferar como um biofilme, o que aumenta a resistência bacteriana à ação fagocítica e eficácia de antibiótico.

[00126] Os biofilmes bacterianos são uma matriz de células que aderem uma à outra e frequentemente a uma superfície, como uma mucosa pulmonar. As células bacterianas se tornam embebidas em uma matriz extracelular formada a partir de substâncias poliméricas extracelulares, como polissacarídeos, proteínas, lipídios e DNA. As células bacterianas de biofilme são fisiologicamente diferentes do que células planctônicas nas quais um dentre vários genes são diferencialmente regulados. Os biofilmes também podem ser mais resistentes a antibióticos dado o abrigo fornecido pela matriz. Biofilmes de *P. aeruginosa* e outras bactérias que estão presentes nos pulmões de pacientes com CF aumentam a dificuldade de gerenciamento e redução de infecção bem-sucedidos. As combinações de bactérias relevantes de CF que formam biofilmes de múltiplas espécies que contêm *P. aeruginosa* demonstraram resistência, virulência e patogenicidade maiores em relação aos biofilmes de espécie única comparáveis. A presença de tais biofilmes complexos nos pulmões de pacientes com CF é considerada como grandemente responsável pela natureza persistente crônica destas infecções pulmonares, que não são responsáveis por morbidez crônica, contínua e progressiva, mas também são finalmente

responsáveis pela mortalidade nesta população.

[00127] Além de *P. aeruginosa*, outros patógenos comumente encontrados em pulmões de pacientes com CF incluem, mas sem limitação, *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus lugdunensis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus milleri/anginosus*, *Streptococcus pyogenes*, *Mycobacterium não tuberculoso*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Burkholderia* spp., *Achromobacter xylosoxidans*, *Pandoraea sputorum*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Alcaligenes xylosoxidans*, *Haemophilus pittmaniae*, *Serratia marcescens*, *Candida albicans*, *Candida albicans resistente a fármacos*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida guilliermondii*, *Candida auris*, *Candida tropicalis*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Morganella morganii*, *Inquilinus limosus*, *Ralstonia mannitolilytica*, *Pandoraea apista*, *Pandoraea pnomenusa*, *Pandoraea sputorum*, *Bdellovibrio bacteriovorus*, *Bordetella bronchiseptica*, *Vampirovibrio chlorellavorus*, *Actinobacter baumannii*, *Cupriavidus metallidurans*, *Cupriavidus pauculus*, *Cupriavidus respiraculi*, *Delftia acidivorans*, *Exophiala dermatitidis*, *Herbaspirillum frisingense*, *Herbaspirillum seropedicae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pandoraea norimbergensis*, *Pandoraea pulmonicola*, *Pseudomonas mendocina*, *Pseudomonas pseudoalcaligenes*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas stutzeri*, *Ralstonia insidiosa*, *Ralstonia pickettii*, *Neisseria gonorrhoeae*, *E. coli* NDM-1 positiva, *Enterobacter cloaca*, *E. faecium* resistente à vancomicina, *E. faecalis* resistente à vancomicina, *E. faecium*, *E. faecalis*, *S. agalactiae* resistente à clindamicina, *S. agalactiae*, *Bacteroides fragilis*, *Clostridium difficile*, *Streptococcus pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis*, *Haemophilus haemolyticus*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Chlamydia pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Atopobium* spp., *Sphingomonas* spp., *Saccharibacteria* spp., *Leptotrichia* spp., *Capnocytophaga*, *Oribacterium* spp., *Aquabacterium* spp.,

Lachnoanaerobaculum spp., *Campylobacter* spp., *Acinetobacter* spp., *Agrobacterium* spp., *Bordetella* spp., *Brevundimonas* spp., *Chryseobacterium* spp., *Delftia* spp., *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp., *Pandora* spp., *Pseudomonas* spp., *Ralstonia* spp. e *Prevotella* spp.

[00128] *Mycobacterium* não tuberculosos exemplificativos incluem, mas sem limitação, *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium gordonae*, *Mycobacterium kansasii*, complexo *Mycobacterium avium* (MAC), complexo *Mycobacterium abscessus* (MABSC) *Mycobacterium marinum*, *Mycobacterium terrae* e *Mycobacterium chelonii*.

[00129] Espécies exemplificativas de *Burkholderia* incluem, mas sem limitação, *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia multivorans*, *Burkholderia cenocepacia*, *Burkholderia stabilis*, *Burkholderia vietnamiensis*, *Burkholderia dolosa*, *Burkholderia ambifaria*, *Burkholderia anthina*, *Burkholderia pyrrocinia*, *Burkholderia gladioli*, *Burkholderia ubonensis*, *Burkholderia arboris*, *Burkholderia latens*, *Burkholderia lata*, *Burkholderia metallica*, *Burkholderia seminalis*, *Burkholderia contaminans*, e *Burkholderia diffusa*.

[00130] Em algumas modalidades, o patógeno bacteriano é selecionado dentre *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* multirresistente, *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina, *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium avium*, *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia multivorans*, *Burkholderia cenocepacia*, *Burkholderia dolosa*, *Achromobacter xylosoxidans*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Staphylococcus epidermidis*, e *Burkholderia vietnamiensis*. Em certas modalidades, o patógeno bacteriano é selecionado dentre *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa*, e *Staphylococcus aureus*. Em certas modalidades, o patógeno bacteriano é selecionado dentre biofilmes de *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cenocepacia*, com-

plexo *Burkholderia cepacia*, *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium avium*, *Achromobacter* spp., *Staphylococcus epidermidis*, *Stenotrophomonas maltophilia*, e *Staphylococcus aureus*.

[00131] Em algumas modalidades, o patógeno bacteriano exibe resistência a um ou mais antibióticos. *S. aureus* resistente à metilina (MRSA) é um exemplo de uma cepa unicamente resistente que é difícil de tratar em pacientes com CF e a população em grande escala, enquanto cepas multirresistentes mais desafiadoras (MDR) podem ocorrer em bactérias, como *P. aeruginosa* e *S. aureus*. Por exemplo, um patógeno bacteriano pode se tornar resistente a padrões conhecidos de cuidados com antibiótico, incluindo, mas sem limitação, amicacina, aztreonam, metilina, vancomicina, nafcilina, gentamicina, ampicilina, cloramfenicol, doxiciclina e tobramicina. Em algumas modalidades, o antibiótico resistente é amicacina, aztreonam ou tobramicina.

[00132] Tratamento repetido a longo prazo com antibióticos para tratar infecções associadas à CF resulta tipicamente em desenvolvimento de resistência a antibiótico, caracterizado pela presença de biofilmes microbianos. A pesquisa recente demonstrou repetidamente uma correlação entre bactérias multirresistentes (MDR), e capacidades de formação de biofilme mais fortes, mais prolíficas. O envolvimento de biofilme no pulmão é considerado altamente imunogênico, acelerando o dano de pulmão estrutural. Adicionalmente, as bactérias em biofilmes são protegidas de antibióticos, o que aumenta a concentração inibidora máxima de tais antibióticos. Os biofilmes tendem a reduzir a atividade antimicrobiana de aminoglicosídeos e antibióticos beta-lactama tanto por mudança do pH da mucosa respiratória quanto através da produção de enzimas beta-lactamase. O envolvimento de bactérias de formação de biofilme em CF é correlacionado à função pulmonar diminuída e Qualidade de Vida reduzida, resposta diminuída à terapia de antibiótico, exacerbações aumentadas, e, ao longo do tem-

po, sobrevivência reduzida.

[00133] Em algumas modalidades, a composição de BT é administrada por inalação, por via oral ou nasal, com o uso de um dispositivo de aerossol, como um nebulizador. Um nebulizador pode administrar a composição de BT por via tópica ao tecido de pulmão, o que pode incluir a mucosa de pulmão, os alvéolos (por exemplo, alvéolos pulmonares profundos), os brônquios e/ou os bronquíolos. Desse modo, em algumas modalidades, a presente invenção fornece a administração da composição de BT à região profunda do pulmão do pulmão (por exemplo, os alvéolos pulmonares profundos). A administração tópica local da composição de BT fornece diversas vantagens principais sobre terapias de antibiótico sistêmico. O termo "sistêmico" se refere à administração de um medicamento no sistema circulatório do indivíduo de modo que a maior parte do corpo inteiro possa ser exposta. A administração sistêmica de um medicamento pode ocorrer por via entérica (absorção através do trato gastrointestinal, por exemplo, administração oral) ou por via parentérica (absorção através de injeção ou infusão, por exemplo, por via intravenosa).

[00134] Os produtos anti-infecciosos sistêmicos têm diversas desvantagens em relação ao tratamento de infecções localizadas, incluindo: (a) dificuldade em alcançar uma concentração terapeuticamente eficaz no sítio de infecção local, particularmente no caso de infecções associadas a localizações tópicas, como vias respiratórias pulmonares, (b) efeitos tóxicos não pretendidos frequentes em sistemas de órgão expostos através da circulação sistêmica, e (c) geração aumentada de bactérias resistentes ao antibiótico como um resultado da exposição espalhada da flora normal do corpo ao agente anti-infeccioso, (d) resultante em probabilidade maior de transmissão de tais bactérias resistentes a antibiótico a outras como resultado de exposição sustentada/repetida a longo prazo do complemento do corpo inteiro de flora

normal e (e) preservação reduzida da influência benéfica da flora normal saudável através do corpo devido à exposição sistêmica extensiva.

[00135] Na Figura 11, concentração plasmática é representada por um fármaco dosado por via oral e pulmonar. A dosagem oral (A) pode resultar em concentrações plasmáticas superiores que podem levar à toxicidade e exposição entre pacientes variada (absorção variável e depuração hepática de primeira passagem variável) ou interações fármaco-fármaco. A exposição plasmática superior é necessária para alcançar a exposição terapêutica nos pulmões. Em contraste, a dosagem inalada para indicações pulmonares tópicas necessita de uma dose total inferior para alcançar uma MIC eficaz, o que resulta em exposição sistêmica significativamente menor. A dosagem inalada (B) alcança concentrações locais superiores no pulmão que excede significativamente a MIC do fármaco por um longo período de tempo. Devido à distribuição de altas concentrações de fármaco diretamente ao pulmão, as concentrações pulmonares alcançadas que seguem a inalação podem exceder grandemente aquelas alcançadas por dosagem oral. A partir da experiência anterior com antibióticos inalados, a concentração pulmão de fármaco mediante inalação é >100x superior mediante à administração sistêmica/oral da mesma dose.

[00136] Em algumas modalidades, que um ou mais dentre os seguintes sintomas (por exemplo, sintomas relacionados à fibrose cística) têm a gravidade atenuada no indivíduo: tosse, respiração ofegante, falta de ar, bronquiectasia, pólipos nasais, hemoptise, insuficiência respiratória e exacerbação pulmonar. As infecções relacionadas à fibrose não cística também podem ser atenuadas em gravidade. A Figura 11 demonstra as diferenças em gravidade e eficácia de efeito colateral de um antibiótico inalado vs. um distribuído por via sistêmica. Desse modo, as formulações inaladas das composições de BT descri-

tas no presente documento fornecem um tratamento antibiótico mais alvejado e eficaz do que uma formulação correspondente administrada por via sistêmica.

[00137] Os compostos de BT são o produto de fármaco de molécula pequena antimicrobiana de espectro amplo (e antibiofilme) para o tratamento de infecções crônicas pulmonares potencialmente letais secundárias à CF. Sua eficácia se estende aos patógenos resistentes a antibiótico Gram positivo incluindo *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA, incluindo [CA]-MRSA associado à comunidade), *Staphylococcus epidermidis* resistente à meticilina (MRSE), e *Enterococcus* resistente à vancomicina (VRE). Os compostos de BT também são potentes contra patógenos Gram-negativos multirresistentes (MDR) incluindo *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* (incluindo, em todas as bactérias mencionadas acima, cepas resistentes a carbapenem), e *Acinetobacter baumannii*.

[00138] Os compostos de BT têm a capacidade dupla de superar a) um espectro muito diversificado de perfis de resistência a antibiótico (devido à evolução/diversificação acionada por persistência, tempo e isolamento em muitas regiões anatômicas através das vias respiratórias pulmonares), e b) biofilmes resistentes a antibiótico e MDR.

[00139] São descritos no presente documento métodos para tratar, gerir ou atenuar a gravidade de sintomas de fibrose cística (CF) e infecções em um indivíduo, em que o método compreende administrar ao indivíduo uma composição de bismuto-tiol (BT) que compreende pelo menos um composto de BT. Também são descritos no presente documento métodos para tratar, gerir ou atenuar a gravidade dos sintomas e infecções associados a uma ou mais doenças pulmonares ou infecções em um indivíduo, incluindo doenças não associadas à CF, em que o método compreende administrar ao indivíduo de uma composição de bismuto-tiol (BT) que compreende pelo menos um compos-

to de BT. Em algumas modalidades, o indivíduo tem pelo menos uma infecção pulmonar, como uma infecção pulmonar relacionada à CF. Em outras modalidades, o indivíduo tem pelo menos duas infecções pulmonares e as infecções são concomitantes ou sucessivas em ordem. As infecções pulmonares podem ser causadas pelo mesmo patógeno microbiano e serem localizadas em dois pulmões diferentes, ou lóbulos do pulmão. Em outras modalidades, as infecções pulmonares podem ser causadas por patógenos microbianos diferentes e serem localizados no mesmo pulmão, ou lóbulo do pulmão. Em algumas modalidades, a infecção pulmonar está em um pulmão, enquanto em outros a mesma está presente em ambos os pulmões. Em certas modalidades, a infecção pulmonar está em um ou mais dos três lóbulos do pulmão direito. Em outras modalidades, a infecção pulmonar é em um ou ambos os lóbulos do pulmão esquerdo. Qualquer combinação de um ou mais patógenos microbianos, quantidade de patógeno microbiano, e localização de infecção no pulmão é contemplada com o termo "infecção pulmonar". Em algumas modalidades, a infecção pulmonar é uma infecção por bronquiectasia, pneumonia, febre do vale, aspergilose broncopulmonar alérgica (ABPA), pneumonia associada à ventilação mecânica, pneumonia adquirida em hospital, pneumonia adquirida na comunidade, traqueobronquite associada à ventilação mecânica, infecção do trato respiratório inferior, *Mycobacterianão* tuberculosa, antraz, legionelose, coqueluche, bronquite, bronquiolite, infecção associada à DPOC e pós-transplante pulmonar. Em algumas modalidades, a infecção pulmonar é uma infecção por bronquiectasia.

[00140] Em algumas modalidades, a infecção pulmonar contém um ou mais patógenos bacterianos ou fúngicos. Em algumas modalidades, os métodos descritos compreendem tratar a infecção pulmonar relacionada à CF. Em algumas modalidades, os métodos descritos compreendem gerir a infecção pulmonar relacionada à CF. Em algu-

mas modalidades, os métodos descritos compreendem atenuar a gravidade da infecção pulmonar relacionada à CF.

[00141] Em algumas modalidades, os métodos da presente invenção podem incluir tratar, gerir ou atenuar a gravidade de sintomas e infecções associados a uma ou mais doenças ou infecções pulmonares em um indivíduo administrando-se ao indivíduo uma composição de bismuto-tiol (BT) que compreende pelo menos um composto de BT. Em uma modalidade específica, o composto é BisEDT.

[00142] Em certas modalidades, a infecção pulmonar está localizada em ou sobre a pulmão mucosa, os brônquios e/ou os bronquíolos. Em outras modalidades, a infecção pulmonar está localizada na superfície ou dentro de um biofilme bacteriano, bactérias agregadas, um biofilme fúngico ou fungos agregados. Em algumas modalidades, a infecção pulmonar está localizada no esputo em que a infecção pulmonar envolve e está, pelo menos em parte, presente nas camadas mucosas/de esputo associadas aos pulmões. Em certas modalidades, o patógeno bacteriano compreende uma ou mais bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. O patógeno bacteriano pode compreender um ou mais dentre um biofilme bacteriano e bactérias planctônicas. Em algumas modalidades, o patógeno fúngico compreende um ou mais dentre um biofilme fúngico e fungos planctônicos. Em certas modalidades, o fungo patogênico é *Candida albicans*, *Candida albicans resistente a fármaco*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida guilliermondii*, *Candida auris*, *Candida tropicalis*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus fumigatus* e/ou *Aspergillus flavus*.

[00143] Em algumas modalidades, o método compreende pelo menos um dentre: (i) reduzir o biofilme microbiano (por exemplo, bacteriano ou fúngico), (ii) conferir a proliferação do biofilme microbiano (por exemplo, bacteriano ou fúngico), e (iii) prevenir a reforma do biofilme microbiano (por exemplo, bacteriano ou fúngico). Em outras modalida-

des, a composição de BT trata, gere ou atenua a gravidade da infecção pulmonar por um ou mais dentre:

- prevenção da infecção pelo patógeno bacteriano ou fúngico;
- prevenção de elaboração ou secreção de exotoxinas do patógeno bacteriano ou fúngico;
- redução do patógeno bacteriano ou fúngico (por exemplo, conforme medido por quantidade ou título);
- inibição de viabilidade celular ou proliferação celular de células planctônicas (por exemplo, substancialmente todas as células) do patógeno bacteriano ou fúngico;
- inibição de formação de biofilme pelo patógeno bacteriano ou fúngico;
- inibição de viabilidade de biofilme ou proliferação de biofilme de células de formação de biofilme (por exemplo, substancialmente todas as células) do patógeno bacteriano ou fúngico; e
- redução da viscosidade do esputo.

[00144] Em algumas modalidades, a composição de bismuto-tiol compreende uma pluralidade de micropartículas que compreendem um composto de bismuto-tiol (BT), em que substancialmente todas as ditas micropartículas têm um diâmetro volumétrico médio de aproximadamente 0,4 μm a aproximadamente 5 μm , e em que o composto de BT compreende bismuto ou um sal de bismuto e um composto que contém tiol. Em algumas modalidades, o sal de bismuto é nitrato de bismuto, subnitrato de bismuto, ou cloreto de bismuto. Em algumas modalidades, o composto que contém tiol compreende um ou mais agentes selecionados dentre 1,2-etano ditiol, 2,3-dimercaptopropanol, piritiona, ditioeritritol, 3,4-dimercaptotolueno, 2,3-butanoditiol, 1,3-propanoditiol, 2-hidroxipropanotiol, 1-mercaptopropanol, ditioeritritol, ditiotreititol, cisteamina e ácido alfa-lipoico. Em algumas modalidades, pelo menos 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 90%, ou 95% das micropartícu-

las têm um diâmetro médio volumétrico de aproximadamente 0,4 µm a aproximadamente 3 µm, ou de aproximadamente 0,5 µm a aproximadamente 2 µm, ou de aproximadamente 0,7 µm a aproximadamente 2 µm, ou de aproximadamente 0,8 µm a aproximadamente 1,8 µm, ou de aproximadamente 0,8 µm a aproximadamente 1,6 µm, ou de aproximadamente 0,9 µm a aproximadamente 1,4 µm, ou de aproximadamente 1,0 µm a aproximadamente 2,0 µm, ou de aproximadamente 1,0 µm a aproximadamente 1,8 µm, ou quaisquer faixas estreitas entre as faixas específicas descritas acima.

[00145] Em algumas modalidades dos métodos presentemente descritos, pelo menos 60%, 65%, 70, 75%, 80%, 90%, ou 95% das micropartículas têm um diâmetro médio volumétrico de aproximadamente 0,6 µm a aproximadamente 2,5 µm. Em algumas modalidades, substancialmente todas as micropartículas têm um VMD de aproximadamente 0,6 µm a aproximadamente 2,5 µm. Em algumas modalidades, pelo menos 70% das partículas submetidas à aerossolização têm um MMAD de aproximadamente 0,9 µm a aproximadamente 3 µm. Em algumas modalidades, a composição é uma suspensão de micropartículas que têm um diâmetro volumétrico médio (VMD) de aproximadamente 0,6 µm a aproximadamente 2,5 µm e/ou um diâmetro aerodinâmico mediano de massa (MMAD) de aproximadamente 0,9 µm a aproximadamente 3 µm. Em algumas modalidades, a composição de bismuto-tiol compreende uma pluralidade de micropartículas que compreendem um composto de bismuto-tiol (BT), em que substancialmente todas as ditas micropartículas têm um diâmetro volumétrico médio de aproximadamente 0,4 µm a aproximadamente 5 µm, e em que o composto de BT compreende bismuto ou um sal de bismuto e um composto que contém tiol.

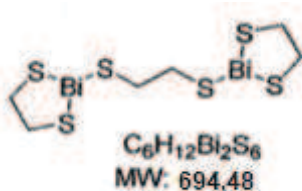
[00146] Em algumas modalidades, a composição de BT compreende um ou mais compostos de BT selecionados dentre

bismuto-2,3-dimercaptopropanol (razão molar 2:3, BisBAL)
bismuto-ditioeritritol (razão molar 2:3, BisERY)
bismuto-4-metil-1,2-benzenoditiol (razão molar 2:3, BisTOL)
bismuto-2,3-butanoditiol (BisBDT)
bismuto-2,3-butanoditiol, N-óxido de 2-mercaptopiridina (razão molar 2:1:2, BisBDT/PYR)
bismuto-2,3-dimercaptopropanol, N-óxido de 2-mercaptopiridina (razão molar 2:1:2, BisBAL/PYR)
bismuto-1,2-etanoditiol, N-óxido de 2-mercaptopiridina (razão molar 2:1:2, BisEDT/PYR)
bismuto-4-metil-1,2-benzenoditiol, N-óxido de 2-mercaptopiridina (razão molar 2:1:2, BisTOL/PYR)
bismuto-1,3-propanoditiol, N-óxido de 2-mercaptopiridina (razão molar 2:1:2, BisPDT/PYR)
bismuto-ditioeritritol, N-óxido de 2-mercaptopiridina (razão molar 2:1:2, BisERY/PYR)
bismuto-1-mercapto-2-propanol, 1,2-etanoditiol (razão molar 1:1:1, BisHPT/EDT)
bismuto com etanoditiol e 2-mercaptopbenzoimidazol (BisEDT/2MBI (1:1))
bismuto com etanoditiol e 2-mercaptopirimidina (BisEDT/SPN (2MPMD) (1:1))
bismuto com etanoditiol e 3-mercapto-1,2,4-triazol (BisEDT/3MTZ (1:1))
bismuto com etanoditiol e 1-propanotiol (BisEDT/PT (1:1))
bismuto com etanoditiol e cisteamina (BisEDT/CSTMN (1:1))
bismuto com etanoditiol e ácido 3-mercaptopropiônico (BisEDT/3MPA (1:1))
bismuto com ácido lipoico (reduzido) (BisALA (BisLipo) (1:1,5))
bismuto com N-óxido de 2-mercaptolpiridina e 2-mercaptopbenzoimidazol (BisPYR/2MBI (1:1))
bismuto com N-óxido de 2-mercaptolpiridina e cisteamina (BisPYR/CSTMN (1:1))
bismuto com 2,3-dimercapto-1-propanol e 2-mercaptopbenzoimidazol (BisBAL/2MBI (1:1))
bismuto com 2,3-dimercapto-1-propanol e cisteamina (BisBAL/CSTMN (1:1))
bismuto com 3,4 dimercapto tolueno e 2-mercaptopbenzoimidazol (BisTOL/2MBI (1:1))
bismuto com 3,4 dimercaptotolueno e cisteamina (BisTOL/CSTMN (1:1))
bismuto com 2-mercaptopiridina (BisEDT/MPYR)

[00147] Em algumas modalidades, a composição de BT compreen-

de um ou mais compostos de BT selecionados dentre Bis-BAL, Bis-EDT, Bis-dimercaprol, Bis-DTT, Bis-2-mercaptoetanol, Bis-DTE, Bis-Pyr, Bis-Ery, Bis-Tol, Bis-BDT, Bis-PDT, Bis-Pyr/Bal, Bis-Pyr/BDT, Bis-Pyr/EDT, Bis-Pyr/PDT, Bis-Pyr/Tol, Bis-Pyr/Ery, bismuto-1-mercapto-2-propanol, e Bis-EDT/2-hidróxi-1-propanotiol. Em outras modalidades, o composto de BT é selecionado dentre um ou mais de Bis-EDT, Bis-Bal, Bis-Pyr, Bis-Ery, Bis-Tol, Bis-BDT, ou Bis-EDT/2-hidróxi-1-propano tiol. Conforme usado no presente documento, MB-1B3 (ou MB-1-B3) se refere a BisEDT; MB-6 se refere a BisBDT; MB-8-2 se refere a BisBDT/PYR; e MB-11 se refere a BisEDT/PYR.

[00148] Em algumas modalidades, o composto de bismuto-tiol é BisEDT, que tem a seguinte estrutura:



TRATAMENTOS DE COMBINAÇÃO

[00149] Em certas modalidades, os compostos descritos no presente documento podem ser usados individualmente ou conjuntamente administrados com outro tipo de agente terapêutico. Conforme usado no presente documento, a expressão "administração conjunta" se refere a qualquer forma de administração de dois ou mais compostos terapêuticos diferentes de modo que o segundo composto seja administrado enquanto o composto terapêutico anteriormente administrado ainda seja eficaz no corpo (*por exemplo*, os dois compostos são simultaneamente eficazes no indivíduo). Por exemplo, os compostos terapêuticos diferentes podem ser administrados na mesma formulação ou em uma formulação separada, concomitante ou sequencialmente. Em certas modalidades, os compostos terapêuticos diferentes podem ser administrados em uma hora, 12 horas, 24 horas, 36 horas, 48 horas,

72 horas, ou uma semana de intervalo. Desse modo, um indivíduo que recebe tal tratamento pode se beneficiar de um efeito combinado de compostos terapêuticos diferentes.

[00150] Em certas modalidades, a administração conjunta de compostos da invenção com um ou mais agentes terapêuticos adicionais fornece a eficácia melhorada em relação a cada administração individual do composto da invenção ou o um ou mais agentes terapêuticos adicionais. Em certas tais modalidades, a administração conjunta fornece um efeito aditivo ou efeito sinérgico, em que um efeito aditivo se refere à soma de cada um dos efeitos de administração individual do composto da invenção e o um ou mais agentes terapêuticos adicionais. Em algumas modalidades, o indivíduo recebe a administração conjunta de uma terapia para outra doença, distúrbio, ou afecção. Em algumas modalidades, a outra terapia é um modulador ou broncodilatador de CFTR.

[00151] Em algumas modalidades, os métodos da presente invenção compreendem adicionalmente coadministrar ou administrar em conjunto ao indivíduo um antibiótico selecionado dentre amicacina, tobramicina, gentamicina, piperacilina, mezlocilina, ticarcilina, imipenem, ciprofloxacina, ceftazidima, aztreonam, ticarcilina-clavulanato, dicloxacilina, amoxicilina, ticarcilina-clavulanato, trimetoprim-sulfametoxazol, cefalexina, piperacilina-tazobactam, linezolida, daptomicina, vancomicina, metronidazol, clindamicina, colistina, tetraciclina, levofloxacina, amoxicilina e ácido clavulânico (Augmentin®), cloxacilina, dicloxacilina, cefdinir, cefprozil, cefaclor, cefuroxima, eritromicina/sulfisoxazol, eritromicina, claritromicina, azitromicina, doxiciclina, minociclina, tigeciclina, imipenem, meropenem, colistimetato/colistina®, meticilina, oxacilina, nafcilina, carbenicilina, azlocilina, piperacilina e tazobactam (Zosyn®), cefepima, etambutol, rifampicina, e meropenem. Em algumas modalidades, o antibiótico é selecionado dentre meropenem, ceftazidima, to-

bramicina, amicacina, aztreonam, ciprofloxacina, colistina e levofloxacina.

[00152] Em certas modalidades da presente invenção, os agentes terapêuticos que podem ser conjuntamente administrados com compostos da invenção, como um composto de bismuto-tiol, incluem antibióticos conhecidos. Em algumas modalidades, o antibiótico é selecionado dentre meticilina, vancomicina, nafcilina, gentamicina, ampicilina, cloramfenicol, doxiciclina, colistina, amicacina, aztreonam, e tobramicina. Em algumas modalidades, o antibiótico é selecionado dentre tobramicina, imipenem, tetraciclina e minociclina. Em algumas modalidades, o antibiótico é administrado de modo sistêmico após a cirurgia de revisão. Em algumas modalidades, o antibiótico é administrado antes da cirurgia de revisão. O agente terapêutico conjuntamente administrado, como um antibiótico, pode ser administrado com qualquer frequência adequada e em qualquer dosagem adequada. Tal quantidade e frequência de dosagem podem ser determinadas por aqueles de habilidade comum na técnica.

[00153] Em certas modalidades, os compostos de BT da invenção podem ser conjuntamente administrados com um ou mais outros compostos de BT da invenção. Ademais, tais combinações podem ser conjuntamente administradas com outros agentes terapêuticos.

COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS

[00154] As composições e os métodos da presente invenção podem ser utilizados para tratar um indivíduo que necessita do mesmo. Em certas modalidades, o indivíduo é um mamífero, como um ser humano, ou um mamífero não humano. Quando administrado ao indivíduo, como um ser humano, a composição ou o composto é preferencialmente administrado como uma composição farmacêutica que compreende, por exemplo, um composto da invenção e um carreador farmacêuticamente aceitável. Os carreadores farmacêuticamente aceitá-

veis são bem conhecidos na técnica e incluem, por exemplo, soluções aquosas, como água, solução salina fisiologicamente tamponada, fosfato fisiologicamente tamponado, ou outros solventes ou veículos, como glicóis, glicerol, óleos, como óleo de oliva, ou ésteres orgânicos injetáveis. Em algumas modalidades, quando tais composições farmacêuticas são para administração humana, a solução aquosa é livre de pirogênio, ou substancialmente livre de pirogênio. Os excipientes podem ser escolhidos, por exemplo, para efetuar a liberação atrasada de um agente ou para alvejar seletivamente uma ou mais células, tecidos ou órgãos. A composição farmacêutica pode estar em forma unitária de dosagem, como liófilo para reconstituição, pó, solução, xarope, injeção ou semelhantes. A composição também pode estar presente em uma solução adequada para administração tópica.

[00155] Um carreador farmacêuticamente aceitável pode conter agentes fisiologicamente aceitáveis que atuam, por exemplo, para estabilizar, aumentar a solubilidade ou aumentar a absorção de um composto, como um composto da invenção. Tais agentes fisiologicamente aceitáveis incluem, por exemplo, carboidratos, como glicose, sacarose, ou dextranos; antioxidantes, como ácido ascórbico ou glutatona; agentes quelantes; proteínas de baixo peso molecular; sais; ou outros estabilizantes ou excipientes. A escolha de um carreador farmacêuticamente aceitável, incluindo um agente fisiologicamente aceitável, depende, por exemplo, da via de administração da composição. A preparação ou composição farmacêutica pode ser um sistema de distribuição de fármaco autoemulsificante ou um sistema de distribuição de fármaco automicroemulsificante. A composição farmacêutica (preparação) também pode ser um lipossomo ou outra matriz polimérica, que pode ter incorporada a mesma, por exemplo, um composto da invenção. Lipossomos, por exemplo, que compreendem fosfolipídios ou outros lipídios, são carreadores não tóxicos, fisiologicamente aceitáveis e

metabolizáveis que são relativamente simples de produzir e administrar.

[00156] A expressão "farmaceuticamente aceitável" é empregada no presente documento para se referir àqueles compostos, materiais, composições, e/ou formas de dosagem que são, dentro do escopo de opinião clínica confiável, adequados para uso em contato com os tecidos de um indivíduo sem toxicidade excessiva, irritação, resposta alérgica, ou outro problema ou complicação, comensurável com uma razão de benefício/risco razoável.

[00157] A expressão "carreador farmaceuticamente aceitável" conforme usado no presente documento significa um material, composição ou veículo farmaceuticamente aceitável, como uma carga, diluente, excipiente, solvente ou material encapsulante líquido ou sólido. Cada carreador deve ser "aceitável" no sentido de ser compatível com os outros ingredientes da formulação e não prejudiciais ao indivíduo. Alguns exemplos de materiais que podem servir como carreadores farmaceuticamente aceitáveis incluem: (1) açúcares, como lactose, glicose e sacarose; (2) amidos, como amido de milho e amido de batata; (3) celulose, e seus derivados, como carboximetil celulose sódica, metil celulose e acetato de celulose; (4) tragacanto em pó; (5) malte; (6) gelatina; (7) talco; (8) excipientes, como manteiga de cacau e ceras de supositório; (9) óleos, como óleo de amendoim, óleo de semente de algodão, óleo de açafrão, óleo de gergelim, óleo de oliva, óleo de milho e óleo de soja; (10) glicóis, como propileno glicol; (11) polióis e álcoois sacarinos, como glicerina, sorbitol, manitol, xilitol, eritritol, e polietileno glicol; (12) ésteres, como oleato de etila e etil laurato; (13) ágar; (14) agentes tamponantes, como hidróxido de magnésio e hidróxido de alumínio; (15) ácido algínico; (16) água livre de pirogênio; (17) solução salina isotônica; (18) solução de Ringer; (19) álcool etílico; (20) soluções de tampão fosfato; e (21) outras substâncias compati-

veis não tóxicas, incluindo sais, como cloreto de sódio, empregadas em formulações farmacêuticas.

[00158] As formulações podem ser convenientemente apresentadas em forma de dosagem unitária e podem ser preparadas por quaisquer métodos bem conhecidos na técnica de farmácia. A quantidade de ingrediente ativo que pode ser combinada com material carreador para produzir uma forma de dosagem única variará dependendo do indivíduo em tratamento, do modo particular de administração. A quantidade de ingrediente ativo que pode ser combinada com um material carreador para produzir uma forma de dosagem única será geralmente aquela quantidade do composto que produz um efeito terapêutico.

[00159] Em algumas modalidades, a composição de BT é um pó, aspersão, pomada, pasta, creme, loção, solução, emplastro, suspensão ou gel. Em algumas modalidades, a composição de BT é uma solução. A composição de BT pode compreender qualquer concentração adequada de composto de bismuto-tiol. Em algumas modalidades, a composição de BT é administrada como uma dosagem de aproximadamente 0,25 mg/ml a aproximadamente 15 mg/ml, de aproximadamente 0,4 mg/ml a aproximadamente 15 mg/ml, de aproximadamente 0,6 mg/ml a aproximadamente 15 mg/ml, de aproximadamente 0,6 mg/ml a aproximadamente 100 mg/ml, de aproximadamente 5 mg/ml a aproximadamente 100 mg/ml, de aproximadamente 10 mg/ml a aproximadamente 100 mg/ml, de aproximadamente 25 mg/ml a aproximadamente 100 mg/ml, de aproximadamente 50 mg/ml a aproximadamente 100 mg/ml, de aproximadamente 0,8 mg/ml a aproximadamente 15 mg/ml, de aproximadamente 1 mg/ml a aproximadamente 10 mg/ml, de 2,5 mg/ml a aproximadamente 10 mg/ml, de aproximadamente 4 mg/ml a aproximadamente 10 mg/ml, de aproximadamente 5 mg/ml a aproximadamente 10 mg/ml, de aproximadamente 6 mg/ml a aproximadamente 10 mg/ml, 0,6 mg/ml a aproximadamente 6 mg/ml,

de aproximadamente 4 mg/ml a aproximadamente 15 mg/ml, de aproximadamente 6 mg/ml a aproximadamente 15 mg/ml, de aproximadamente 50 µg/ml a aproximadamente 750 µg/ml, de aproximadamente 75 µg/ml a aproximadamente 500 µg/ml, de aproximadamente 100 µg/ml a aproximadamente 250 µg/ml, de aproximadamente 100 µg/ml a aproximadamente 150 µg/ml, ou de aproximadamente 75 µg/ml a aproximadamente 150 µg/ml; e/ou a quantidade total da composição de BT administrada aos pulmões é de aproximadamente 0,25 mg a aproximadamente 15 mg, de aproximadamente 0,4 mg a aproximadamente 15 mg, de aproximadamente 0,6 mg a aproximadamente 15 mg, de aproximadamente 0,8 mg a aproximadamente 15 mg, de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 10 mg, de 2,5 mg a aproximadamente 10 mg, de aproximadamente 4 mg a aproximadamente 10 mg, de aproximadamente 5 mg a aproximadamente 10 mg, de aproximadamente 6 mg a aproximadamente 10 mg, 0,6 mg a aproximadamente 6 mg, de aproximadamente 4 mg a aproximadamente 15 mg, de aproximadamente 6 mg a aproximadamente 15 mg, de aproximadamente 50 µg a aproximadamente 750 µg, de aproximadamente 75 µg a aproximadamente 500 µg, de aproximadamente 100 µg a aproximadamente 250 µg, de aproximadamente 100 µg a aproximadamente 150 µg, ou de aproximadamente 75 µg a aproximadamente 150 µg. Em certas modalidades, a composição de BT é administrada como uma dosagem de aproximadamente 0,6 mg/ml a aproximadamente 6 mg/ml.

[00160] Em algumas modalidades, a composição de BT é administrada três vezes ao dia, duas vezes ao dia, uma vez ao dia, a cada dois dias, uma vez a cada três dias, uma vez por semana, uma vez a cada duas semanas uma vez por mês até uma vez a cada dois meses. Em certas modalidades, a composição de BT é administrada uma vez ao dia. Em certas modalidades, a composição de BT é administrada uma vez por semana. Em certas modalidades, a composição de BT é

administrada uma vez a cada duas semanas. Em algumas modalidades, a composição de BT é administrada de modo crônico em um cronograma de dosagem de 4 semanas sim/4 semanas não. Em algumas modalidades, a composição de BT é administrada de modo crônico, por exemplo, como parte de uma terapia de fundo. Conforme será observado por uma pessoa que tem habilidade comum na técnica, a frequência de administração pode depender de vários fatores incluindo dose e via de administração. Por exemplo, se a composição de BT é administrada por meio de uma administração de aerossol, uma baixa dose, como 100 a 1.000 µg/ml pode ser administrada uma vez ou duas vezes por dia; entretanto, uma alta dose, como 2,5 a 10 mg/ml pode ser administrada, por exemplo, uma ou duas vezes por semana.

[00161] Em algumas modalidades, a composição de BT compreende adicionalmente um ou mais carreadores selecionados dentre gorduras animal e vegetal, óleos, ceras, parafinas, amido, tragacanto, derivados de celulose, polietileno glicóis, silicones, bentonitas, ácido silícico, polímeros, talco, e óxido de zinco. Em algumas modalidades, o carreador é metilcelulose. Em algumas modalidades, o carreador é poli(metil metacrilato).

[00162] As composições também podem ser formuladas de modo a fornecer liberação lenta ou controlada do ingrediente ativo no mesmo com o uso de, por exemplo, hidroxipropilmetil celulose em proporções variáveis para fornecer o perfil de liberação desejável, outras matrizes poliméricas, lipossomos e/ou microesferas. Os mesmos podem ser esterilizados por, por exemplo, filtração através de um filtro de retenção de bactérias, por radiação de ionização (fótons gama, por exemplo), autoclave, ou incorporando-se agentes de esterilização na forma de composições sólidas estéreis que podem ser dissolvidas em água estéril, ou algum outro meio injetável estéril imediatamente antes do uso.

[00163] As formas de dosagem líquida úteis para administração tópica incluem emulsões farmacologicamente aceitáveis, líofilos para reconstituição, microemulsões, soluções, suspensões, géis, xaropes e elixires. Além do ingrediente ativo, as formas de dosagem líquida podem conter diluentes inertes comumente usados na técnica, como, por exemplo, água ou outros solventes, ciclodextrinas e derivados dos mesmos, agentes solubilizantes e emulsificantes, como álcool etílico, álcool isopropílico, carbonato de etila, acetato de etila, álcool benzílico, benzoato de benzila, propileno glicol, 1,3-butileno glicol, óleos (como óleos de semente de algodão, amendoim, milho, germe, oliva, rícino e gergelim), glicerol, álcool tetra-hidrofurfílico, polietileno glicóis e ésteres de ácido graxo de sorbitano, e misturas dos mesmos. Além de diluentes inertes, as composições tópicas também podem incluir adjuvantes, como agentes umectantes, agentes emulsificantes e de suspensão, e agentes conservantes.

[00164] Suspensões, além dos compostos ativos, podem conter agentes de suspensão, como, por exemplo, álcoois isostearílicos etoxilados, polioxietileno sorbitol e ésteres de sorbitano, celulose microcristalina, meta-hidróxido de alumínio, bentonite, ágar-ágar e tragacanto, e misturas dos mesmos.

[00165] As formas de dosagem para a administração tópica ou transdérmica incluem pós, aspersões, pomadas, pastas, cremes, loções, géis, soluções, emplastos e inalantes. O composto ativo pode ser misturado sob condições estéreis com um carreador farmacologicamente aceitável, e com quaisquer conservantes ou tampões que podem ser necessários.

[00166] As pomadas, pastas, cremes e géis podem conter, além de um composto ativo, um ou mais excipientes ou carreadores, como gorduras animais e vegetais, óleos, ceras, parafinas, amido, tragacanto, derivados de celulose, polietileno glicóis, silicones, bentonitas, áci-

do silícico, talco, polímeros, sais, e óxido de zinco, ou misturas dos mesmos. Em algumas modalidades, a composição de BT está na forma de uma solução aquosa. Em algumas modalidades, o excipiente compreende um sal selecionado dentre cloreto de sódio ou cloreto de potássio. Em algumas modalidades, o excipiente compreende cloreto de sódio.

[00167] Em certas modalidades, a composição de BT é uma suspensão de um ou mais compostos de BT em Tween (por exemplo, Tween 80) e/ou em um tampão (por exemplo, tampão de fosfato de sódio). Por exemplo, em algumas modalidades, a composição de BT é uma suspensão de um ou mais compostos de BT em Tween 80 de aproximadamente 0,1% a Tween 80 de aproximadamente 1,0%, incluindo todas as faixas entre os mesmos. Por exemplo, a composição de BT é uma suspensão de um ou mais compostos de BT em Tween 80 de aproximadamente 0,1%, Tween 80 de aproximadamente 0,2%, Tween 80 de aproximadamente 0,3%, Tween 80 de aproximadamente 0,4%, Tween 80 de aproximadamente 0,5%, Tween 80 de aproximadamente 0,6%, Tween 80 de aproximadamente 0,7%, Tween 80 de aproximadamente 0,8%, Tween 80 de aproximadamente 0,9%, ou Tween 80 de aproximadamente 1%. Em algumas modalidades, a composição de BT é uma suspensão de um ou mais compostos de BT em aproximadamente Tween 80 0,5%.

[00168] Em uma modalidade específica, a presente invenção pode ser a composição farmacêutica que compreende bismuto-tiol (BT) composição que compreende BisEDT suspenso na mesma, em que a composição de BT compreende uma pluralidade de micropartículas. Em uma modalidade específica, o D90 das referidas micropartículas é inferior ou igual a 4,5 μm , ou 4,0 μm , ou 3,5 μm , ou 3,0 μm , ou 2,5 μm , ou 2,0 μm , ou 1,9 μm , ou 1,8 μm , ou μm 1,7 μm , ou 1,6 μm , ou 1,5 μm ou quaisquer faixas entre os mesmos. Em uma modalidade específica,

o D90 das referidas micropartículas é inferior ou igual a 1,9 µm. Em outra modalidade específica, o D90 das referidas micropartículas é inferior ou igual a 1,6 µm. Em outra modalidade específica, o D50 das referidas micropartículas é inferior ou igual a 2,5 µm, ou 2,0 µm, ou 1,5 µm, ou 1,3 µm, ou 1,2 µm, ou 1,1 µm, ou 1,0 µm, ou 0,9 µm, ou 0,87 µm, ou 0,72 µm ou quaisquer faixas entre os mesmos. Em outra modalidade específica, o D10 das referidas micropartículas é inferior ou igual a 0,9 µm, ou 0,8 µm, ou 0,7 µm, ou 0,6 µm, ou 0,50 µm, ou 0,40 µm, ou 0,39 µm, ou 0,38 µm, ou 0,37 µm, ou 0,36 µm, ou 0,35 µm, ou 0,34 µm, ou 0,33 µm, ou quaisquer faixas entre os mesmos. Em uma modalidade específica, a composição farmacêutica que compreende a composição de bismuto-tiol (BT) compreende BisEDT suspenso na mesma, sendo que a composição de BT compreende uma pluralidade de micropartículas, em que o D90 das referidas micropartículas é inferior ou igual a aproximadamente 1,6 µm. Em uma modalidade específica, a composição de BT compreende BisEDT a uma concentração superior a aproximadamente 0,1 mg/ml, Tween 80® a aproximadamente 0,05% a aproximadamente 1,0%, cloreto de sódio a aproximadamente 0,05 a 40 mM e, opcionalmente, fosfato de sódio a aproximadamente 2 a 20 mM a aproximadamente pH 7,4. Em outra modalidade específica, as composições descritas acima podem ser administradas a um indivíduo para tratar, gerir e/ou atenuar a gravidade de sintomas e infecções de fibrose cística (CF) no referido indivíduo, ou qualquer método específico para tratar, gerir e/ou atenuar a gravidade de sintomas de fibrose cística (CF) descritos no presente documento. Em outra modalidade específica, as composições descritas acima podem ser administradas a um indivíduo para tratar, gerir e/ou atenuar a gravidade e sintomas e infecções associados a uma ou mais doenças ou infecções pulmonares em um indivíduo ou qualquer método específico para tratar, gerir e/ou atenuar a gravidade de sintomas e infecções as-

sociados a uma ou mais doenças pulmonares descritas no presente documento.

[00169] A variedade de tampões pode ser usada no contexto da presente invenção e será prontamente evidente para uma pessoa que tem habilidade comum na técnica. Por exemplo, em algumas modalidades, tampões adequados incluem citrato de sódio ou potássio, ácido cítrico, tampões fosfato, como fosfato de sódio, ácido bórico, bicarbonato de sódio e vários tampões fosfato misturados incluindo combinações de Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4 e KH_2PO_4 . Em algumas modalidades, o tampão de fosfato de sódio é usado. Em algumas modalidades, tampão citrato de sódio é usado. Sem se atrelar a qualquer teoria particular, mudanças no pH de líquido de superfície de via respiratória podem contribuir para o defeito de defesa de hospedeiro em fibrose cística logo após o nascimento. As mudanças no pH do pulmão podem impactar o ambiente de líquido de superfície de via respiratória, melhorar as defesas de via respiratória, e alterar o curso da doença. Consequentemente, o pH de formulação pode variar de aproximadamente 5 a aproximadamente 10. Em algumas modalidades, o pH de formulação é aproximadamente 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8,0, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9,0, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9, ou aproximadamente 10. Em algumas modalidades, o pH de formulação é aproximadamente 7,4.

[00170] Em algumas modalidades, a composição de BT é uma suspensão de um ou mais compostos de BT em aproximadamente Tween 80 0,5% em tampão de fosfato de sódio a um pH de cerca de 7,4. Em algumas modalidades, o um ou mais compostos de BT estão presentes na composição a uma concentração na faixa de aproximadamente 100 µg/ml a aproximadamente 1.000 mg/ml incluindo todos os números inteiros e faixas entre os mesmos. Por exemplo, em algumas mo-

dalidades, o um ou mais compostos de BT estão presentes na composição a uma concentração na faixa de aproximadamente 100 µg/ml, 200 µg/ml, 300 µg/ml, 400 µg/ml, 500 µg/ml, 600 µg/ml, 700 µg/ml, 800 µg/ml, 900 µg/ml, 1.000 µg/ml, 10 mg/ml, 25 mg/ml, 50 mg/ml, 100 mg/ml, 125 mg/ml, 150 mg/ml, 175 mg/ml, 200 mg/ml, 225 mg/ml, 250 mg/ml, 275 mg/ml, 300 mg/ml, 325 mg/ml, 350 mg/ml, 375 mg/ml, 400 mg/ml, 425 mg/ml, 450 mg/ml, 475 mg/ml, 500 mg/ml, 525 mg/ml, 550 mg/ml, 575 mg/ml, 600 mg/ml, 625 mg/ml, 650 mg/ml, 675 mg/ml, 700 mg/ml, 725 mg/ml, 750 mg/ml, 775 mg/ml, 800 mg/ml, 825 mg/ml, 850 mg/ml, 875 mg/ml, 900 mg/ml, 925 mg/ml, 950 mg/ml, 975 mg/ml, a aproximadamente 1.000 mg/ml. Em algumas modalidades, o um ou mais compostos de BT estão presentes na composição a uma concentração na faixa de aproximadamente 100 µg/ml a aproximadamente 1.000 µg/ml.

[00171] Em algumas modalidades, a osmolalidade de composição pode precisar ser adicionalmente ajustada com um aditivo, como NaCl ou TDAPS para alcançar uma osmolalidade desejável. Por exemplo, em algumas modalidades, a osmolalidade da composição é ajustada com cloreto de sódio a uma osmolalidade na faixa de aproximadamente 100 mOsmol/kg a aproximadamente 500 mOsmol/kg, incluindo todos os números inteiros e faixas entre os mesmos. Em algumas modalidades, a osmolalidade da composição é de aproximadamente 290 mOsmol/kg a aproximadamente 310 mOsmol/kg. Por exemplo, em algumas modalidades, a osmolalidade da composição é aproximadamente 290 mOsmol/kg, 291 mOsmol/kg, 292 mOsmol/kg, 293 mOsmol/kg, 294 mOsmol/kg, 295 mOsmol/kg, 296 mOsmol/kg, 297 mOsmol/kg, 298 mOsmol/kg, 299 mOsmol/kg, 300 mOsmol/kg, 301 mOsmol/kg, 302 mOsmol/kg, 303 mOsmol/kg, 304 mOsmol/kg, 305 mOsmol/kg, 306 mOsmol/kg, 307 mOsmol/kg, 308 mOsmol/kg, 309 mOsmol/kg, a aproximadamente 310 mOsmol/kg. Em algumas modalida-

des, a osmolalidade é aproximadamente 300 mOsmol/kg.

[00172] Em algumas modalidades, a composição de BT é uma suspensão de BisEDT em Tween (por exemplo, Tween 80) em um tampão (por exemplo tampão de fosfato de sódio). Em algumas modalidades, a composição de BT é uma suspensão de BisEDT em aproximadamente de Tween 80 0,5% em um tampão de fosfato de sódio a um pH de aproximadamente 7,4. Em algumas modalidades, a composição de BT é uma suspensão de BisEDT em aproximadamente Tween 80 0,5% em um tampão de fosfato de sódio a um pH de cerca de 7,4, em que a composição tem uma osmolalidade de aproximadamente 300 mOsmol/kg (por exemplo, ajustado para 300 mOsmol/kg com cloreto de sódio). Em algumas modalidades, o BisEDT está presente em uma concentração de aproximadamente 100 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml, 750 µg/ml, 1.000 µg/ml, 2,5 mg/ml, 10 mg/ml, 25 mg/ml, 50 mg/ml, 75 mg/ml, ou de aproximadamente 100 mg/ml.

[00173] Em algumas modalidades, a composição de BT é uma formulação de suspensão que é destinada à distribuição pulmonar. Por exemplo, a composição de BT é uma formulação de suspensão que é finalmente administrada por inalação por via oral e/ou nasal. Consequentemente, em algumas modalidades, a composição de BT é submetida à aerossolização por um dispositivo como um nebulizado.

[00174] Os pós e aspersões podem conter, além de um composto ativo, excipientes, como metilcelulose, cloreto de sódio, PMMA, lactose, talco, ácido silícico, hidróxido de alumínio, silicatos de cálcio e pó de poliamida, dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), leucina, polietilenoglicol, ou misturas destas substâncias. As aspersões podem conter adicionalmente impulsores costumeiros, como clorofluoro-hidrocarbonetos e hidrocarbonetos não substituídos voláteis, como butano e propano.

[00175] Em algumas modalidades, a composição de BT é adminis-

trada por inalação, por via oral ou nasal, com o uso de um dispositivo de aerossol, como um nebulizador. Os nebulizadores conhecidos, como PARI IC Plus, podem administrar as composições descritas como uma solução aquosa, opcionalmente em solução salina tamponada. A solução pode ser fornecida ao indivíduo na forma de uma ampola para uso no nebulizador. O nebulizador pode ser reusável e inclui um compressor que fornece a formulação por um período de tempo, como cerca de 10 a 15 minutos ou mais. Os compressores conhecidos, como APRI Vios Air e DeVilbiss Pulmo-aide, são adequados para administração. O nebulizador administra a formulação por via tópica aos tecidos pulmonares, como mucosa, os brônquios e/ou os bronquíolos, alvéolos, alvéolos pulmonares profundos. A formulação pode penetrar a mucosa do pulmão e biofilmes para reduzir o biofilme microbiano (por exemplo, bacteriano ou fúngico), conferir o crescimento do biofilme microbiano (por exemplo, bacteriano ou fúngico), impedir a reformulação do biofilme microbiano (por exemplo, bacteriano ou fúngico), reduzir o crescimento planctônico e/ou inibir o crescimento planctônico.

[00176] Em outras modalidades, um dispositivo de aerossol apenas nasal pode ser usado para administração da formulação.

[00177] Uma formulação de composição de BT exemplificativa é uma solução de pH neutro, isotônica, aquosa tamponada de micropartículas de composto de BT com um tensoativo não iônico. Em certas modalidades, o tampão é um tampão de fosfato com NaCl adicionado. Em algumas modalidades, o tamanho de micropartícula é um D_{50} de aproximadamente 1 a 5 μm . A formulação pode ser distribuída com o uso de nebulizador de jato de ar comprimido comercialmente disponível. Em algumas modalidades, a concentração de formulação é cerca de 0,1 $\mu\text{g/ml}$ a aproximadamente 100 mg/ml .

[00178] Em algumas modalidades, a presente invenção fornece um aerossol que compreende uma pluralidade de gotículas líquidas dis-

persas em um gás, em que as referidas gotículas líquidas compreendem uma composição de BT que compreende pelo menos um composto de BT suspenso na mesma, em que o composto de BT compreende bismuto e/ou um sal de bismuto e um composto que contém tiol; e em que pelo menos 60%, 65%, 70, 75%, 80%, 90%, ou 95% das gotículas líquidas têm um diâmetro aerodinâmico mediano de massa (MMAD) de aproximadamente 0,4 μm a aproximadamente 5 μm quando medido pelo tempo de voo do laser e/ou impactador em cascata. Em algumas modalidades, pelo menos 60%, 65%, 70, 75%, 80%, 90% ou 95% das gotículas líquidas têm um MMAD de aproximadamente 0,4 μm a aproximadamente 7 μm , ou de aproximadamente 0,5 μm a aproximadamente 5 μm , ou de aproximadamente 0,7 μm a aproximadamente 4 μm , ou de aproximadamente 0,7 μm a aproximadamente 3,5 μm , ou de aproximadamente 0,8 μm a aproximadamente 3,5 μm , ou de aproximadamente 0,9 μm a aproximadamente 3,5 μm , ou de aproximadamente 0,9 μm a aproximadamente 3 μm , ou de aproximadamente 0,8 μm a aproximadamente 1,8 μm , ou de aproximadamente 0,8 μm a aproximadamente 1,6 μm , ou de aproximadamente 0,9 μm a aproximadamente 1,4 μm , ou de aproximadamente 1,0 μm a aproximadamente 2,0 μm , ou de aproximadamente 1,0 μm a aproximadamente 1,8 μm , incluindo todas as faixas entre os mesmos. Em algumas modalidades, pelo menos 60%, 65%, 70, 75%, 80%, 90%, ou 95% das gotículas líquidas têm um MMAD de aproximadamente 0,8 μm a aproximadamente 1,6 μm , ou de aproximadamente 0,9 μm a aproximadamente 3,5 μm , ou de aproximadamente 0,9 μm a aproximadamente 3 μm , ou de aproximadamente 0,9 μm a aproximadamente 1,4 μm , ou de aproximadamente 1,0 μm a aproximadamente 2,0 μm , ou de aproximadamente 1,0 μm a aproximadamente 1,8 μm , e todas as faixas entre os mesmos.

[00179] Em algumas modalidades, a pluralidade de gotículas líqui-

das tem um D90 inferior a aproximadamente 10 μm . Por exemplo, em algumas modalidades, a pluralidade de gotículas líquidas tem um D90 inferior a aproximadamente 10 μm , 9 μm , 8 μm , 7 μm , 6 μm , 5 μm , 4 μm , 3 μm , 2 μm , ou aproximadamente 1 μm . Em algumas modalidades, a pluralidade de gotículas líquidas tem um D90 inferior a aproximadamente 3 μm . Em algumas modalidades, a pluralidade de gotículas líquidas tem um D90 na faixa de aproximadamente 1 μm a aproximadamente 5 μm , ou cerca de 2 μm a aproximadamente 6 μm , ou cerca de 2 μm a aproximadamente 4 μm , ou cerca de 2 μm a aproximadamente 3 μm , ou cerca de 1 μm a aproximadamente 4 μm , ou cerca de 1 μm a aproximadamente 3 μm .

[00180] Em algumas modalidades, a pluralidade de gotículas líquidas é dispersa em uma fase de gás contínuo.

[00181] Em algumas modalidades, o composto de BT do aerossol compreende bismuto e/ou um sal de bismuto covalentemente associado e/ou em um complexo de coordenação com um ou mais compostos que contêm tiol. Por exemplo, o sal de bismuto é nitrato de bismuto, subnitrato de bismuto, ou cloreto de bismuto. Em algumas modalidades, o composto que contém tiol compreende um ou mais agentes selecionados dentre 1,2-etano ditiol, 2,3-dimercaptopropanol, piritiona, ditioeritritol, 3,4 dimercaptotolueno, 2,3-butanoditiol, 1,3-propanoditiol, 2-hidroxipropanotiol, 1-mercaptop-2-propanol, ditioeritritol, ditiotreitól e ácido alfa-lipoico. Em algumas modalidades, a composição de BT compreende um ou mais compostos de BT selecionados dentre Bis-BAL, BisEDT, Bis-dimercaprol, BisDTT, Bis-2-mercaptopetanol, Bis-DTE, Bis-Pyr, Bis-Ery, Bis-Tol, Bis-BDT, Bis-PDT, Bis-Pyr/Bal, Bis-Pyr/BDT, BisPyr/EDT, Bis-Pyr/PDT, Bis-Pyr/Tol, Bis-Pyr/Ery, bismuto-1-mercaptop-2-propanol, BisEDT/CSTMN (1:1), BisPYR/CSTMN (1:1), BisBAL/CSTMN (1:1), BisTOL/CSTMN (1:1) e Bis-EDT/2-hidróxi-1-propanotiol. Em algumas modalidades, o composto de BT é seleciona-

do dentre um ou mais de Bis-EDT, Bis-Bal, Bis-Pyr, Bis-Ery, Bis-Tol, Bis-BDT, ou Bis-EDT/2-hidróxi-1-propano tiol. Em algumas modalidades, o composto de BT no aerossol é BisEDT. Em algumas modalidades, o composto de BT do aerossol é BisBDT ou BisBAL.

[00182] Em algumas modalidades, o composto de BT (por exemplo BisEDT) é suspenso na gotícula de líquido. Os compostos de BT da presente invenção tem pouca a nenhuma solubilidade em solventes convencionais e carreadores de aerossol e existem, portanto, substancialmente como uma suspensão de partículas de BT na gotícula de aerossol. Por exemplo, em algumas modalidades, o composto de BT (como BisEDT) é menos do que 1% solúvel no carreador de aerossol e, portanto, existe primariamente (>99%) como um sólido.

[00183] Em algumas modalidades, as gotículas compreendem adicionalmente Tween 80 (por exemplo, de aproximadamente 0,05% a aproximadamente 1%) e opcionalmente um tampão (por exemplo, fosfato de sódio ou citrato de sódio) a um pH de aproximadamente 7,4; e/ou cloreto de sódio.

[00184] Os aerossóis da presente invenção têm uma distribuição de MMAD muito estreita que é benéfica devido à necessidade de concentrar a massa de partícula na faixa de tamanho-alvo, e minimizar ou eliminar a fração do produto que está fora da faixa respirável ou 'finos', isto é, partículas de tipicamente menos do que 0,4 µm de diâmetro. A capacidade de criar uma distribuição de tamanho de gotícula estreita na faixa de tamanho apropriada fornece o controle da taxa de evaporação inicial e permite alta eficiência de deposição. O fator limitante em termos do limite inferior de tamanho de gotícula de aerossol de partícula é o tamanho de micropartícula de BT (por exemplo, o tamanho de micropartícula de BisEDT). Uma gotícula submetida à aerossolização não pode ser menor do que o tamanho de microparticulado de BisEDT. Como tal, a distribuição de tamanho de micropartícula de BT,

assim como a uniformidade e reprodutibilidade consistente da distribuição de tamanho de microparticulado de BT, são características benéficas importantes para sustentar a geração de um produto de fármaco de BisEDT submetido à aerossolização seguro, eficaz e eficiente com propósitos de inalação. Consequentemente, em algumas modalidades, os aerossóis da presente invenção efetuam uma eficiência de deposição superior a 3%, superior a 5%, superior a 10%, superior a 15%, superior a 20%, superior a 25%, superior a 30%, superior a 35%, superior a 40%, superior a 45%, superior a 50%, superior a 55%, superior a 60%, superior a 65%, superior a 70%, superior a 75%, e superior a 80%. Em algumas modalidades, a eficiência de deposição se refere à deposição na região profunda do pulmão, por exemplo, nos alvéolos pulmonares profundos. Em algumas modalidades, os aerossóis da presente invenção efetuam uma eficiência de deposição mediante aerossolização por meio de um nebulizador. Por exemplo, o nebulizador é um nebulizador de jato. Em algumas modalidades, o nebulizador de jato é um nebulizador de jato Pari LC Plus ou nebulizador de jato Pari LC SPRINT. Em algumas modalidades, o nebulizador tem uma pressão de entrada de aproximadamente 10 a aproximadamente 0,28 MPa (40 psig) (por exemplo, 0,14 a 0,17 MPa (20 a 25 psig)). Em algumas modalidades, o fluxo de entrada é de aproximadamente 3 l/min a aproximadamente 8 l/min (por exemplo, 5,2 l/min). Em algumas modalidades, o fluxo de ar de exaustão é de aproximadamente 3 l/min a aproximadamente 8 l/min (por exemplo, 5 l/min).

[00185] A região alveolar do pulmão tem uma espessura mínima (0,5 μm a 2,5 μm) que separa o fluxo sanguíneo do lúmen de modo que os agentes pulmonares convencionais que se depositam no epitélio alveolar tenham tempo de residência no pulmão extremamente curto devido à absorção sistêmica. Consequentemente, tratamentos pulmonares convencionais necessitam tipicamente de dosagem frequente

a fim de manter níveis adequados de fármaco no nível de tecido. Entretanto, as partículas submetidas à aerossolização da presente invenção foram surpreendentemente constatadas como possuindo um tempo de residência excepcionalmente longo nos pulmões (medido como meia-vida) e têm depuração mucociliar e absorção de macrófagos reduzidas em relação aos tratamentos pulmonares convencionais. Adicionalmente, o tempo de residência longo dos aerossóis da presente invenção minimiza a atividade sistêmica e efeitos colaterais sistêmicos associados. Sem se atrelar a qualquer teoria particular, acredita-se que as micropartículas submetidas à aerossolização dissolvem lentamente no lúmen de pulmão e a exposição sistêmica é, desse modo, limitada em taxa de dissolução. Adicionalmente, os resultados de tempo de residência de pulmão aumentados em reduções significativas em colônia microbiana devido à presença contínua das micropartículas de BT.

[00186] Consequentemente, em algumas modalidades, quando o aerossol é depositado no pulmão (por exemplo, nos alvéolos pulmonares profundos), os compostos de BT têm uma meia-vida média de pelo menos 2 dias. Por exemplo, os compostos de BT têm uma meia-vida média de cerca de 2, 3, 4 ou 5 dias. Em algumas modalidades, o composto de BT é BisEDT. Em uma modalidade específica, a meia-vida de tecido de pulmão de BisEDT é 30 h ou mais, 40 h ou mais, 50 h ou mais, 60 h ou mais, 70, h ou mais, 80 h ou mais, 90 h ou mais, 100 h ou mais, 110 h ou mais, 125 h ou mais, ou 150 h ou mais. Em uma modalidade específica, a meia-vida de tecido de pulmão é após uma dose única por meio de inalação. Em outra modalidade específica, o tecido de pulmão é de um rato. Em outra modalidade específica, a meia-vida de tecido de pulmão de BisEDT é determinada pelo uso de protocolo como no Exemplo 8 no presente documento.

[00187] Em outra modalidade, a meia-vida de tecido de pulmão de

BisEDT é 80 h ou mais quando o rato recebe uma dose única de 100 µg/kg de pulmão com o uso de um nebulizador de jato Pari LC plus para administrar aos ratos com as formulações descritas no presente documento. Em outra modalidade, a meia-vida de tecido de pulmão de BisEDT é 90 h ou mais. Em outra modalidade, a meia-vida de tecido de pulmão de BisEDT é 100 h ou mais.

[00188] Em outra modalidade, após distribuir a composição submetida à aerossolização a um indivíduo, pelo menos 60%, 65%, 70, 75%, 80%, 90%, ou 95% da dose é depositada no pulmão, em oposição à região orofaríngea e as vias respiratórias condutoras. Em uma modalidade específica, pelo menos 80% da dose são depositados no pulmão, em oposição à região orofaríngea e as vias respiratórias condutoras. Em outra modalidade específica, pelo menos 90% da dose são depositados no pulmão, em oposição à região orofaríngea e as vias respiratórias condutoras.

[00189] Não havia conhecimento anterior de um tratamento pulmonar submetido à aerossolização que tenha partículas de aerossol com uma distribuição estreita que efetua uma alta eficiência de deposição acoplada com um tempo de residência de pulmão excepcionalmente longo para tratamento contínuo e pouca a nenhuma absorção sistêmica.

[00190] Em algumas modalidades, a presente invenção fornece um método para tratar, gerir ou atenuar a gravidade dos sintomas de fibrose cística (CF) e infecções em um indivíduo, em que o método compreende administrar ao indivíduo uma composição de bismuto-tiol (BT) que compreende pelo menos um composto de BT, em que a composição é uma suspensão de micropartículas que têm um diâmetro volumétrico médio (VMD) de aproximadamente 0,4 µm a aproximadamente 5 µm e/ou um diâmetro aerodinâmico mediano de massa (MMAD) de aproximadamente 0,4 µm a aproximadamente 5 µm. Em

algumas modalidades, o composto de BT é BisEDT. Em algumas modalidades, a composição de BT compreende BisEDT a uma concentração superior a aproximadamente 0,1 mg/ml, Tween 80® a aproximadamente 0,05% a aproximadamente 1,0%, cloreto de sódio a aproximadamente 0,05 a 40 mM e, opcionalmente, fosfato de sódio a aproximadamente 2 a 20 mM a aproximadamente pH 7,4. Por exemplo, em algumas modalidades, a composição de BT compreende BisEDT a uma concentração superior a aproximadamente 0,25 mg/ml, Tween 80® aproximadamente 0,5%, cloreto de sódio a aproximadamente 10 mM e fosfato de sódio a aproximadamente 10 mM a aproximadamente pH 7,4. Em outra modalidade dos métodos no presente documento, a composição de BT é administrada por aerossolização. Em algumas modalidades, quando o aerossol é depositado no pulmão (por exemplo, nos alvéolos pulmonares profundos), os compostos de BT têm uma meia-vida média de pelo menos 2 dias. Por exemplo, os compostos de BT têm uma meia-vida média de cerca de 2, 3, 4 ou 5 dias. Em algumas modalidades, o composto de BT é BisEDT. Em uma modalidade específica, a meia-vida de tecido de pulmão de BisEDT é 30 h ou mais, 40 h ou mais, 50 h ou mais, 60 h ou mais, 70, h ou mais, 80 h ou mais, 90 h ou mais, 100 h ou mais, 110 h ou mais, 125 h ou mais, ou 150 h ou mais. Em uma modalidade específica, a meia-vida de tecido de pulmão é após uma dose única por meio de inalação. Em outra modalidade específica, o tecido de pulmão é de um rato. Em outra modalidade específica, a meia-vida de tecido de pulmão de BisEDT é determinada pelo uso de protocolo como no Exemplo 8 no presente documento.

[00191] Em outra modalidade, após distribuir a composição submetida à aerossolização a um indivíduo, pelo menos 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 90%, ou 95% da dose é depositada no pulmão, em oposição à região orofaríngea e as vias respiratórias condutoras. Em uma

modalidade específica, pelo menos 80% da dose são depositados no pulmão, em oposição à região orofaríngea e as vias respiratórias condutoras. Em outra modalidade específica, pelo menos 90% da dose são depositados no pulmão, em oposição à região orofaríngea e as vias respiratórias condutoras. Em uma modalidade específica, o indivíduo é um rato. Em outra modalidade específica, a porcentagem de deposição é determinada com o uso de um nebulizador de jato Pari LC plus para administrar aos ratos com as formulações descritas no presente documento.

[00192] Em outra modalidade, a meia-vida de tecido de pulmão de BisEDT é 80 h ou mais quando o rato recebe uma dose única de 100 µg/kg de pulmão com o uso de um nebulizador de jato Pari LC plus para administrar aos ratos com as formulações descritas no presente documento. Em outra modalidade, a meia-vida de tecido de pulmão de BisEDT é 90 h ou mais. Em outra modalidade, a meia-vida de tecido de pulmão de BisEDT é 100 h ou mais.

[00193] Em outra modalidade, os métodos da presente invenção podem incluir tratar, gerir ou atenuar a gravidade de sintomas e infecções de fibrose cística (CF) em um indivíduo, administrando-se ao indivíduo uma composição de bismuto-tiol (BT) que compreende pelo menos um composto de BT, em que a composição é uma suspensão de micropartículas que têm um diâmetro volumétrico médio (VMD) de aproximadamente 0,4 µm a aproximadamente 5 µm e/ou um diâmetro aerodinâmico mediano de massa (MMAD) de aproximadamente 0,4 µm a aproximadamente 5 µm.

[00194] Em algumas modalidades, a composição é uma suspensão de micropartículas que tem um diâmetro médio volumétrico (VMD) de aproximadamente 0,4 µm a aproximadamente 5 µm. Em algumas modalidades, pelo menos 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 90% ou 95% das micropartículas têm um VMD de aproximadamente 0,4 µm a aproxi-

madamente 5 μm , ou de aproximadamente 0,6 μm a aproximadamente 2,5 μm , ou de aproximadamente 0,7 μm a aproximadamente 4 μm , ou de aproximadamente 0,7 μm a aproximadamente 3,5 μm , ou de aproximadamente 0,7 μm a aproximadamente 3,0 μm , ou de aproximadamente 0,9 μm a aproximadamente 3,5 μm , ou de aproximadamente 0,9 μm a aproximadamente 3 μm , ou de aproximadamente 0,8 μm a aproximadamente 1,8 μm , ou de aproximadamente 0,8 μm a aproximadamente 1,6 μm , ou de aproximadamente 0,9 μm a aproximadamente 1,4 μm , ou de aproximadamente 1,0 μm a aproximadamente 2,0 μm , ou de aproximadamente 1,0 μm a aproximadamente 1,8 μm e todas as faixas entre os mesmos. Em algumas modalidades, pelo menos 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 90%, ou 95% das micropartículas têm um VMD de aproximadamente 0,6 μm a aproximadamente 2,5 μm , ou de aproximadamente 0,8 μm a aproximadamente 1,6 μm , ou de aproximadamente 0,9 μm a aproximadamente 3,5 μm , ou de aproximadamente 0,9 μm a aproximadamente 3 μm , ou de aproximadamente 0,9 μm a aproximadamente 1,4 μm , ou de aproximadamente 1,0 μm a aproximadamente 2,0 μm , ou de aproximadamente 1,0 μm a aproximadamente 1,8 μm e todas as faixas entre os mesmos. Em algumas modalidades, as micropartículas têm um D90 de inferior a aproximadamente 10 μm . Por exemplo, em algumas modalidades, as micropartículas têm um D90 de menos do que cerca de 10 μm , 9 μm , 8 μm , 7 μm , 6 μm , 5 μm , 4 μm , 3 μm , 2 μm ou aproximadamente 1 μm . Em algumas modalidades, as micropartículas têm um D90 de inferior a aproximadamente 3 μm . Em algumas modalidades, as micropartículas têm um D90 na faixa de aproximadamente 1 μm a aproximadamente 5 μm , ou cerca de 2 μm a aproximadamente 6 μm , ou cerca de 2 μm a aproximadamente 4 μm , ou cerca de 2 μm a aproximadamente 3 μm , ou cerca de 1 μm a aproximadamente 4 μm , ou cerca de 1 μm a aproximadamente 3 μm .

[00195] Em algumas modalidades, a composição de BT é submeti-

da à aerossolização, em que as gotículas líquidas submetidas à aerossolização têm um MMAD de aproximadamente 0,4 μm a aproximadamente 5 μm . Em algumas modalidades, pelo menos 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 90%, ou 95% das gotículas líquidas têm um MMAD de aproximadamente 0,4 μm a aproximadamente 7 μm , ou de aproximadamente 0,5 μm a aproximadamente 5 μm , ou de aproximadamente 0,7 μm a aproximadamente 4 μm , ou de aproximadamente 0,7 μm a aproximadamente 3,5 μm , ou de aproximadamente 0,8 μm a aproximadamente 3,5 μm , ou de aproximadamente 0,9 μm a aproximadamente 3,5 μm , ou de aproximadamente 0,9 μm a aproximadamente 3 μm , ou de aproximadamente 0,8 μm a aproximadamente 1,8 μm , ou de aproximadamente 0,8 μm a aproximadamente 1,6 μm , ou de aproximadamente 0,9 μm a aproximadamente 1,4 μm , ou de aproximadamente 1,0 μm a aproximadamente 2,0 μm , ou de aproximadamente 1,0 μm a aproximadamente 1,8 μm e todas as faixas entre os mesmos. Em algumas modalidades, pelo menos 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 90%, ou 95% das gotículas líquidas têm um MMAD de aproximadamente 0,8 μm a aproximadamente 1,6 μm , ou de aproximadamente 0,9 μm a aproximadamente 3,5 μm , ou de aproximadamente 0,9 μm a aproximadamente 3 μm , ou de aproximadamente 0,9 μm a aproximadamente 1,4 μm , ou de aproximadamente 1,0 μm a aproximadamente 2,0 μm , ou de aproximadamente 1,0 μm a aproximadamente 1,8 μm e todas as faixas entre os mesmos. Em algumas modalidades, a pluralidade de gotículas líquidas tem um D90 inferior a aproximadamente 10 μm . Por exemplo, em algumas modalidades, a pluralidade de gotículas líquidas tem um D90 inferior a aproximadamente 10 μm , 9 μm , 8 μm , 7 μm , 6 μm , 5 μm , 4 μm , 3 μm , 2 μm , ou aproximadamente 1 μm . Em algumas modalidades, a pluralidade de gotículas líquidas tem um D90 inferior a aproximadamente 3 μm . Em algumas modalidades, a pluralidade de gotículas líquidas tem um D90 na faixa de aproximadamente

1 µm a aproximadamente 5 µm, ou cerca de 2 µm a aproximadamente 6 µm, ou cerca de 2 µm a aproximadamente 4 µm, ou cerca de 2 µm a aproximadamente 3 µm, ou cerca de 1 µm a aproximadamente 4 µm, ou cerca de 1 µm a aproximadamente 3 µm.

[00196] Em algumas modalidades, a pluralidade de gotículas líquidas é dispersa em uma fase de gás contínuo.

[00197] Em algumas modalidades, o composto de BT do aerossol compreende bismuto e/ou um sal de bismuto covalentemente associado e/ou em um complexo de coordenação com um ou mais compostos que contêm tiol. Por exemplo, o sal de bismuto é nitrato de bismuto, subnitrato de bismuto, ou cloreto de bismuto. Em algumas modalidades, o composto que contém tiol compreende um ou mais agentes selecionados dentre 1,2-etano ditiol, 2,3-dimercaptopropanol, piritiona, ditioeritritol, 3,4 dimercaptotolueno, 2,3-butanoditiol, 1,3-propanoditiol, 2-hidroxiopropanotiol, 1-mercaptop-2-propanol, ditioeritritol, ditiotreitól, cisteamina e ácido alfa-lipoico. Em algumas modalidades, a composição de BT compreende um ou mais compostos de BT selecionados dentre BisBAL, BisEDT, Bis-dimercaprol, BisDTT, Bis-2-mercaptop- etanol, Bis-DTE, Bis-Pyr, Bis-Ery, Bis-Tol, Bis-BDT, Bis-PDT, Bis-Pyr/Bal, Bis-Pyr/BDT, BisPyr/EDT, Bis-Pyr/PDT, Bis-Pyr/Tol, Bis-Pyr/Ery, BisEDT/CSTMN (1:1), BisPYR/CSTMN (1:1), BisBAL/CSTMN (1:1), BisTOL/CSTMN (1:1), bismuto-1-mercaptop-2-propanol, e Bis-EDT/2-hidróxi-1-propanotiol. Em algumas modalidades, o composto de BT é selecionado dentre um ou mais de Bis-EDT, Bis-Bal, Bis-Pyr, Bis-Ery, Bis-Tol, Bis-BDT, ou Bis-EDT/2-hidróxi-1-propano tiol. Em algumas modalidades, o composto de BT no aerossol é BisEDT. Em algumas modalidades, o composto de BT do aerossol é BisBDT ou BisBAL.

[00198] Em algumas modalidades das composições presentemente descritas, pelo menos 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 90%, ou 95% das

micropartículas têm um diâmetro volumétrico médio de aproximadamente 0,6 µm a aproximadamente 2,5 µm. Em algumas modalidades, substancialmente todas as micropartículas têm um VMD de aproximadamente 0,6 µm a aproximadamente 2,5 µm. Em algumas modalidades, pelo menos 70% das partículas submetidas à aerossolização têm um MMAD de aproximadamente 0,9 µm a aproximadamente 3 µm. Em algumas modalidades, a composição é uma suspensão de micropartículas que têm um diâmetro volumétrico médio (VMD) de aproximadamente 0,6 µm a aproximadamente 2,5 µm e/ou um diâmetro aerodinâmico mediano de massa (MMAD) de aproximadamente 0,9 µm a aproximadamente 3 µm. Em algumas modalidades, a composição de bismuto-tiol compreende uma pluralidade de micropartículas que compreendem um composto de bismuto-tiol (BT), em que substancialmente todas as ditas micropartículas têm um diâmetro volumétrico médio de aproximadamente 0,4 µm a aproximadamente 5 µm, e em que o composto de BT compreende bismuto ou um sal de bismuto e um composto que contém tiol.

[00199] Em algumas modalidades, a composição é submetida à aerossolização por meio de um nebulizador. Por exemplo, o nebulizador é um nebulizador de jato ou nebulizador de malha vibratória. Em algumas modalidades, o nebulizador de jato é um nebulizador de jato Pari LC Plus ou nebulizador de jato Pari LC SPRINT. Em algumas modalidades, o nebulizador tem uma pressão de entrada de aproximadamente 10 a aproximadamente 0,28 MPa (40 psig) (por exemplo, 0,14 a 0,17 MPa (20 a 25 psig)). Em algumas modalidades, o fluxo de entrada é de aproximadamente 3 l/min a aproximadamente 8 l/min (por exemplo, 5,2 l/min). Em algumas modalidades, o fluxo de ar de exaustão é de aproximadamente 3 l/min a aproximadamente 8 l/min (por exemplo, 5 l/min).

[00200] Exemplos de carreadores aquosos e não aquosos adequa-

dos que podem ser empregues nas composições farmacêuticas da invenção incluem água, etanol, polióis (como glicerol, propileno glicol, polietileno glicol, e semelhantes), e misturas adequadas dos mesmos, óleos vegetais, como óleo de oliva, e ésteres orgânicos injetáveis, como oleato de etila. A fluidez apropriada pode ser mantida, por exemplo, pelo uso de materiais de revestimento, como lecitina, pela manutenção do tamanho de partícula necessário no caso de dispersões e pelo uso de tensoativos.

[00201] Estas composições também podem conter adjuvantes, como conservantes, agentes umectantes, agentes emulsificantes e também pode ser desejável que agentes dispersantes incluam agentes isotônicos, como açúcares, cloreto de sódio e semelhantes nas composições. Além disto, a absorção prolongada da forma farmacêutica injetável pode ser causada pela inclusão de agentes que atrasam a absorção, como monoestearato de alumínio e gelatina.

[00202] Em alguns casos, a fim de prolongar o efeito de um fármaco, é desejável atrasar a absorção do fármaco de injeção subcutânea ou intramuscular. Isso pode ser alcançado pelo uso de uma suspensão líquida de material cristalino ou amorfo que tem solubilidade de água insatisfatória. A taxa de absorção do fármaco, então, depende de sua taxa de dissolução, que, por sua vez, pode depender mediante tamanho de cristal e forma cristalina. Alternativamente, a absorção atrasada de uma forma de fármaco administrada por via parentérica é alcançada por dissolução ou suspensão do fármaco em um veículo de óleo.

[00203] Os níveis de dosagem atuais dos ingredientes ativos nas composições farmacêuticas podem ser variados de modo a obter uma quantidade do ingrediente ativo que é eficaz para alcançar a resposta terapêutica desejável para um paciente, composição e modo de administração particular, sem ser tóxico para o paciente.

[00204] O nível de dosagem selecionado dependerá de uma varie-

dade de fatores incluindo a atividade do composto particular ou combinação de compostos empregues, ou o éster, sal ou amida do mesmo, a via de administração, o tempo de administração, a taxa de excreção do composto particular (ou compostos particulares) que é empregue, a duração do tratamento, outros fármacos, compostos e/ou materiais usados em combinação com o composto particular (ou compostos particulares) empregue, a idade, sexo, peso, condição, saúde geral e histórico médico anterior do indivíduo sendo tratado, e fatores semelhantes bem conhecidos na técnica médica.

[00205] Um médico ou veterinário que tem habilidade comum na técnica pode determinar prontamente e prescrever a quantidade terapeuticamente eficaz da composição farmacêutica necessária. Por exemplo, o médico ou veterinário pode começar com doses da composição farmacêutica ou composto em níveis mais baixos do que o necessário a fim de alcançar o efeito terapêutico e aumentar gradualmente a dosagem até o efeito desejável ser alcançado. Por "quantidade terapeuticamente eficaz" entende-se que a concentração de um composto que é suficiente para eliciar o efeito terapêutico desejável. É geralmente entendido que a quantidade eficaz do composto variará de acordo com o peso, sexo, idade, e histórico médico do indivíduo. Outros fatores que influenciam a quantidade eficaz podem incluir, mas sem limitação, a gravidade da afecção do indivíduo, o distúrbio em tratamento, a estabilidade do composto, e, se desejável, outro tipo de agente terapêutico sendo administrado com o composto da invenção. Uma dose total maior pode ser distribuída por múltiplas administrações do agente. Os métodos para determinar a eficácia e a dosagem são conhecidos por aqueles versados na técnica (Isselbacher *et al.* (1996) Harrison's Principles of Internal Medicine 13 ed., 1.814 a 1.882, incorporado ao presente documento a título de referência).

[00206] Em geral, uma dose adequada de um composto ativo usa-

do nas composições e métodos da invenção serão aquela quantidade do composto que é a dose mais baixa eficaz para produzir um efeito terapêutico. Tal dose eficaz dependerá geralmente dos fatores descritos acima.

[00207] Esta invenção inclui o uso de sais farmaceuticamente aceitáveis de compostos da invenção nas composições e métodos da presente invenção. Em certas modalidades, os sais contemplados da invenção incluem, mas sem limitação, sais de alquil, dialquil, trialquil ou tetra-alquil amônio. Em certas modalidades, os sais contemplados da invenção incluem, mas sem limitação, L-arginina, benentamina, benztina, betaína, hidróxido de cálcio, colina, deanol, dietanolamina, dietilamina, 2-(dietilamino)etanol, etanolamina, etilenodiamina, N-metilglucamina, hidrabamina, 1H-imidazol, lítio, L-lisina, magnésio, 4-(2-hidroxietil)morfolina, piperazina, potássio, 1-(2-hidroxietil)pirrolidina, sódio, trietanolamina, trometamina e sais de zinco. Em certas modalidades, os sais contemplados da invenção incluem, mas sem limitação, Na, Ca, K, Mg, Zn ou outros sais de metal.

[00208] Os sais de adição de ácido farmaceuticamente aceitáveis também podem existir como vários solvatos, como com água, metanol, etanol, dimetilformamida e semelhantes. Misturas de tais solvatos também podem ser preparadas. A fonte de tal solvato pode ser originária do solvente de cristalização, inerente do solvente de preparação ou cristalização, ou fortuita a tal solvente.

[00209] Os agentes umectantes, emulsificantes e lubrificantes, como sulfato de sódio e estearato de magnésio, assim como agentes de coloração, agentes de liberação, agentes de revestimento, agentes adoçantes, saborizantes e perfumantes, conservantes e antioxidantes também podem estar presentes nas composições.

[00210] Os exemplos de antioxidantes farmaceuticamente aceitáveis incluem: (1) antioxidantes solúveis em água, como ácido ascórbico

co, cloridrato de cisteína, bissulfito de sódio, metabissulfito de sódio, sulfito de sódio e semelhantes; (2) antioxidantes solúveis em óleo, como palmitato de ascorbila, hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), lecitina, propil galato, alfa-tocoferol, e semelhantes; e (3) agentes quelantes de metal, como ácido cítrico, ácido etilenodiamina tetra-acético (EDTA), sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico e semelhantes.

MODALIDADES

[00211] 1. Um método para tratar, gerir ou atenuar a gravidade de sintomas de fibrose cística (CF) e infecções em um indivíduo, em que o método compreende administrar ao indivíduo uma composição de bismuto-tiol (BT) que compreende pelo menos um composto de BT.

[00212] 2. O método da modalidade 1, em que o indivíduo tem pelo menos uma infecção pulmonar.

[00213] 3. O método da modalidade 2, em que o indivíduo tem pelo menos duas infecções pulmonares e as infecções são ou simultâneas ou estão em ordem sucessiva.

[00214] 4. O método da modalidade 2 ou 3, em que a infecção pulmonar é em um pulmão.

[00215] 5. O método de qualquer uma das modalidades 2 a 4, em que a infecção pulmonar ocorre em ambos os pulmões.

[00216] 6. O método de qualquer uma das modalidades 2 a 5, em que a infecção pulmonar ocorre em um ou mais dentre os três lóbulos do pulmão direito.

[00217] 7. O método de qualquer uma das modalidades 2 a 6, em que a infecção pulmonar é em um ou ambos os lóbulos do pulmão esquerdo.

[00218] 8. O método de qualquer uma das modalidades 2 a 7, em que a infecção pulmonar é infecção por bronquiectasia, pneumonia, febre do vale, aspergilose broncopulmonar alérgica (ABPA), pneumo-

nia associada à ventilação mecânica, pneumonia adquirida em hospital, pneumonia adquirida na comunidade, traqueobronquite associada à ventilação mecânica, infecção do trato respiratório inferior, *Mycobacterianão* tuberculosa, antraz, legionelose, coqueluche, bronquite, bronquiolite, infecção associada à DPOC e pós-transplante pulmonar.

[00219] 9. O método de qualquer uma das modalidades 2 a 8, em que a infecção pulmonar contém um ou mais patógenos bacterianos e/ou fúngicos.

[00220] 10. O método de qualquer uma das modalidades 2 a 9, em que a infecção pulmonar é uma infecção pulmonar relacionada à CF.

[00221] 11. O método da modalidade 10 que compreende o tratamento da infecção pulmonar relacionada à CF.

[00222] 12. O método da modalidade 10 que compreende gerir a infecção pulmonar relacionada à CF.

[00223] 13. O método da modalidade 10 que compreende atenuar a gravidade da infecção pulmonar relacionada à CF.

[00224] 14. O método de qualquer uma das modalidades 2 a 13, em que a infecção pulmonar está localizada na mucosa pulmonar, nos brônquios, nos alvéolos, nos macrófagos e/ou nos bronquíolos, ou sobre os mesmos.

[00225] 15. O método de qualquer uma das modalidades 2 a 13, em que a infecção pulmonar está localizada na superfície de ou dentro de um biofilme bacteriano, bactérias agregadas, um biofilme fúngico, um biofilme multiespécies ou multifilo combinado composto por bactérias e fungos ou fungos agregados.

[00226] 16. O método de qualquer uma das modalidades 2 a 13, em que a infecção pulmonar está localizada no esputo.

[00227] 17. O método de qualquer uma das modalidades 9 a 16, em que o patógeno bacteriano compreende uma ou mais bactérias gram-positivas e/ou bactérias gram-negativas.

[00228] 18. O método de qualquer uma das modalidades 9 a 17, em que o patógeno bacteriano compreende um ou mais dentre um biofilme bacteriano e/ou bactérias planctônicas.

[00229] 19. O método da modalidade 18, em que o método compreende pelo menos um dentre: (i) reduzir o biofilme bacteriano, (ii) impedir o crescimento do biofilme bacteriano, (iii) prevenir a formação inicial do biofilme bacteriano, e/ou (iv) prevenir a reforma do biofilme bacteriano.

[00230] 20. O método de qualquer uma das modalidades 9 a 16, em que o patógeno fúngico compreende fungos planctônicos e/ou fungos de biofilme.

[00231] 21. O método de qualquer uma das modalidades 9 a 20, em que a composição de BT trata, gere ou atenua a gravidade da infecção pulmonar por meio um dentre ou por meio dos seguintes dois:

- prevenção da infecção por patógeno bacteriano ou patógeno fúngico; e
- redução do patógeno bacteriano ou fúngico; e/ou
- redução da viscosidade do esputo.

[00232] 22. O método de qualquer uma das modalidades 9 a 20, em que a composição de BT trata, gere ou atenua a gravidade da infecção pulmonar por um ou mais dentre:

- prevenção de elaboração de secreção de exotoxinas contra patógeno bacteriano ou fúngico;
- inibição de viabilidade celular ou proliferação celular de células planctônicas do patógeno bacteriano ou fúngico;
- inibição de formação de biofilme pelo patógeno bacteriano ou fúngico;
- inibição da invasividade do biofilme a tecidos pulmonares;
- inibição da patogenicidade de biofilme a tecidos pulmonares; e

- inibição da viabilidade de biofilme ou crescimento de biofilme de células de formação de biofilme do patógeno bacteriano ou fúngico.

[00233] 23. O método de qualquer uma das modalidades 9 a 22, em que um ou mais patógenos são selecionados dentre *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus lugdunensis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus milleri/anginosus*, *Streptococcus pyogenes*, *Mycobacterium* não tuberculoso, *Mycobacterium tuberculosis*, *Burkholderia* spp., *Achromobacter xylosoxidans*, *Pandoraea sputorum*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Alcaligenes xylosoxidans*, *Haemophilus pittmaniae*, *Serratia marcescens*, *Candida albicans*, *Candida albicans* resistentes a fármacos, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida guilliermondii*, *Candida auris*, *Candida tropicalis*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Morganella morganii*, *Inquilinus limosus*, *Ralstonia mannitolilytica*, *Pandoraea apista*, *Pandoraea pnomenusa*, *Pandoraea sputorum*, *Bdellovibrio bacteriovorus*, *Bordetella bronchiseptica*, *Vampirovibrio chlorellavorus*, *Actinobacter baumannii*, *Cupriavidus metallidurans*, *Cupriavidus pauculus*, *Cupriavidus respiraculi*, *Delftia acidivorans*, *Exophiala dermatitidis*, *Herbaspirillum frisingense*, *Herbaspirillum seropedicae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pandoraea norimbergensis*, *Pandoraea pulmonicola*, *Pseudomonas mendocina*, *Pseudomonas pseudoalcaligenes*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas stutzeri*, *Ralstonia insidiosa*, *Ralstonia pickettii*, *Neisseria gonorrhoeae*, *E. Coli* NDM-1 positiva, *Enterobacter cloaca*, *E. faecium* resistente à vancomicina, *E. faecalis* resistente à vancomicina, *E. faecium*, *E. faecalis*, *S. agalactiae* resistente à clindamicina, *S. agalactiae*, *Bacteroides fragilis*, *Clostridium difficile*, *Streptococcus pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis*, *Haemophilus haemolyticus*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Chlamydia pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoni-*

ae, *Atopobium*, *Sphingomonas*, *Saccharibacteria*, *Leptotrichia*, *Capnocytophaga*, *Oribacterium*, *Aquabacterium*, *Lachnoanaerobaculum*, *Campylobacter*, *Acinetobacter*; *Agrobacterium*; *Bordetella*; *Brevundimonas*; *Chryseobacterium*; *Delftia*; *Enterobacter*; *Klebsiella*; *Pandora*-*ea*; *Pseudomonas*; *Ralstonia*, e *Prevotella*.

[00234] 24. O método da modalidade 23, em que a micobactéria não tuberculosa é selecionada dentre *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium gordonae*, *Mycobacterium kansasii*, complexo *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium marinum*, *Mycobacterium terrae* e *Mycobacterium chelonii*.

[00235] 25. O método da modalidade 23, em que *Burkholderia* spp. é selecionada dentre *Burkholderia cepacia*, complexo *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia multivorans*, *Burkholderia cenocepacia*, *Burkholderia stable*, *Burkholderia vietnamiensis*, *Burkholderia dolosa*, *Burkholderia ambifaria*, *Burkholderia anthina*, *Burkholderia pyrroceriahold*, *Burkholderia pyrroceria* *Burkholderia*, *lateria* *metallica*, *Burkholderia seminalis*, *Burkholderia contaminans* e *Burkholderia diffusa*.

[00236] 26. O método da modalidade 23, em que um ou mais patógenos são selecionados dentre *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas aeruginosa resistente a um único medicamento*, *Pseudomonas aeruginosa multirresistente*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus resistente a um único medicamento*, *Staphylococcus aureus resistente a medicamentos*, *Staphylococcus aureus resistente à metilicilina*, *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium avium*, *Haemophilus influenzae*, *Burkholderia cepacia*, *multivorans* *Burkholderia*, *Burkholderia cenocepacia*, *Burkholderia dolosa*, *Achromobacter xylosoxidans*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Staphylococcus epidermidis* e *Burkholderia vietnamiensis*.

[00237] 27. O método da modalidade 23, em que um ou mais pató-

genos são selecionados dentre *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*.

[00238] 28. O método de qualquer uma das modalidades 18, 19 e 22, em que um ou mais patógenos são selecionados dentre biofilmes de *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cenocepacia*, complexo *Burkholderia cepacia*, *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium avium*, *Achromobacter spp.*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus epidermidis*, *maltofilia* e *Staphylococcus aureus*.

[00239] 29. O método de acordo com a modalidade 27, em que *Pseudomonas aeruginosa* e/ou *Staphylococcus aureus* são multirresistentes.

[00240] 30. O método de qualquer uma das modalidades 9 a 29, em que um ou mais patógenos exibem resistência ou são refratários a um antibiótico selecionado dentre amicacina, aztreonam, meticilina, vancomicina, nafcilina, gentamicina, ampicilina, cloranfenicol, doxiciclina, colistina, delamanid, pretomanida, clofazimina, bedaquilina e tobramicina.

[00241] 31. O método da modalidade 30, em que o antibiótico é amicacina ou tobramicina.

[00242] 32. O método da modalidade 30, em que o patógeno bacteriano é *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina.

[00243] 33. O método de qualquer uma das modalidades 1 a 32 que compreende adicionalmente coadministrar ao indivíduo um antibiótico selecionado dentre amicacina, tobramicina, gentamicina, piperacilina, mezlocilina, ticarcilina, imipenem, ciprofloxacina, ceftazidima, aztreonam, ticarcilina-clavulato, a amoxicilina, o trimetoprim-sulfametoxazol, cefalexina, piperacilina-tazobactam, linezolida, daptomicina, vancomicina, metronidazol, clindamicina, colistina, a tetraciclina, a levofloxacina, a amoxicilina e ácido clavulânico (Augmentin®), cloxacilina, dicloxacilina, cefdinir, cefprozil, cefaclor, cefuroxima, eritromicina/sulfisoxazol,

eritromicina, claritromicina, azitromicina, doxiciclina, minociclina, tigeciclina, imipenem, meropenem, colistimetato/colistina[®]metecilina, oxacilina, nafcilina, carbenicilina, azlocilina, piperacilina e tazobactam (Zosyn[®]), cefepima, etambutol, rifampicina e meropenem.

[00244] 34. O método da modalidade 33, em que o antibiótico é selecionado dentre meropenem, ceftazidima, tobramicina, amicacina, aztreonam, ciprofloxacina, colistina e levofloxacina.

[00245] 35. O método de qualquer uma das modalidades 9 a 22, em que o fungo patogênico é *Candida albicans*, *Candida albicans resistente a fármaco*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida guilliermondii*, *Candida auris*, *Candida tropicalis*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus fumigatus* e/ou *Aspergillus flavus*.

[00246] 36. O método de qualquer uma das modalidades 1 a 35 que compreende administrar a composição de BT por meio de inalação, por via oral ou nasal, com o uso de um dispositivo de aerossol.

[00247] 37. O método da modalidade 36, em que o dispositivo de aerossol é um nebulizador.

[00248] 38. O método da modalidade 36 ou 37, em que a composição de BT está na forma de uma solução aquosa, suspensão aquosa ou pó seco.

[00249] 39. O método de qualquer uma das modalidades 1 a 38, em que a composição de BT é administrada por via tópica ao tecido pulmonar.

[00250] 40. O método de qualquer uma das modalidades 1 a 39, em que

a composição de BT é administrada com uma dosagem de aproximadamente 0,25 mg/ml a aproximadamente 15 mg/ml, de aproximadamente 0,4 mg/ml a aproximadamente 15 mg/ml, de aproximadamente 0,6 mg/ml a aproximadamente 15 mg/ml, de aproximadamente 0,6 mg/ml a aproximadamente 100 mg/ml, de aproximadamente 5

mg/ml a aproximadamente 100 mg/ml, de aproximadamente 10 mg/ml a aproximadamente 100 mg/ml, de aproximadamente 25 mg/ml a aproximadamente 100 mg/ml, de aproximadamente 50 mg/ml a aproximadamente 100 mg/ml, de aproximadamente 0,8 mg/ml a aproximadamente 15 mg/ml, de aproximadamente 1 mg/ml a aproximadamente 10 mg/ml, de 2,5 mg/ml a aproximadamente 10 mg/ml, de aproximadamente 4 mg/ml a aproximadamente 10 mg/ml, de aproximadamente 5 mg/ml a aproximadamente 10 mg/ml, de aproximadamente 6 mg/ml a aproximadamente 10 mg/ml, 0,6 mg/ml a aproximadamente 6 mg/ml, de aproximadamente 4 mg/ml a aproximadamente 15 mg/ml, de aproximadamente 6 mg/ml a aproximadamente 15 mg/ml, de aproximadamente 50 µg/ml a aproximadamente 750 µg/ml, de aproximadamente 75 µg/ml a aproximadamente 500 µg/ml, de aproximadamente 100 µg/ml a aproximadamente 250 µg/ml, de aproximadamente 100 µg/ml a aproximadamente 150 µg/ml ou de aproximadamente 75 µg/ml a aproximadamente 150 µg/ml; e/ou

a quantidade total da composição de BT administrada aos pulmões é de aproximadamente 0,25 mg a aproximadamente 15 mg, de aproximadamente 0,4 mg a aproximadamente 15 mg, de aproximadamente 0,6 mg a aproximadamente 15 mg, de aproximadamente 0,8 mg a aproximadamente 15 mg, de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 10 mg, de 2,5 mg a aproximadamente 10 mg, de aproximadamente 4 mg a aproximadamente 10 mg, de aproximadamente 5 mg a aproximadamente 10 mg, de aproximadamente 6 mg a aproximadamente 10 mg, 0,6 mg a aproximadamente 6 mg, de aproximadamente 4 mg a aproximadamente 15 mg, de aproximadamente 6 mg a aproximadamente 15 mg, de aproximadamente 50 µg a aproximadamente 750 µg, de aproximadamente 75 µg a aproximadamente 500 µg, de aproximadamente 100 µg a aproximadamente 250 µg, de aproximadamente 100 µg a aproximadamente 150 µg ou de aproximada-

mente 75 µg a aproximadamente 150 µg.

[00251] 41. O método de qualquer uma das modalidades 1 a 40, em que a composição de BT é administrada com uma dosagem de aproximadamente 0,6 mg/ml a aproximadamente 6 mg/ml.

[00252] 42. O método de qualquer uma das modalidades 1 a 41, em que a composição de BT é administrada três vezes ao dia, duas vezes ao dia, uma vez ao dia, a cada dois dias, uma vez a cada três dias, uma vez por semana, uma vez a cada duas semanas uma vez por mês ou uma vez a cada dois meses.

[00253] 43. O método da modalidade 42, em que a composição de BT é administrada uma vez por semana.

[00254] 44. O método de qualquer uma das modalidades 1 a 43, em que um ou mais dentre os seguintes sintomas de fibrose cística têm a gravidade atenuada no indivíduo: tosse, respiração ofegante, falta de ar, bronquiectasia, pólipos nasais, hemoptise, insuficiência respiratória e exacerbação pulmonar.

[00255] 45. O método de qualquer uma das modalidades 1 a 44, em que a composição de bismuto compreende uma pluralidade de micropartículas que compreendem um composto de bismuto-tiol (BT), em que substancialmente todas as ditas micropartículas têm um diâmetro volumétrico médio de aproximadamente 0,4 µm a aproximadamente 5 µm, e em que o composto de BT compreende bismuto ou um sal de bismuto e um composto que contém tiol.

[00256] 46. O método da modalidade 45, em que pelo menos 60%, 65%, 70, 75%, 80%, 90% ou 95% das micropartículas têm um diâmetro volumétrico médio de aproximadamente 0,4 µm a aproximadamente 3 µm, ou de aproximadamente 0,5 µm a aproximadamente 2 µm, ou de aproximadamente 0,7 µm a aproximadamente 2 µm, ou de aproximadamente 0,8 µm a aproximadamente 1,8 µm, ou de aproximadamente 0,8 µm a aproximadamente 1,6 µm, ou de aproximadamente 0,9

µm a aproximadamente 1,4 µm, ou de aproximadamente 1,0 µm a aproximadamente 2,0 µm, ou de aproximadamente 1,0 µm a aproximadamente 1,8 µm.

[00257] 47. O método das modalidades 45 a 46, em que o sal de bismuto é nitrato de bismuto, subnitrato de bismuto ou cloreto de bismuto.

[00258] 48. O método das modalidades 45 a 46, em que o composto que contém tiol compreende um ou mais agentes selecionados dentre 1,2-etano ditiol, 2,3-dimercaptopropanol, piritiona, ditioeritritol, 3,4-dimercaptotolueno, 2,3-butanoditiol, 1,3-propanoditiol, 2-hidroxipropanotiol, 1-mercapto-2-propanol, ditioeritritol, ditiotreititol, cisteamina e ácido alfa-lipoico.

[00259] 49. O método de qualquer uma das modalidades 45 a 48, em que a composição BT compreende um ou mais compostos de BT selecionados dentre BisBAL, BisEDT, Bis-dimercaprol, BisDTT, Bis-2-mercaptoetanol, Bis-DTE, Bis-Pyr, Bis-Ery, Bis-Tol, Bis-BDT, Bis-PDT, Bis-Pyr/Bal, Bis-Pyr/BDT, BisPyr/EDT, Bis-Pyr/PDT, Bis-Pyr/Tol, Bis-Pyr/Ery, bismuto-1-mercapto-2-propanol, BisEDT/CSTMN (1:1), Bis-PYR/CSTMN (1:1), BisBAL/CSTMN (1:1), BisTOL/CSTMN (1:1) e Bis-EDT/2-hidróxi-1-propanotiol.

[00260] 50. O método da modalidade 49, em que o composto de BT é selecionado dentre um ou mais de Bis-EDT, Bis-Bal, Bis-Pyr, Bis-Ery, Bis-Tol, Bis-BDT ou Bis-EDT/2-hidróxi-1-propanotiol.

[00261] 51. O método da modalidade 50, em que o composto de BT é BisEDT.

[00262] 52. O método da modalidade 50, em que o composto de BT é BisBDT ou BisBAL.

[00263] 53. O método de qualquer uma das modalidades 1 a 52, em que a quantidade total da composição de BT administrada à região profunda do pulmão é de aproximadamente 0,25 mg a aproximada-

mente 15 mg, de aproximadamente 0,4 mg a aproximadamente 15 mg, de aproximadamente 0,6 mg a aproximadamente 15 mg, de aproximadamente 0,8 mg a aproximadamente 15 mg, de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 10 mg, de 2,5 mg a aproximadamente 10 mg, de aproximadamente 4 mg a aproximadamente 10 mg, de aproximadamente 5 mg a aproximadamente 10 mg, de aproximadamente 6 mg a aproximadamente 10 mg, 0,6 mg a aproximadamente 6 mg, de aproximadamente 4 mg a aproximadamente 15 mg, de aproximadamente 6 mg a aproximadamente 15 mg, de aproximadamente 50 µg a aproximadamente 750 µg, de aproximadamente 75 µg a aproximadamente 500 µg, de aproximadamente 100 µg a aproximadamente 250 µg, de aproximadamente 100 µg a aproximadamente 150 µg, ou de aproximadamente 75 µg a aproximadamente 150 µg.

[00264] 54. O método da modalidade 53, em que a região profunda do pulmão são os alvéolos pulmonares profundos.

[00265] 55. Um aerossol que compreende uma pluralidade de gotículas líquidas dispersas em um gás, sendo que as referidas gotículas líquidas compreendem uma composição de BT que compreende pelo menos um composto de BT suspenso na mesma, em que o composto de BT compreende bismuto e/ou um sal de bismuto e um composto que contém tiol; e

em que pelo menos 60%, 65%, 70, 75%, 80%, 90% ou 95% das gotículas líquidas têm um diâmetro aerodinâmico mediano de massa (MMAD) de aproximadamente 0,4 µm a aproximadamente 5 µm.

[00266] 56. O aerossol da modalidade 55, em que as gotículas líquidas têm um MMAD de aproximadamente 0,4 µm a aproximadamente 7 µm, ou de aproximadamente 0,5 µm a aproximadamente 5 µm, ou de aproximadamente 0,7 µm a aproximadamente 4 µm, ou de aproximadamente 0,7 µm a aproximadamente 3,5 µm, ou de aproxima-

mente 0,8 µm a aproximadamente 3,5 µm, ou de aproximadamente 0,9 µm a aproximadamente 3,5 µm, ou de aproximadamente 0,9 µm a aproximadamente 3 µm, ou de aproximadamente 0,8 µm a aproximadamente 1,8 µm, ou de aproximadamente 0,8 µm a aproximadamente 1,6 µm, ou de aproximadamente 0,9 µm a aproximadamente 1,4 µm, ou de aproximadamente 1,0 µm a aproximadamente 2,0 µm, ou de aproximadamente 1,0 µm a aproximadamente 1,8 µm.

[00267] 57. O aerossol da modalidade 56, em que as gotículas líquidas têm um MMAD de aproximadamente 0,8 µm a aproximadamente 1,6 µm, ou de aproximadamente 0,9 µm a aproximadamente 3,5 µm, ou de aproximadamente 0,9 µm a aproximadamente 3 µm, ou de aproximadamente 0,9 µm a aproximadamente 1,4 µm, ou de aproximadamente 1,0 µm a aproximadamente 2,0 µm, ou de aproximadamente 1,0 µm a aproximadamente 1,8 µm.

[00268] 58. O aerossol de qualquer uma das modalidades 55 a 57, em que a pluralidade de gotículas líquidas tem um D90 inferior a aproximadamente 5 µm.

[00269] 59. O aerossol da modalidade 58, em que a pluralidade de gotículas líquidas tem um D90 inferior a aproximadamente 3 µm.

[00270] 60. O aerossol de qualquer uma das modalidades 55 a 59, em que a pluralidade de gotículas líquidas é dispersa em uma fase de gás contínua.

[00271] 61. O aerossol de qualquer uma das modalidades 55 a 60, em que o composto de BT compreende bismuto e/ou um sal de bismuto associado de maneira covalente e/ou em um complexo de coordenação com um ou mais compostos que contêm tiol.

[00272] 62. O aerossol de qualquer uma das modalidades 55 a 61, em que o sal de bismuto é nitrato de bismuto, subnitrato de bismuto ou cloreto de bismuto.

[00273] 63. O aerossol de qualquer uma das modalidades 55 a 62,

em que o composto que contém tiol compreende um ou mais agentes selecionados dentre 1,2-etano ditiol, 2,3-dimercaptopropanol, piritiona, ditioeritritol, 3,4 dimercaptotolueno, 2,3- butanoditiol, 1,3-propanoditiol, 2-hidroxiopropanotiol, 1-mercaptopropanol, ditioeritritol, ditiotreitól, cisteamina e ácido alfa-lipoico.

[00274] 64. O aerossol de qualquer uma das modalidades 55 a 63, em que a composição BT compreende um ou mais compostos de BT selecionados dentre BisBAL, BisEDT, Bis-dimercaprol, BisDTT, Bis-2-mercaptopropanol, Bis-DTE, Bis-Pyr, Bis-Ery, Bis-Tol, Bis-BDT, Bis-PDT, Bis-Pyr/Bal, Bis-Pyr/BDT, BisPyr/EDT, Bis-Pyr/PDT, Bis-Pyr/Tol, Bis-Pyr/Ery, bismuto-1-mercaptopropanol, BisEDT/CSTMN (1:1), Bis-PYR/CSTMN (1:1), BisBAL/CSTMN (1:1), BisTOL/CSTMN (1:1) e Bis-EDT/2-hidróxi-1-propanotiol.

[00275] 65. O aerossol da modalidade 64, em que o composto de BT é selecionado dentre um ou mais de Bis-EDT, Bis-Bal, Bis-Pyr, Bis-Ery, Bis-Tol, Bis-BDT ou Bis-EDT/2-hidróxi-1-propanotiol.

[00276] 66. O aerossol da modalidade 65, em que o composto de BT é BisEDT.

[00277] 67. O aerossol da modalidade 55, em que o diâmetro aerodinâmico mediano de massa (MMAD) é determinado pelo tempo de voo do laser e/ou do impactador em cascata.

[00278] 68. O aerossol de qualquer uma das modalidades 55 a 67, em que o composto de BT está suspenso na gotícula de líquido.

[00279] 69. O aerossol da modalidade 68, em que o composto de BT é BisEDT.

[00280] 70. O aerossol de qualquer uma das modalidades 55 a 69, em que as gotículas compreendem adicionalmente Tween 80 (por exemplo, de aproximadamente 0,05% a aproximadamente 1%) e opcionalmente

um tampão (por exemplo, fosfato de sódio ou citrato de só-

dio) a um pH de aproximadamente 7,4; e/ou cloreto de sódio.

[00281] 71. O aerossol de qualquer uma das modalidades 55 a 70, em que, caso depositados na região profunda do pulmão, os compostos de BT têm uma meia-vida média de pelo menos 2 dias.

[00282] 72. O aerossol da modalidade 71, em que, caso depositados na região profunda do pulmão, os compostos de BT têm uma meia-vida média de pelo menos 4 dias.

[00283] 73. Um método para tratar, gerir ou atenuar a gravidade dos sintomas de fibrose cística (CF) e infecções em um indivíduo, em que o método compreende administrar ao indivíduo uma composição de bismuto-tiol (BT) que compreende pelo menos um composto de BT, em que a composição é uma suspensão de micropartículas que têm um diâmetro volumétrico médio (VMD) de aproximadamente 0,4 µm a aproximadamente 5 µm e/ou um diâmetro aerodinâmico mediano de massa (MMAD) de aproximadamente 0,4 µm a aproximadamente 5 µm.

[00284] 74. O método da modalidade 73, em que o composto de BT é BisEDT.

[00285] 75. O método da modalidade 74, em que a composição de BT compreende BisEDT a uma concentração superior a aproximadamente 0,1 mg/ml, Tween 80® a aproximadamente 0,05% a aproximadamente 1,0%, cloreto de sódio a aproximadamente 0,05 a 40 mM e, opcionalmente, fosfato de sódio a aproximadamente 2 a 20 mM a aproximadamente pH 7,4.

[00286] 76. O método da modalidade 75, em que a composição de BT compreende BisEDT a uma concentração superior a aproximadamente 0,25 mg/ml, Tween 80® aproximadamente 0,5%, cloreto de sódio a aproximadamente 10 mM e fosfato de sódio a aproximadamente 10 mM a aproximadamente pH 7,4.

[00287] 77. O método de qualquer uma das modalidades 73 a 76, em que, quando a composição de BT é submetida à aerossolização, em que as gotículas líquidas submetidas à aerossolização têm um MMAD de aproximadamente de aproximadamente 0,4 μm a aproximadamente 5 μm .

[00288] 78. O método da modalidade 77, em que pelo menos 60%, 65%, 70, 75%, 80%, 90% ou 95% das gotículas líquidas têm um MMAD de aproximadamente 0,4 μm a aproximadamente 7 μm , ou de aproximadamente 0,5 μm a aproximadamente 5 μm , ou de aproximadamente 0,7 μm a aproximadamente 4 μm , ou de aproximadamente 0,7 μm a aproximadamente 3,5 μm , ou de aproximadamente 0,8 μm a aproximadamente 3,5 μm , ou de aproximadamente 0,9 μm a aproximadamente 3,5 μm , ou de aproximadamente 0,9 μm a aproximadamente 3 μm , ou de aproximadamente 0,8 μm a aproximadamente 1,8 μm , ou de aproximadamente 0,8 μm a aproximadamente 1,6 μm , ou de aproximadamente 0,9 μm a aproximadamente 1,4 μm , ou de aproximadamente 1,0 μm a aproximadamente 2,0 μm , ou de aproximadamente 1,0 μm a aproximadamente 1,8 μm .

[00289] 79. O método da modalidade 78, em que as gotículas líquidas têm um MMAD de aproximadamente 0,8 μm a aproximadamente 1,6 μm , ou de aproximadamente 0,9 μm a aproximadamente 3,5 μm , ou de aproximadamente 0,9 μm a aproximadamente 3 μm , ou de aproximadamente 0,9 μm a aproximadamente 1,4 μm , ou de aproximadamente 1,0 μm a aproximadamente 2,0 μm , ou de aproximadamente 1,0 μm a aproximadamente 1,8 μm .

[00290] 80. O método de qualquer uma das modalidades 77 a 79, em que a pluralidade de gotículas líquidas tem um D90 inferior a aproximadamente 3 μm .

[00291] 81. O método da modalidade 80, em que a pluralidade de gotículas líquidas tem um D90 inferior a aproximadamente 2 μm .

[00292] 82. O método de qualquer uma das modalidades 77 a 81, em que a pluralidade de gotículas líquidas é dispersa em uma fase gasosa contínua.

[00293] 83. O método de qualquer uma das modalidades 77 a 82, em que o composto de BT compreende bismuto e/ou um sal de bismuto associado de maneira covalente e/ou em um complexo de coordenação com um ou mais compostos que contêm tiol.

[00294] 84. O método de qualquer uma das modalidades 77 a 83, em que o sal de bismuto é nitrato de bismuto, subnitrato de bismuto ou cloreto de bismuto.

[00295] 85. O método de qualquer uma das modalidades 77 a 84, em que o composto que contém tiol compreende um ou mais agentes selecionados dentre 1,2-etano ditiol, 2,3-dimercaptopropanol, piritiona, ditioeritritol, 3,4 dimercaptotolueno, 2,3- butanoditiol, 1,3-propanoditiol, 2-hidroxipropanotiol, 1-mercaptop-2-propanol, ditioeritritol, ditiotreitól, cisteamina e ácido alfa-lipoico.

[00296] 86. O método de qualquer uma das modalidades 77 a 85, em que a composição BT compreende um ou mais compostos de BT selecionados dentre BisBAL, BisEDT, Bis-dimercaprol, BisDTT, Bis-2-mercaptopetanol, Bis-DTE, Bis-Pyr, Bis-Ery, Bis-Tol, Bis-BDT, Bis-PDT, Bis-Pyr/Bal, Bis-Pyr/BDT, BisPyr/EDT, Bis-Pyr/PDT, Bis-Pyr/Tol, Bis-Pyr/Ery, bismuto-1-mercaptop-2-propanol, BisEDT/CSTMN (1:1), Bis-PYR/CSTMN (1:1), BisBAL/CSTMN (1:1), BisTOL/CSTMN (1:1) e Bis-EDT/2-hidróxi-1-propanotiol.

[00297] 87. O método da modalidade 86, em que o composto de BT é selecionado dentre um ou mais de Bis-EDT, Bis-Bal, Bis-Pyr, Bis-Ery, Bis-Tol, Bis-BDT ou Bis-EDT/2-hidróxi-1-propano tiol.

[00298] 88. O método da modalidade 87, em que o composto de BT é BisEDT.

[00299] 89. O método da modalidade 87, em que o composto de BT

é BisBDT ou BisBAL.

[00300] 90. O método de qualquer uma das modalidades 77 a 89, em que a quantidade total da composição de BT administrada à região profunda do pulmão é de aproximadamente 0,25 mg a aproximadamente 15 mg, de aproximadamente 0,4 mg a aproximadamente 15 mg, de aproximadamente 0,6 mg a aproximadamente 15 mg, de aproximadamente 0,8 mg a aproximadamente 15 mg, de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 10 mg, de 2,5 mg a aproximadamente 10 mg, de aproximadamente 4 mg a aproximadamente 10 mg, de aproximadamente 5 mg a aproximadamente 10 mg, de aproximadamente 6 mg a aproximadamente 10 mg, 0,6 mg a aproximadamente 6 mg, de aproximadamente 4 mg a aproximadamente 15 mg, de aproximadamente 6 mg a aproximadamente 15 mg, de aproximadamente 50 µg a aproximadamente 750 µg, de aproximadamente 75 µg a aproximadamente 500 µg, de aproximadamente 100 µg a aproximadamente 250 µg, de aproximadamente 100 µg a aproximadamente 150 µg, ou de aproximadamente 75 µg a aproximadamente 150 µg.

[00301] 91. O método da modalidade 90, em que a região profunda do pulmão são os alvéolos pulmonares profundos.

[00302] 92. O método de qualquer uma das modalidades 77 a 91, em que a quantidade total da composição de BT compreende BisEDT administrado aos alvéolos pulmonares profundos é de aproximadamente 0,6 mg a aproximadamente 6 mg.

[00303] 93. O método de qualquer uma das modalidades 77 a 92, em que a composição é submetida à aerossolização por meio de um nebulizador.

[00304] 94. O método da modalidade 93, em que o nebulizador é um nebulizador de jato.

[00305] 95. O método da modalidade 94, em que o nebulizador de jato é um nebulizador de jato Pari LC Plus ou nebulizador de jato Pari

LC SPRINT.

[00306] 96. O método de qualquer uma das modalidades 93 a 95, em que o nebulizador tem uma pressão de entrada de aproximadamente 0,07 a aproximadamente 0,28 MPa (aproximadamente 10 a aproximadamente 40 psig).

[00307] 97. O método de qualquer uma das modalidades 93 a 96, em que o fluxo de entrada é de aproximadamente 3 l/min a aproximadamente 8 l/min.

[00308] 98. O método de qualquer uma das modalidades 93 a 97, em que o fluxo de ar de exaustão é de aproximadamente 3 l/min a aproximadamente 8 l/min.

[00309] 99. Um método para tratar, gerir ou atenuar a gravidade dos sintomas e infecções associados a uma ou mais doenças pulmonares ou infecções em um indivíduo, em que o método compreende administrar ao indivíduo de uma composição de bismuto-tiol (BT) que compreende pelo menos um composto de BT.

[00310] 100. O método da modalidade 99, em que uma ou mais doenças pulmonares ou infecções não são o resultado de fibrose cística ou não estão associadas à mesma.

[00311] 101. O método da modalidade 99 ou 100, em que o indivíduo tem pelo menos uma infecção pulmonar e, caso tenha duas ou mais infecções pulmonares, as infecções são ou simultâneas ou estão em ordem sucessiva.

[00312] 102. O método da modalidade 100 ou 101, em que a infecção pulmonar é em um pulmão.

[00313] 103. O método de qualquer uma das modalidades 100 a 102, em que a infecção pulmonar ocorre em ambos os pulmões.

[00314] 104. O método de qualquer uma das modalidades 100 a 103, em que a infecção pulmonar ocorre em um ou mais dentre os três lóbulos do pulmão direito.

[00315] 105. O método de qualquer uma das modalidades 100 a 104, em que a infecção pulmonar é em um ou ambos os lóbulos do pulmão esquerdo.

[00316] 106. O método de qualquer uma das modalidades 100 a 105, em que a infecção pulmonar é infecção por bronquiectasia, pneumonia, febre do vale, aspergilose broncopulmonar alérgica (AB-PA), pneumonia associada à ventilação mecânica, pneumonia adquirida em hospital, pneumonia adquirida na comunidade, traqueobronquite associada à ventilação mecânica, infecção do trato respiratório inferior, *Mycobacteria* não tuberculosa, antraz, legionelose, coqueluche, bronquite, bronquiolite, infecção associada à DPOC e pós-transplante pulmonar.

[00317] 107. O método de qualquer uma das modalidades 100 a 106, em que a infecção pulmonar contém um ou mais patógenos bacterianos ou fúngicos.

[00318] 108. O método de qualquer uma das modalidades 101 a 107, em que a infecção pulmonar é uma infecção pulmonar relacionada à CF.

[00319] 109. O método da modalidade 108 que compreende o tratamento da infecção pulmonar relacionada à CF.

[00320] 110. O método da modalidade 108 que compreende gerir a infecção pulmonar relacionada à CF.

[00321] 111. O método da modalidade 108 que compreende atenuar a gravidade da infecção pulmonar relacionada à CF.

[00322] 112. O método de qualquer uma das modalidades 100 a 111, em que a infecção pulmonar está localizada na mucosa pulmonar, nos brônquios e/ou nos bronquíolos ou sobre os mesmos.

[00323] 113. O método de qualquer uma das modalidades 100 a 111, em que a infecção pulmonar está localizada na superfície ou dentro de um biofilme bacteriano, bactérias agregadas, um biofilme fúngi-

co ou fungos agregados.

[00324] 114. O método de qualquer uma das modalidades 100 a 111, em que a infecção pulmonar está localizada no esputo.

[00325] 115. O método de qualquer uma das modalidades 107 a 114, em que o patógeno bacteriano compreende uma ou mais bactérias gram-positivas e bactérias gram-negativas.

[00326] 116. O método de qualquer uma das modalidades 107 a 115, em que o patógeno bacteriano compreende um ou mais dentre um biofilme bacteriano e bactérias planctônicas.

[00327] 117. O método da modalidade 116, em que o método compreende pelo menos um dentre: (i) reduzir o biofilme bacteriano, (ii) impedir o crescimento do biofilme bacteriano e (iii) prevenir a reformação do biofilme bacteriano.

[00328] 118. O método de qualquer uma das modalidades 107 a 114, em que o patógeno fúngico compreende fungos planctônicos e/ou fungos de biofilme.

[00329] 119. O método de qualquer uma das modalidades 107 a 118, em que a composição de BT trata, gere ou atenua a gravidade da infecção pulmonar por meio um dentre ou por meio dos seguintes dois:

- prevenção da infecção por patógeno bacteriano ou patógeno fúngico; e

- redução do patógeno bacteriano ou fúngico; e/ou

- redução da viscosidade do esputo.

[00330] 120. O método de qualquer uma das modalidades 107 a 118, em que a composição de BT trata, gere ou atenua a gravidade da infecção pulmonar por um ou mais dentre:

- prevenção de elaboração de secreção de exotoxinas contra patógeno bacteriano ou fúngico;

- inibição de viabilidade celular ou proliferação celular de células planctônicas do patógeno bacteriano ou fúngico;

- inibição de formação de biofilme pelo patógeno bacteriano ou fúngico; e

- inibição da viabilidade de biofilme ou crescimento de biofilme de células de formação de biofilme do patógeno bacteriano ou fúngico.

[00331] 121. O método de qualquer uma das modalidades 107 a 120, em que um ou mais patógenos são selecionados dentre *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus lugdunensis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus milleri/anginosus*, *Streptococcus pyogenes*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Burkholderia spp.*, *Achromobacter xylosoxidans*, *Pandoraea sputorum*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Alcaligenes xylosoxidans*, *Haemophilus pittmaniae*, *Serratia marcescens*, *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida guilliermondii*, *Morganella morganii*, *Inquilinus limosus*, *Ralstonia mannitolilytica*, *Pandoraea apista*, *Pandoraea pnomensusa*, *Pandoraea sputorum*, *Bdellovibrio bacteriovorus*, *Bordetella bronchiseptica*, *Vampirovibrio chlorellavorus*, *Actinobacter baumannii*, *Cupriavidus metallidurans*, *Cupriavidus pauculus*, *Cupriavidus respiraculi*, *Delftia acidivorans*, *Exophiala dermatitidis*, *Herbaspirillum frisingense*, *Herbaspirillum seropedicae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pandoraea norimbergensis*, *Pandoraea pulmonicola*, *Pseudomonas mendocina*, *Pseudomonas pseudoalcaligenes*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas stutzeri*, *Ralstonia insidiosa*, *Ralstonia pickettii*, *Neisseria gonorrhoeae*, *E. Coli NDM-1 positiva*, *Enterobacter cloaca*, *E. faecium resistente à Vancomicina*, *E. faecalis resistente à Vancomicina*, *E. faecium*, *E. faecalis*, *S. agalactiae resistente à Clindamicina*, *S. agalactiae*, *Bacteroides fragilis*, *Clostridium difficile*, *Streptococcus pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis*, *Haemophilus haemolyticus*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Chlamydia pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Atopo-*

bium, *Sphingomonas*, *Saccharibacteria*, *Leptotrichia*, *Capnocytophaga*, *Oribacterium*, *Aquabacterium*, *Lachnoanaerobaculum*, *Campylobacter*, *Acinetobacter*; *Agrobacterium*; *Bordetella*; *Brevundimonas*; *Chryseobacterium*; *Delftia*; *Enterobacter*; *Klebsiella*; *Pandoraea*; *Pseudomonas*; *Ralstonia* e *Prevotella*.

[00332] 122. O método da modalidade 121, em que a micobactéria não tuberculosa é selecionada dentre *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium gordonae*, *Mycobacterium kansasii*, complexo *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium marinum*, *Mycobacterium terrae* e *Mycobacterium chelonii*.

[00333] 123. O método da modalidade 121, em que a *Burkholderia* spp. é selecionada dentre *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia multivorans*, *Burkholderia cenocepacia*, *Burkholderia stabilis*, *Burkholderia vietnamiensis*, *Burkholderia dolosa*, *Burkholderia ambifaria*, *Burkholderia anthina*, *Burkholderia pyrrocinia*, *Burkholderia gladioli*, *Burkholderia ubonensis*, *Burkholderia arboris*, *Burkholderia latens*, *Burkholderia lata*, *Burkholderia metallica*, *Burkholderia seminalis*, *Burkholderia contaminans*, e *Burkholderia diffusa*.

[00334] 124. O método da modalidade 121, em que um ou mais patógenos são selecionados dentre *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas aeruginosa* resistente a um único medicamento, *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* resistente a um único medicamento, *Staphylococcus aureus* resistente a medicamentos, *Staphylococcus aureus* resistente à metilicina, *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium avium*, *Haemophilus influenzae*, *Burkholderia cepacia*, *multivorans Burkholderia*, *Burkholderia cenocepacia*, *Burkholderia dolosa*, *Achromobacter xylosoxidans*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Staphylococcus epidermidis* e *Burkholderia vietnamiensis*.

[00335] 125. O método da modalidade 121, em que um ou mais patógenos são selecionados dentre *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*.

[00336] 126. O método de qualquer uma das modalidades 117, 118, ou 120, em que um ou mais patógenos são selecionados dentre biofilmes de *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cenocepacia*, complexo *Burkholderia cepacia*, *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium avium*, *Achromobacter spp.*, *Staphylococcus epidermidis*, *Stenotrophomonas maltophilia* e *Staphylococcus aureus*.

[00337] 127. O método de acordo com a modalidade 125, em que *Pseudomonas aeruginosa* e/ou *Staphylococcus aureus* são multirresistentes.

[00338] 128. O método de qualquer uma das modalidades 107 a 127, em que um ou mais patógenos exibem resistência ou são refratários a um antibiótico selecionado dentre amicacina, aztreonam, metecilina, vancomicina, nafcilina, gentamicina, ampicilina, cloranfenicol, doxiciclina e tobramicina.

[00339] 129. O método da modalidade 128, em que o antibiótico é amicacina ou tobramicina.

[00340] 130. O método da modalidade 128, em que o patógeno bacteriano é *Staphylococcus aureus* resistente à metecilina.

[00341] 131. O método de qualquer uma das modalidades 99 a 130 que compreende adicionalmente coadministrar ou administrar em conjunto ao indivíduo um antibiótico selecionado dentre amicacina, tobramicina, gentamicina, piperacilina, mezlocilina, ticarcilina, imipenem, ciprofloxacina, ceftazidima, aztreonam, ceftazidima, aztreonam, dicloxacilina, amoxicilina, o trimetoprim-sulfametoxazol, cefalexina, piperacilina-tazobactam, linezolida, daptomicina, vancomicina, metronidazol, clindamicina, colistina, a tetraciclina, a levofloxacina, a amoxicilina e ácido clavulânico (Augmentin®).cloxacilina, dicloxacilina, cefdinir,

cefprozil, cefaclor, cefuroxima, eritromicina/sulfisoxazol, eritromicina, claritromicina, azitromicina, doxiciclina, minociclina, tigeciclina, imipenem, meropenem, colistimetato/colistina[®], metilicilina, oxacilina, nafcilina, carbenicilina, azlocilina, piperacilina e tazobactam (Zosyn[®]), cefepima, etambutol, rifampicina, e meropenem.

[00342] 132. O método da modalidade 131, em que o antibiótico é selecionado dentre meropenem, ceftazidima, tobramicina, amicacina, aztreonam, ciprofloxacina, colistina e levofloxacina.

[00343] 133. O método de qualquer uma das modalidades 107 a 120, em que o fungo patogênico é *Candida albicans*, *Candida albicans resistente a fármaco*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida guilliermondii*, *Candida auris*, *Candida tropicalis*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus fumigatus* e/ou *Aspergillus flavus*.

[00344] 134. O método de qualquer uma das modalidades 99 a 133 que compreende administrar a composição de BT por inalação, por via oral ou nasal, com o uso de um dispositivo de aerossol.

[00345] 135. O método da modalidade 134, em que o dispositivo de aerossol é um nebulizador.

[00346] 136. O método da modalidade 134 ou 135, em que a composição de BT está na forma de uma solução ou suspensão aquosa.

[00347] 137. O método de qualquer uma das modalidades 99 a 136, em que a composição de BT é administrada por via tópica ao tecido pulmonar.

[00348] 138. O método de qualquer uma das modalidades 99 a 137, em que

a composição de BT é administrada com uma dosagem de aproximadamente 0,25 mg/ml a aproximadamente 15 mg/ml, de aproximadamente 0,4 mg/ml a aproximadamente 15 mg/ml, de aproximadamente 0,6 mg/ml a aproximadamente 15 mg/ml, de aproximadamente 0,6 mg/ml a aproximadamente 100 mg/ml, de aproximadamente 5

mg/ml a aproximadamente 100 mg/ml, de aproximadamente 10 mg/ml a aproximadamente 100 mg/ml, de aproximadamente 25 mg/ml a aproximadamente 100 mg/ml, de aproximadamente 50 mg/ml a aproximadamente 100 mg/ml, de aproximadamente 0,8 mg/ml a aproximadamente 15 mg/ml, de aproximadamente 1 mg/ml a aproximadamente 10 mg/ml, de 2,5 mg/ml a aproximadamente 10 mg/ml, de aproximadamente 4 mg/ml a aproximadamente 10 mg/ml, de aproximadamente 5 mg/ml a aproximadamente 10 mg/ml, de aproximadamente 6 mg/ml a aproximadamente 10 mg/ml, 0,6 mg/ml a aproximadamente 6 mg/ml, de aproximadamente 4 mg/ml a aproximadamente 15 mg/ml, de aproximadamente 6 mg/ml a aproximadamente 15 mg/ml, de aproximadamente 50 µg/ml a aproximadamente 750 µg/ml, de aproximadamente 75 µg/ml a aproximadamente 500 µg/ml, de aproximadamente 100 µg/ml a aproximadamente 250 µg/ml, de aproximadamente 100 µg/ml a aproximadamente 150 µg/ml ou de aproximadamente 75 µg/ml a aproximadamente 150 µg/ml; e/ou

a quantidade total da composição de BT administrada aos pulmões é de aproximadamente 0,25 mg a aproximadamente 15 mg, de aproximadamente 0,4 mg a aproximadamente 15 mg, de aproximadamente 0,6 mg a aproximadamente 15 mg, de aproximadamente 0,8 mg a aproximadamente 15 mg, de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 10 mg, de 2,5 mg a aproximadamente 10 mg, de aproximadamente 4 mg a aproximadamente 10 mg, de aproximadamente 5 mg a aproximadamente 10 mg, de aproximadamente 6 mg a aproximadamente 10 mg, 0,6 mg a aproximadamente 6 mg, de aproximadamente 4 mg a aproximadamente 15 mg, de aproximadamente 6 mg a aproximadamente 15 mg, de aproximadamente 50 µg a aproximadamente 750 µg, de aproximadamente 75 µg a aproximadamente 500 µg, de aproximadamente 100 µg a aproximadamente 250 µg, de aproximadamente 100 µg a aproximadamente 150 µg ou de aproximada-

mente 75 µg a aproximadamente 150 µg.

[00349] 139. O método de qualquer uma das modalidades 99 a 138, em que a composição de BT é administrada com uma dosagem de aproximadamente 0,6 mg/ml a aproximadamente 6 mg/ml.

[00350] 140. O método de qualquer uma das modalidades 99 a 139, em que a composição de BT é administrada três vezes ao dia, duas vezes ao dia, uma vez ao dia, a cada dois dias, uma vez a cada três dias, uma vez por semana, uma vez a cada duas semanas uma vez por mês até uma vez a cada dois meses.

[00351] 141. O método da modalidade 140, em que a composição de BT é administrada uma vez por semana.

[00352] 142. O método de qualquer uma das modalidades 99 a 141, em que um ou mais dos seguintes sintomas são diminuídos em gravidade no indivíduo: tosse, respiração ofegante, falta de ar, bronquiectasia, pólipos nasais, hemoptise, insuficiência respiratória e exacerbação pulmonar.

[00353] 143. O método de qualquer uma das modalidades 99 a 142, em que a composição de bismuto-tiol compreende uma pluralidade de micropartículas que compreendem um composto de bismuto-tiol (BT), em que substancialmente todas as ditas micropartículas têm um diâmetro volumétrico médio de aproximadamente 0,4 µm a aproximadamente 5 µm, e em que o composto de BT compreende bismuto ou um sal de bismuto e um composto que contém tiol.

[00354] 144. O método da modalidade 143, em que pelo menos 60%, 65%, 70, 75%, 80%, 90% ou 95% das micropartículas têm um diâmetro volumétrico médio de aproximadamente 0,4 µm a aproximadamente 3 µm, ou de aproximadamente 0,5 µm a aproximadamente 2 µm, ou de aproximadamente 0,7 µm a aproximadamente 2 µm, ou de aproximadamente 0,8 µm a aproximadamente 1,8 µm, ou de aproximadamente 0,8 µm a aproximadamente 1,6 µm, ou de aproxima-

mente 0,9 µm a aproximadamente 1,4 µm, ou de aproximadamente 1,0 µm a aproximadamente 2,0 µm, ou de aproximadamente 1,0 µm a aproximadamente 1,8 µm.

[00355] 145. O método das modalidades 142 a 143, em que o sal de bismuto é nitrato de bismuto, subnitrato de bismuto ou cloreto de bismuto.

[00356] 146. O método das modalidades 142 a 143, em que o composto que contém tiol compreende um ou mais agentes selecionados dentre 1,2-etano ditiol, 2,3-dimercaptopropanol, piritiona, ditioeritritol, 3,4 dimercaptotolueno, 2,3-butanoditiol, 1,3-propanoditiol, 2-hidroxipropanotiol, 1-mercaptop-2-propanol, ditioeritritol, ditiotreitól, cisteamina e ácido alfa-lipoico.

[00357] 147. O método de qualquer uma das modalidades 143 a 146, em que a composição BT compreende um ou mais compostos de BT selecionados dentre BisBAL, BisEDT, Bis-dimercaprol, BisDTT, Bis-2-mercaptopetanol, Bis-DTE, Bis-Pyr, Bis-Ery, Bis-Tol, Bis-BDT, Bis-PDT, Bis-Pyr/Bal, Bis-Pyr/BDT, BisPyr/EDT, Bis-Pyr/PDT, Bis-Pyr/Tol, Bis-Pyr/Ery, bismuto-1-mercaptop-2-propanol, BisEDT/CSTMN (1:1), BisPYR/CSTMN (1:1), BisBAL/CSTMN (1:1), BisTOL/CSTMN (1:1) e Bis-EDT/2-hidróxi-1-propanotiol.

[00358] 148. O método da modalidade 147, em que o composto de BT é selecionado dentre um ou mais de Bis-EDT, Bis-Bal, Bis-Pyr, Bis-Ery, Bis-Tol, Bis-BDT ou Bis-EDT/2-hidróxi-1-propano tiol.

[00359] 149. O método da modalidade 148, em que o composto de BT é BisEDT.

[00360] 150. O método da modalidade 148, em que o composto de BT é BisBDT ou BisBAL.

[00361] 151. O método de qualquer uma das modalidades 99 a 150, em que a quantidade total da composição de BT administrada à região profunda do pulmão é de aproximadamente 0,25 mg a aproximada-

mente 15 mg, de aproximadamente 0,4 mg a aproximadamente 15 mg, de aproximadamente 0,6 mg a aproximadamente 15 mg, de aproximadamente 0,8 mg a aproximadamente 15 mg, de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 10 mg, de 2,5 mg a aproximadamente 10 mg, de aproximadamente 4 mg a aproximadamente 10 mg, de aproximadamente 5 mg a aproximadamente 10 mg, de aproximadamente 6 mg a aproximadamente 10 mg, 0,6 mg a aproximadamente 6 mg, de aproximadamente 4 mg a aproximadamente 15 mg, de aproximadamente 6 mg a aproximadamente 15 mg, de aproximadamente 50 µg a aproximadamente 750 µg, de aproximadamente 75 µg a aproximadamente 500 µg, de aproximadamente 100 µg a aproximadamente 250 µg, de aproximadamente 100 µg a aproximadamente 150 µg, ou de aproximadamente 75 µg a aproximadamente 150 µg.

[00362] 152. O método da modalidade 151, em que a região profunda do pulmão são os alvéolos pulmonares profundos.

[00363] 153. O aerossol de qualquer uma das modalidades 55 a 72, em que pelo menos 60%, 65%, 70, 75%, 80%, 90% ou 95% das micropartículas têm um diâmetro volumétrico médio de aproximadamente 0,6 µm a aproximadamente 2,5 µm.

[00364] 154. O aerossol da modalidade 153, em que substancialmente todas as micropartículas têm um VMD de cerca de 0,6 µm a aproximadamente 2,5 µm.

[00365] 155. O aerossol de qualquer uma das modalidades 55 a 72 ou 153 a 154, em que pelo menos 70% das partículas submetidas a aerossolização têm um MMAD de aproximadamente 0,9 µm a aproximadamente 3 µm.

[00366] 156. O aerossol de qualquer uma das modalidades 55 a 72 ou 153 a 155, em que a composição é uma suspensão de micropartículas que têm um diâmetro volumétrico médio (VMD) de aproximadamente 0,6 µm a aproximadamente 2,5 µm e/ou um diâmetro aerodi-

nâmico mediano de massa (MMAD) de aproximadamente 0,9 µm a aproximadamente 3 µm.

[00367] 157. O aerossol de qualquer uma das modalidades 55 a 72 ou 153 a 156, em que a composição de bismuto-tiol compreende uma pluralidade de micropartículas que compreendem um composto de bismuto-tiol (BT), em que substancialmente todas as referidas micropartículas têm um diâmetro volumétrico médio de aproximadamente 0,4 µm a aproximadamente 5 µm, e em que o composto de BT compreende bismuto ou um sal de bismuto e um composto que contém tiol.

[00368] 158. O aerossol de qualquer uma das modalidades 55 a 72 ou 153 a 157, em que, após a distribuição da composição em aerossol a um indivíduo, pelo menos 60%, 65%, 70, 75%, 80%, 90% ou 95% da dose do composto de BT é depositada no pulmão.

[00369] 159. O aerossol da modalidade 158, em que pelo menos 80% da dose do composto de BT é depositada no pulmão.

[00370] 160. O aerossol da modalidade 158, em que pelo menos 90% da dose do composto de BT é depositada no pulmão.

[00371] 161. O método de qualquer uma das modalidades 1 a 54 ou 73 a 152, em que pelo menos 60%, 65%, 70, 75%, 80%, 90% ou 95% das micropartículas têm um diâmetro volumétrico médio de aproximadamente 0,6 µm a aproximadamente 2,5 µm.

[00372] 162. O método da modalidade 161, em que substancialmente todas as micropartículas têm um VMD de aproximadamente 0,6 µm a aproximadamente 2,5 µm.

[00373] 163. O método de qualquer uma das modalidades 1 a 54, 73 a 152, ou 161 a 162, em que pelo menos 70% das partículas submetidas à aerossolização têm um MMAD de aproximadamente 0,9 µm a aproximadamente 3 µm.

[00374] 164. O método de qualquer uma das modalidades 1 a 54,

73 a 152, ou 161 a 163, em que a composição é uma suspensão de micropartículas que têm um diâmetro volumétrico médio (VMD) de aproximadamente 0,6 μm a aproximadamente 2,5 μm e/ou um diâmetro aerodinâmico mediano de massa (MMAD) de aproximadamente 0,9 μm a aproximadamente 3 μm .

[00375] 165. O método de qualquer uma das modalidades 1 a 54, 73 a 152, ou 161 a 164, em que a composição de bismuto-tiol compreende uma pluralidade de micropartículas que compreendem um composto de bismuto-tiol (BT), em que substancialmente todas as ditas micropartículas têm um diâmetro volumétrico médio de aproximadamente 0,4 μm a aproximadamente 5 μm , e em que o composto de BT compreende bismuto ou um sal de bismuto e um composto que contém tiol.

[00376] 166. O método de qualquer uma das modalidades 1 a 54, 73 a 152, ou 161 a 165, em que, caso depositados no pulmão (por exemplo, a região profunda do pulmão), os compostos de BT têm uma meia-vida média de pelo menos 2 dias.

[00377] 167. O método de qualquer uma das modalidades 166, em que, caso depositados na região profunda do pulmão, os compostos de BT têm uma meia-vida média de pelo menos 4 dias.

[00378] 168. O método de qualquer uma das modalidades 1 a 54, 73 a 152, ou 161 a 167, em que, após a distribuição da composição em aerossol a um indivíduo, pelo menos 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 90% ou 95% da dose do composto de BT é depositada no pulmão.

[00379] 169. O aerossol da modalidade 168, em que pelo menos 80% da dose do composto de BT é depositada no pulmão.

[00380] 170. O aerossol da modalidade 168, em que pelo menos 90% da dose do composto de BT é depositada no pulmão.

[00381] 171. Um método para tratar, gerir ou atenuar a gravidade dos sintomas de fibrose cística (CF) e infecções em um indivíduo, em

que o método compreende administrar ao indivíduo uma composição de bismuto-tiol (BT) que compreende BisEDT suspenso na mesma, em que a administração da composição de BT ocorre por inalação, por via oral ou nasal, com o uso de um dispositivo de aerossol.

[00382] 172. O método da modalidade 171, em que a composição de BT compreende uma pluralidade de micropartículas em que pelo menos 70% das ditas micropartículas têm um diâmetro volumétrico médio (VMD) de aproximadamente 0,6 µm a aproximadamente 2,5 µm.

[00383] 173. O método da modalidade 172, em que pelo menos 80% das referidas micropartículas têm um VMD de aproximadamente 0,6 µm a aproximadamente de 2,5 µm.

[00384] 174. O método da modalidade 172, em que pelo menos 90% das referidas micropartículas têm um VMD de aproximadamente 0,6 µm a aproximadamente de 2,5 µm.

[00385] 175. O método da modalidade 172, em que, quando a composição de BT é submetida à aerossolização, pelo menos 70% das gotículas líquidas submetidas à aerossolização têm um diâmetro aerodinâmico mediano de massa (MMAD) de aproximadamente 0,9 µm a aproximadamente 3 µm.

[00386] 176. O método da modalidade 173, em que, quando a composição de BT é submetida à aerossolização pelo menos 80% das gotículas líquidas submetida à aerossolização têm um MMAD de aproximadamente 0,9 µm a aproximadamente 3 µm.

[00387] 177. O método da modalidade 174, em que, quando a composição de BT é submetida à aerossolização pelo menos 90% das gotículas líquidas submetida à aerossolização têm um MMAD de aproximadamente 0,9 µm a aproximadamente 3 µm.

[00388] 178. O método da modalidade 171, em que a composição de BT compreende BisEDT a uma concentração superior a aproximadamente 0,1 mg/ml, Tween 80® a aproximadamente 0,05% a aproxi-

madamente 1,0%, cloreto de sódio a aproximadamente 0,05 a 40 mM e, opcionalmente, fosfato de sódio a aproximadamente 2 a 20 mM a aproximadamente pH 7,4.

[00389] 179. O método da modalidade 171, em que, caso depositados na região profunda do pulmão, os compostos BisEDT têm uma meia-vida média de aproximadamente 4 dias.

[00390] 180. O método da modalidade 171, em que o indivíduo tem pelo menos uma infecção pulmonar que contém um ou mais patógenos bacterianos e/ou patógenos fúngicos.

[00391] 181. O método da modalidade 180, em que o método compreende pelo menos um dentre: (i) reduzir um biofilme bacteriano, (ii) impedir o crescimento de um biofilme bacteriano, (iii) prevenir a formação inicial do biofilme bacteriano e/ou (iv) prevenir a reformação do biofilme bacteriano.

[00392] 182. O método da modalidade 180, em que um ou mais patógenos são selecionados dentre *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus lugdunensis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus milleri/anginosus*, *Streptococcus pyogenes*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Burkholderia spp.*, *Achromobacter xylosoxidans*, *Pandoraea sputorum*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Alcaligenes xylosoxidans*, *Haemophilus pittmaniae*, *Serratia marcescens*, *Candida albicans*, *Candida albicans* resistente a fármacos, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida guilliermondii*, *Candida auris*, *Candida tropicalis*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Morganella morganii*, *Inquilinus limosus*, *Ralstonia mannitolilytica*, *Pandoraea apista*, *Pandoraea pnomenusa*, *Pandoraea sputorum*, *Bdellovibrio bacteriovorus*, *Bordetella bronchiseptica*, *Vampirovibrio chlorellavorus*, *Actinobacter baumannii*, *Cupriavidus metallidurans*, *Cupriavidus pauculus*, *Cupriavidus respiraculi*,

Delftia acidivorans, *Exophilia dermatitidis*, *Herbaspirillum frisingense*, *Herbaspirillum seropedicae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pandoraea norimbergensis*, *Pandoraea pulmonicola*, *Pseudomonas mendocina*, *Pseudomonas pseudoalcaligenes*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas stutzeri*, *Ralstonia insidiosa*, *Ralstonia pickettii*, *Neisseria gonorrhoeae*, *E. Coli* NDM-1 positiva, *Enterobacter cloaca*, *E. faecium* resistente à vancomicina, *E. faecalis* resistente à vancomicina, *E. faecium*, *E. faecalis*, *S. agalactiae* resistente à clindamicina, *S. agalactiae*, *Bacteroides fragilis*, *Clostridium difficile*, *Streptococcus pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis*, *Haemophilus haemolyticus*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Chlamydophila pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Atopobium*, *Sphingomonas*, *Saccharibacteria*, *Leptotrichia*, *Capnocytophaga*, *Oribacterium*, *Aquabacterium*, *Lachnoanaerobaculum*, *Campylobacter*, *Acinetobacter*; *Agrobacterium*; *Bordetella*; *Brevundimonas*; *Chryseobacterium*; *Delftia*; *Enterobacter*; *Klebsiella*; *Pandoraea*; *Pseudomonas*; *Ralstonia*, e *Prevotella*.

[00393] 183. Um aerossol que compreende uma pluralidade de gotículas líquidas dispersas em um gás, em que as referidas gotículas líquidas compreendem uma composição de BT que compreende um composto BisEDT suspenso nas mesmas; e

em que pelo menos 70% das gotículas líquidas têm um MMAD de aproximadamente de aproximadamente 0,9 µm a aproximadamente 3 µm.

[00394] 184. O aerossol da modalidade 183, em que antes de ser submetida à aerossolização, a composição de BT compreende uma pluralidade de micropartículas em que pelo menos 70% das ditas micropartículas têm um VMD de aproximadamente 0,6 µm a aproximadamente 2,5 µm.

[00395] 185. O aerossol da modalidade 183, em que pelo menos 80% das gotículas líquidas têm um MMAD de aproximadamente de

aproximadamente 0,9 μm a aproximadamente 3 μm .

[00396] 186. O aerossol da modalidade 183, em que pelo menos 90% das gotículas líquidas têm um MMAD de aproximadamente de aproximadamente 0,9 μm a aproximadamente 3 μm .

[00397] 187. O aerossol da modalidade 185, em que antes de ser submetida à aerossolização, a composição de BT compreende uma pluralidade de micropartículas em que pelo menos 80% das ditas micropartículas têm um VMD de aproximadamente 0,6 μm a aproximadamente 2,5 μm .

[00398] 188. O aerossol da modalidade 186, em que antes de ser submetida à aerossolização, a composição de BT compreende uma pluralidade de micropartículas em que pelo menos 90% das ditas micropartículas têm um VMD de aproximadamente 0,6 μm a aproximadamente 2,5 μm .

[00399] 189. O aerossol da modalidade 183, em que as gotículas compreendem adicionalmente Tween 80 (por exemplo, de aproximadamente 0,05% a aproximadamente 1%) e opcionalmente um tampão (por exemplo, fosfato de sódio ou citrato de sódio) a um pH de aproximadamente 7,4; e/ou cloreto de sódio.

[00400] 190. O aerossol da modalidade 183, em que, caso depositados na região profunda do pulmão, os compostos BisEDT têm uma meia-vida média de mais de 2 dias.

[00401] 191. O aerossol da modalidade 183, em que, caso depositados na região profunda do pulmão, os compostos BisEDT têm uma meia-vida média de aproximadamente 4 dias.

[00402] 193. Uma composição farmacêutica que compreende a composição de bismuto-tiol (BT) que compreende BisEDT suspenso na mesma, em que a composição de BT compreende uma pluralidade de micropartículas, em que o D90 das ditas micropartículas é inferior ou igual a 1,9 μm .

[00403] 194. Uma composição farmacêutica que compreende a composição de bismuto-tiol (BT) que compreende BisEDT suspenso na mesma, sendo que a composição de BT compreende uma pluralidade de micropartículas, em que o D90 das referidas micropartículas é inferior ou igual a aproximadamente 1,6 μm .

[00404] 195. A composição farmacêutica da modalidade 193, em que pelo menos 70% das ditas micropartículas que têm um diâmetro volumétrico médio de aproximadamente 0,6 μm a aproximadamente 2,5 μm .

[00405] 196. A composição farmacêutica da modalidade 193, em que pelo menos 90% das ditas micropartículas que têm um diâmetro volumétrico médio de aproximadamente 0,6 μm a aproximadamente 2,5 μm .

[00406] 197. Um método para tratar, gerir ou atenuar a gravidade de sintomas e infecções associados a uma ou mais doenças ou infecções pulmonares em um indivíduo, em que o método compreende administrar ao indivíduo uma composição de bismuto-tiol (BT) que compreende BisEDT, em que a composição de BT compreende uma pluralidade de micropartículas em que pelo menos 70% das ditas micropartículas têm um diâmetro volumétrico médio de aproximadamente 0,6 μm a aproximadamente 2,5 μm , em que quando a composição de BT é submetida à aerossolização, pelo menos 70% das gotículas líquidas submetidas à aerossolização têm um MMAD de aproximadamente de aproximadamente 0,9 μm a aproximadamente 3 μm .

[00407] 198. O método da modalidade 197, em que uma ou mais doenças pulmonares ou infecções não são o resultado de fibrose cística ou não estão associadas à mesma.

[00408] 199. O método da modalidade 198, em que a infecção pulmonar é infecção por bronquiectasia, pneumonia, febre do vale, aspergilose broncopulmonar alérgica (ABPA), pneumonia associada à

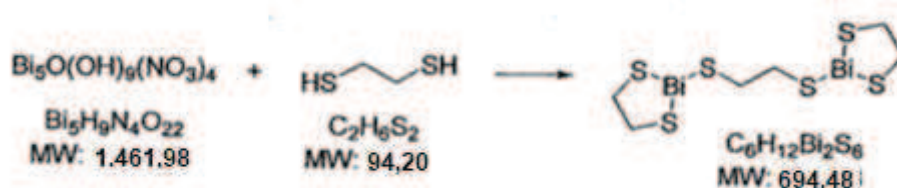
ventilação mecânica, pneumonia adquirida em hospital, pneumonia adquirida na comunidade, traqueobronquite associada à ventilação mecânica, infecção do trato respiratório inferior, *Mycobacterianão* tuberculosa, antraz, legionelose, coqueluche, bronquite, bronquiolite, infecção associada à DPOC e pós-transplante pulmonar.

EXEMPLOS

[00409] Os exemplos a seguir são fornecidos para ilustrar a presente invenção, e não devem ser interpretados como limitantes da mesma. Procedimentos experimentais e detalhes adicionais podem ser encontrados nos Pedidos de Patente Internacional nº PCT/US2010/023108, PCT/US2011/023549, e PCT/US2011/047490, os quais são incorporados ao presente documento a título de referência, em suas totalidades, com todos os propósitos.

EXEMPLO 1: SÍNTESE GERAL DE BIS-EDT

[00410] Os materiais e reagentes iniciais usados no preparo destes compostos estão disponíveis a partir do fornecedor comercial, como Aldrich Chemical Co., Bachem, etc., ou podem ser produzidos por métodos bem conhecidos na técnica. Os materiais iniciais e os intermediários e os produtos finais da reação podem ser isolados e purificados se desejável com o uso de técnicas convencionais, incluindo, mas sem limitação, filtração, destilação, cristalização, cromatografia, e semelhantes e podem ser caracterizados pelo uso de meios convencionais, incluindo constantes físicas e dados espectrais. A menos que especificado de outro modo, as reações descritas no presente documento ocorrem em pressão atmosférica por uma faixa de temperatura de aproximadamente -78 °C a aproximadamente 150 °C.



[00411] Bismuto-1,2-etanoditiol (Bis-EDT, preparação de bismuto

solúvel) microparticulado foi preparado conforme o seguinte: A um excesso (11,4 L) de HNO_3 aquoso 5% à temperatura ambiente em um garrafão de polipropileno de 15 L foi lentamente adicionado por gotejamento 0,331 l (~0,575 moles) de uma solução de $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$ aquosa (43% $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$ (p/p), ácido nítrico 5% (p/p), água 52% (p/p), Shepherd Chemical Co., Cincinnati, OH, produto nº 2362; $\delta \sim 1,6$ g/ml) com agitação, seguido por adição lenta de etanol absoluto (4 l). Algum precipitado branco foi formado, mas foi dissolvido por agitação contínua. Uma solução etanólica (~1,56 L, ~0,55 M) de 1,2-etanoditiol (CAS 540-63-6) foi separadamente preparada por adição, a 1,5 l de etanol absoluto, 72,19 ml (0,863 moles) de 1,2-etanoditiol com o uso de uma seringa de 60 ml e, então, agitação por cinco minutos. O reagente 1,2-etanoditiol/EtOH foi, então, levemente adicionado por gotejamento ao longo de cinco horas à solução de $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3/\text{HNO}_3$ aquosa, com agitação continuada de um dia para o outro. Permitiu-se que o produto formado repousasse como um precipitado por aproximadamente 15 minutos, após os quais o filtrado foi removido a 300 ml/min com o uso de uma bomba peristáltica. O produto foi, então, coletado por filtração em papel de filtro fino em um funil Buchner de 15 cm de diâmetro, e lavado sequencialmente com três volumes de 500 ml, cada um, de etanol, água USP, e acetona para obter BisEDT (694,51 gm/mole) como um sólido em pó amorfo amarelo. O produto foi colocado em uma garrafa de vidro âmbar de 500 ml e secado com CaCl_2 sob alto vácuo por 48 horas. O material recuperado (rendimento de cerca de 200 g) gerou um odor característico de tiol. O produto bruto foi redissolvido em 750 ml de etanol absoluto, agitado por 30 min, então, filtrado e lavado sequencialmente com 3 x 50 ml de etanol, 2 x 50 ml de acetona, e lavado novamente com 500 ml de acetona. O pó lavado novamente foi triturado em NaOH 1 M (500 ml), filtrado e lavado com 3 x 220 ml de água, 2 x 50 ml de etanol, e 1 x 400 ml de acetona para proporcionar 156,74

gm de BisEDT purificado. Lotes subsequentes preparados essencialmente da mesma maneira resultaram em rendimentos de aproximadamente 78 a 91%.

[00412] O produto foi caracterizado como tendo a estrutura mostrada acima por análise de dados de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C , espectroscopia infravermelha (IR), espectroscopia ultravioleta (UV), espectrometria de massa (MS) e análise elemental. Um método de HPLC foi distribuído para determinar a pureza química de BisEDT em que a amostra foi preparada em DMSO (0,5 mg/ml). O λ_{max} foi determinado por varredura de uma solução de BisEDT em DMSO entre 190 e 600 nm. A eluição de HPLC isocrática em 1 ml/min foi realizada à temperatura ambiente em uma fase móvel de ácido fórmico 0,1% em acetonitrila:água (9:1) em um cromatógrafo modelo 2695 Waters (Millipore Corp., Milford, MA) com detector UV em monitoração a 265 nm (λ_{max}), 2 μl de volume de injeção, equipado com uma coluna analítica YMC Pack PVC Sil NP, 5 μm , de 250X4,6 mm de diâmetro interno (Waters) e um pico único foi detectado, refletindo a pureza química de $100 \pm 0,1\%$. A análise elemental foi coerente com a estrutura de BisEDT conforme mostrado acima.

[00413] A matéria de particulado secada foi caracterizada por avaliar as propriedades de tamanho de partícula. Brevemente, micropartículas foram ressuspensas em Pluronic® F-68 2% (BASF, Mt. Olive, NJ) e a suspensão foi sonicada por 10 minutos em um sonicador de banho de água em definição padrão antes da análise com o uso de um analisador de partícula Nanosizer/Zetasizer Nano-S (modelo ZEN1600 (sem capacidade de medição de potencial zeta), Malvern Instruments, Worcestershire, UK) de acordo com as recomendações do fabricante. A partir de dados compilados de duas medições, micropartículas exibiram uma distribuição unimodal com todos os eventos detectáveis entre cerca de 0,6 microns e 4 microns em diâmetro médio volumétrico

(VMD) e que tem um VMD de pico em cerca de 1,3 microns.

EXEMPLO 2: PREPARAÇÃO DE BISMUTO-1-2-ETANODITIOL DE MICROPARTICULADO (BIS-EDT)

[00414] Bismuto-1,2-etanoditiol (Bis-EDT) microparticulado foi preparado conforme o seguinte: Água (25,5 l) e ácido nítrico 70% (1.800 ml) foram misturados em um reator Nalgene. Então, água (2.300 ml) foi adicionada a um frasco Erlenmeyer, seguido por subnitrato de bismuto (532 g), e a mistura foi agitada. À mistura, foram adicionados ácido nítrico 70% (750 ml) para obter uma solução limpa. Esta solução foi transferida para o reator Nalgene e a mistura resultante foi agitada por 20 min. Então, 9,5 l de EtOH 95% foram adicionados ao reator em três porções.

[00415] Separadamente, 1,2-etanoditiol, 98%, (229 ml) foi adicionado a uma garrafa seguido por duas porções de EtOH de 250 ml com agitação. 5 l adicionais de EtOH foram adicionados à garrafa com agitação. A solução de 1,2-etanoditiol foi, então, adicionada ao reator por cerca de 4 horas durante a agitação. Após a agitação por 18 horas, permitiu-se que os sólidos repousassem por 2 horas. EtOH (20 l) foi adicionado e a mistura agitada por 24 horas. Permitiu-se que os sólidos repousassem por 1,5 horas, então, separados por filtração da mistura, seguidos por enxague com EtOH.

[00416] Ao reator vazio foram adicionados 9 l de EtOH e os sólidos filtrados, que foram agitados por 18 horas. Permitiu-se que os sólidos repousassem por 1 hora, então, foram separados por filtração da mistura, seguido por enxague com EtOH. A seguir, o reator vazio foi carregado com 9 l de acetona, 99,5%, e os sólidos filtrados, que foram agitados por 15 horas. Permitiu-se que os sólidos repousassem por 1,5 horas, então, separados por filtração da mistura, seguidos por enxague com acetona. Novamente, o reator vazio foi carregado com 9 l de acetona, 99,5%, e os sólidos filtrados, que foram agitados por 1,4 horas. Os sólidos foram filtrados e secados por ar por 69 horas, então,

secados a vácuo por 4 horas. Após misturar o sólido, o mesmo foi peneirado através de uma peneira de 10 mesh (2 mm) e, então, 18 mesh (1 mm) para gerar BisEDT.

EXEMPLO 3: SÍNTESE DE COMPOSTOS DE BISMUTO-TIOL ADICIONAIS

[00417] Os seguintes compostos de bismuto-tiol também podem ser preparados de acordo com os métodos dos Exemplos 1 e 2:

bismuto-2,3-dimercaptopropanol (razão molar 2:3, BisBAL)
bismuto-4-metil-1,2-benzenoditiol (razão molar 2:3, BisTOL)
bismuto-2,3-butanoditiol (BisBDT)

EXEMPLO 4: FORMULAÇÃO (OU FORMULAÇÕES) PARA INALANTE DE CF

[00418] *Objetivo:* O objetivo deste estudo foi desenvolver métodos para as exposições de inalação apenas nasal de BisEDT para roedores. Os aerossóis foram gerados de formulações de suspensão de BisEDT em meios aquosos (0,5% de Tween 80 em Tampão Fosfato de Sódio, pH 7,4). Os aerossóis foram gerados com um nebulizador de jato de ar comprimido comercial em um sistema de exposição de inalação apenas nasal de roedor. As formulações de suspensão foram criadas por sonicação com API puro com Tween 80 0,5% em Tampão Fosfato de Sódio, pH 7,4. Isso foi adicionalmente refinado ajustando-se o veículo para uma osmolalidade de 300 mOsmol/kg. Os aerossóis foram caracterizados por distribuição de tamanho de partícula e concentração de aerossol. A concentração de aerossol foi determinada por análise de massa e química diferencial das amostras de filtro de aerossol.

[00419] As concentrações de suspensão entre 2,5 e 100 mg/ml foram avaliadas para uma formulação de BisEDT e estiveram na faixa de 18,5 a 719 µg/l, respectivamente. Testes adicionais foram realizados com uma nova formulação de BisEDT e as concentrações de sus-

persão de 2,5 mg/ml, 10 mg/ml, 50 mg/ml e 100 mg/ml renderam concentrações de aerossol de 18,4, 97,7, 159 e 1.300 µg/l, respectivamente. O tamanho de partícula aumentou com a concentração de suspensão de ~ 1 µm a 3,5 µm MMAD, que é respirável para exposições de inalação de roedor.

[00420] Para suportar estudos de constatação de faixa de dose potencial apenas exposições de inalação são tipicamente recomendadas por entre 30 e 180 minutos. Portanto, a faixa de dose depositada pulmonar destas formulações de suspensão estão entre 42 µg/kg e 17,5 mg/kg. Conforme apropriado, a concentração de suspensão e/ou o tempo de exposição podem ser modulados para ajustar a dose depositada pulmonar.

[00421] *Materiais e Métodos:* BisEDT - Dois lotes separados de Bismuto Etano Ditiol, BisEDT, foram usados conforme recebido. Os estágios iniciais de desenvolvimento de método foram realizados com o Lote nº ED268-1-11-01 e os estágios finais foram realizados com o Lote nº XL-47-125, que foi transportado em preparação para exposições. Os dois materiais se comportaram de modo levemente diferente, necessitando de uma mudança na determinação final de tempos de exposição.

[00422] *Métodos de Aerossol:* Formulação - Formulações de suspensão de BisEDT foram preparadas em 0,5% de Tween 80 em Tampão Fosfato de Sódio, pH 7,4. Suspensões de 2,5, 10, 25, 50, 75 e 100 mg/ml foram preparadas por sonicação com um sonicador Covaris. Em testes posteriores, o veículo foi ajustado com cloreto de sódio para alcançar uma Osmolalidade de 300 mOsmol/kg. As suspensões foram preparadas em 2,5, 50, e 100 mg/ml.

[00423] Sistema de Distribuição de Aerossol: A Figura 1 mostra um esquema da geração de aerossol e sistema de exposição usados durante estes testes. O aerossol foi gerado usando-se um nebulizador de jato comprimido Pari LC Plus (Pari Respiratory Equipment Inc., Mi-

dlothian, VA) com uma pressão de entrada de 0,13 MPa (20 psi). Os aerossóis transitaram para um sistema de exposição de inalação apenas nasal de roedor operado com um fluxo de ar de entrada de ~ 8,5 l/min e um fluxo de ar de exaustão de ~ 7,1 l/min. O aerossol gerado pelo nebulizador foi distribuído para um sistema de exposição de inalação além de fluxo apenas nasal de um nível.

[00424] A concentração de aerossol foi medida na zona de respiração do sistema de exposição por coleta do aerossol em filtros de 47 mm (filtros de membrana Whatman GF/A). As amostras de filtro foram coletadas em uma taxa de fluxo nominal de 0,3 l/min. A concentração de massa de aerossol foi determinada por análise de peso diferencial das amostras de filtro. Os filtros foram, então, transferidos para o laboratório de química analítica para análise com o uso de HPLC. Os detalhes dos métodos de química analítica são incluídos no método analítico ACM-1046-0 (Determinação de BisEDT em Formulações e Extratos de Filtro por HPLC-UV).

[00425] *Medição de Distribuição de Tamanho de Partícula:* A distribuição de tamanho de partícula para exposição foi medida usando-se um impactador em cascata 2,0 l/min In-Tox Mercer (In-Tox, LLC, Moriarty, NM).

[00426] Cálculo de Dose Depositada: As duas primeiras equações foram usadas para calcular a dose de aerossol apresentada e a dose depositada teórica, respectivamente. Nestes cálculos, a concentração de aerossol média (química) juntamente com pesos corporais projetados para ratos são usados.

$$D_P [mg\ kg^{-1}] = \frac{AC [mg\ L^{-1}] RMV [L\ min^{-1}] T [min]}{BW [kg]}$$

$$D_D [mg\ kg^{-1}] = \frac{AC [mg\ L^{-1}] RMV [L\ min^{-1}] T [min] DF}{BW [kg]}$$

$$RMV = 0,608 BW^{0,852}$$

[00427] Em que: D_P : dose apresentada; D_D : Dose depositada; AC: Concentração de Exposição de Aerossol; RMV: Volume Respiratório por Minuto (Alexander. DJ, *et al.*, 2008. *Inhal Toxicol.*; 20(13): 1.179 a 1.189); T: Tempo de exposição; BW: Peso Corporal; DF: Fração de deposição pulmonar (suposta como 10%, Tepper *et al.*, 2016 *Int J Toxicol*; 35(4):376 a 392); Tempo variou entre 30 e 180 minutos.

RESULTADOS

[00428] *Concentração de Aerossol e Tamanho de Partícula:* A concentração média de aerossol total, concentração de aerossol de BisEDT e tamanho de partícula para as formulações são mostradas para a primeira formulação de BisEDT (nº de Lote ED268-1-11-01) na Tabela 1. Uma tabela análoga é mostrada para a segunda formulação de BisEDT (nº de Lote XL-47-125) na Tabela 2. Um histograma exemplificativo da distribuição de tamanho de partícula para a concentração 2,5 mg/ml assumida por meio do impactador de cascata é mostrado na Figura 2. Os histogramas exemplificativos das distribuições de tamanho de partícula para as concentrações de 25, 50, 75, e 100 mg/ml assumidas por meio de APS são mostradas nas Figuras 3, 4, 5, e 6; respectivamente. Os testes repetidos para distribuições de tamanho para a segunda formulação de BisEDT são representados nas Figuras 7, 8, 9 e 10 para 100 mg/ml, 50 mg/ml, 10 mg/ml, e 2,5 mg/ml respectivamente.

TABELA 1. SUMÁRIO DE TESTE DE AEROSSOL DE SUSPENSÃO PARA BISEDT (Nº DE LOTE ED268-1-11-01)

Formulação (mg/ml)	Conc. de Aerossol Total (mg/l)	Conc. de Aerossol de BisEDT (µg/l)	Tamanho de Partícula (GSD)*
1		9,9	1,65 (1,6) µm
2,5	0,116	18,5	0,97 (3,0) µm
10	0,184	80,7	N/D
25	0,441	87,9 (64,4)+	2,98 (1,8) µm

Formulação (mg/ml)	Conc. de Aerossol Total (mg/l)	Conc. de Aerossol de BisEDT (µg/l)	Tamanho de Partícula (GSD)*
50	0,599	156	2,83 (1,9) µm
75	0,618	530	3,16 (1,70) µm
100	0,816	719	3,53 (1,71) µm
100*	0,731	568	3,60 (1,71) µm

* Todos os dados de tamanho de partícula coletados com um APS exceto pela formulação 2,5 mg/ml

+: para um dos filtros da solução 25 mg/ml, extração química rendeu uma concentração não esperada de BisEDT. 64,4 µg/l é o valor médio de todas as concentrações extraídas, enquanto 87,9 µg/L é a média que exclui este valor discrepante.

Tabela 2. Sumário de teste de aerossol de suspensão para BisEDT (nº de Lote XL-47-125) com o uso de um veículo 300 mOs-mol/kg

Formulação (mg/ml)	Conc. de Aerossol Total (mg/l)	Conc. de Aerossol de BisEDT (µg/l)	Tamanho de Partícula (GSD)
100	1,535	1.300	2,90 (1,67) µm
100	1,404	N/D	2,60 (1,65) µm
50	0,711	159	2,79 (1,69) µm
10	0,332	97,7	1,61 (1,65) µm
2,5	0,175	18,4	1,44 (1,71) µm

[00429] Os aerossóis nas Tabelas 1 e 2 foram gerados com um nebulizador Pari LC Plus® Performance. O nebulizador foi testado com um compressor de 0,12 MPa (1,2 bar); medido com Malvern MasterSizer X em 50% de umidade relativa, solução de NaCl 0,9, fluxo inspiratório de 20 l/min, nebulização contínua a 23 °C com um volume de carga de 2,5 ml.

[00430] *Dose Depositada Pulmonar*: As doses depositadas pulmo-

nares podem ser moduladas por meio da concentração de aerossol e/ou da duração de exposição. Para uma exposição de inalação apenas nasal de roedor, a duração de exposição é tipicamente alvejada entre 30 e 180 minutos. Com o uso do desempenho do aerossol e da equação de dose pulmonar acima, a faixa de dose depositada pulmonar para a primeira formulação de BisEDT estaria entre 42 µg/kg e 9,6 mg/kg. A segunda formulação foi mais eficaz no depósito de BisEDT e tem capacidade para gerar uma dose até 17,5 mg/kg.

[00431] Os métodos para geração de formulação e aerossol de BisEDT foram desenvolvidos. Os mesmos suportam a dose depositada pulmonar entre 42 µg/kg e 17,5 mg/kg. Estas condições de exposição são apropriadas para exposições de inalação de roedor.

EXEMPLO 5: ESTUDOS IN VITRO

[00432] Este Exemplo descreve uma série de experimentos que avaliam a adequabilidade e praticabilidade do desenvolvimento de bismuto-tióis, particularmente BisEDT, como um produto de fármaco inalado para o tratamento de infecções pulmonares relacionadas à CF. Uma faixa relevante para CF de patógenos bacterianos infecciosos, incluindo cepas altamente resistentes e cepas de formação de biofilme de tais patógenos, foi testada quanto à susceptibilidade a bismuto-tióis. Além disto, as avaliações in vitro de toxicidade contra células epiteliais de via respiratória de pulmão foram conduzidas.

[00433] O teste de susceptibilidade microbiológica padronizado foi executado com dois compostos de bismuto-tiol contra uma faixa dos isolados de CF altamente resistentes mais desafiadores clinicamente. O teste de MIC foi padronizado com o uso de cepas de ATCC de *E. coli* (25922) e *S. aureus* (29213).

[00434] Os resultados deste teste demonstraram que BisEDT foi consistentemente potente contra todos os isolados de CF testados, incluindo *P. aeruginosa* MDR e resistente a aminoglicosídeo, *B. ceno-*

cepacia, *Achromobacter* spp., e *S. maltophilia*, com todos os organismos de teste que demonstram MICs de menos do que 1 µg/ml (consultar a Figura 12).

[00435] Para expansão mediante a isso, as bactérias testadas foram expandidas para incluir mais *Burkholderia* spp., assim como para testar uma faixa mais ampla de isolados de CF e cepas resistentes a antibiótico.

[00436] Uma faixa de cepas isoladas de CF de *Mycobacterium avium* e *Mycobacterium abscessus* foi incluída; o que permite o entendimento da atividade contra Mycobacteria não tubercular (NTM). Os resultados deste estudo são mostrados abaixo. Dois compostos de bismuto-tiol distintos foram avaliados, incluindo BisEDT e BisBDT. Os isolados de *Mycobacterium avium* foram constatados como tendo as MICs mais altas, embora BisEDT demonstrou MICs inferiores contra estas bactérias NTM em relação a BisBDT. Os isolados de CF de relevância clínica maior, incluindo tanto *M. abscessus* spp. quanto *Burkholderia* spp., foram ambos consistentemente constatados como muito mais suscetíveis a BisEDT e BisBDT. Este estudo demonstrou dados de MIC muito irresistíveis contra isolados de CF tanto de NTM quanto de *Burkholderia* spp., visto que poucos antibióticos comerciais têm este nível e espectro de atividade.

TABELA 3A: BISED T E BISBDT MIC CONTRA CEPAS BACTERIANAS

Designação de Cepa	Espécie	Características de cepa	MIC de BisEDT (µg/ml)	MIC de BisBDT (µg/ml)
MAC101	M. avium	Cepa de referência de MAC, isolado de sangue de paciente com HIV	2	1
AMT 0193-13	M. avium	Isolado de CF de MAC, macrolídeo-S	8	>16
AMT 0119-8	M. avium	Isolado de CF de MAC, macrolídeo-S	8	>16
BC 5	B. multivorans (complexo cepacia)	Isolado de CF, beta lactama-S, TMP/SMX-S, FQ-I	1	2
PC 213	Complexo B. cepacia (não especificado adicionalmente)	Isolado de CF, beta lactama-S, TMP/SMX-S, FQ-S	0,25	1
BC 9	Complexo B. cepacia (não especificado adicionalmente)	Isolado de CF, beta lactama-S, TMP/SMX-S, FQ-R	0,5	0,5
BC 17	B. cepacia (complexo cepacia)	Isolado de CF, beta lactama-R, TMP/SMX-R, FQ-R	8	4
BC 11	B. dolosa (complexo cepacia)	Isolado de CF, beta lactama-R, TMP/SMX-S, FQ-R	0,125	0,5
ATCC 19977	M. abscessus abscessus	Cepa do tipo ATCC	0,5	0,25
AMT 0136-10	Complexo M. abscessus	Isolado de CF de MABSC, macrolídeo-R, amicacina-R	0,125	0,0625
AMT 0089-5	Complexo M. abscessus	Isolado de CF de MABSC, macrolídeo-R, amicacina-R	0,25	0,125
AMT 0166-29	Complexo M. abscessus	Isolado de CF de MABSC, macrolídeo-R, amicacina-R	0,125	0,125

Designação de Cepa	Espécie	Características de cepa	MIC de BisEDT (µg/ml)	MIC de BisBDT (µg/ml)
AMT 0157-14	Complexo M. abscessus	Isolado de CF de MABSC, macrolídeo-R, amicacina-I	0,125	0,125
AMT 0130-8	Complexo M. abscessus	Isolado de CF de MABSC, macrolídeo-S, amicacina-I	0,125	0,0625
AMT 0153-9	Complexo M. abscessus	Isolado de CF de MABSC, macrolídeo-S, amicacina-I	0,25	0,125
AMT 0068-40	Complexo M. abscessus	Isolado de CF de MABSC, macrolídeo-S, amicacina-I	0,25	0,125
AMT 0119-7	Complexo M. abscessus	Isolado de CF de MABSC, macrolídeo-S, amicacina-I	0,125	0,125
AMT 0493-2	Complexo M. abscessus	Isolado de CF de MABSC, macrolídeo-S, amicacina-R	0,5	0,5

Tabela 3B: MIC de BisEDT e BisBDT contra cepas bacterianas de controle

As cepas de ATCC usadas para controle para atividade de fármaco		Resultados esperados: objetivo (faixa aceitável) mcg/ml	
(consultar dados detalhados para MICs medidas com cada definição de ensaio)		MIC de BisEDT MIC de BisBDT	
ATCC 27853	P. aeruginosa	1 a 2 (0,5 a 4)	ND
ATCC 25922	E. coli	1 (0,5 a 2)	ND
ATCC 29213	S. aureus	0,25 a 0,5 (0,125 a 1)	0,25 (0,125 a 0,5)

[00437] Avaliação *in vitro* controlada de BisEDT, em relação à citotoxicidade potencial em epitélio de via respiratória humana completamente diferenciada foi executada. Tanto as formas solubilizadas quanto sólidas (pó/particulado) de BisEDT foram avaliadas em relação à citotoxicidade por Epithelix, uma organização de pesquisa contratada (CRO) que se especializa nesta forma de avaliação de citotoxicidade com a utilização de um sistema de teste de epitélio de via respiratória humana completamente diferenciada *in vitro* proprietária (MucilAir™). O sistema MucilAir facilitou a avaliação de citotoxicidade através tanto da liberação de LDH (do lado de meio de cultura) quanto da resistência elétrica transepitelial (TEER) do lado apical/exposto ao ar assim como examinação microscópica pré- e pós-exposição para mudanças morfológicas (Figura 13).

[00438] Em relação à avaliação de seis concentrações de BisEDT solubilizado, nenhuma mudança em morfologia celular foi observada em quatro pontos no tempo diferentes (até 48 horas), assim como nenhuma mudança foi observada em liberação de LDH e TEER, indicando que nenhum efeito tóxico foi observado, em todos os pontos no tempo até mesmo na concentração de teste mais alta testada de 30 uM (20,83 ug/ml, que é aproximadamente 20 a 347 mais alta do que as MICs recentemente derivadas, contra os isolados bacterianos de CF mais testados, incluindo *M. abscessus* (incluindo amicacina e claritromicina/cepas resistentes a macrolídeo), *Burkholderia* spp. (incluindo cepas resistentes a beta-lactama, fluoroquinolona, e sulfametoxazol), *P. aeruginosa* (incluindo cepas multirresistentes (MDR)), *Achromobacter* spp., *Stenotrophomonas maltophilia*, e *S. aureus* (incluindo MRSA)). A concentração mais alta testada de 20,83 µg/ml também é aproximadamente 2,5 a 10 vezes superior àquela da MIC para *M. avium*, que, comparativamente, teve as MICs mais altas em relação ao BisEDT de quaisquer isolados de CF testados. Adicionalmente, visto que nenhum

traço de toxicidade foi demonstrado até mesmo com a concentração mais alta de BisEDT solubilizado, é possível que concentrações superiores também possam ser determinadas como não tóxicas/seguras/bem toleradas.

[00439] Em relação à avaliação de cinco concentrações de BisEDT particulado diluído em dextrano como um carreador (peso/área), as duas concentrações inferiores não produziram mudanças em morfologia celular nos quatro pontos de tempo diferentes (até 48 horas), assim como nenhuma mudança foi observada em liberação de LDH e TEER, o que indica que nenhum efeito tóxico foi observado em qualquer um dos quatro pontos no tempo.

[00440] Em relação à morfologia, as três concentrações superiores demonstraram mudanças que foram mais pronunciadas nas duas concentrações superiores. Em relação às três concentrações superiores, nenhum efeito significativo foi observado em relação a TEER em qualquer uma destas concentrações no ponto no tempo de 1 hora, mas em 8, 24, e 48 horas, TEER, perda de integridade de tecido ocorreu com todas as três das concentrações mais altas. De modo similar, nenhum efeito em liberação de LDH foi observado em qualquer ponto no tempo com as duas concentrações inferiores, nem em 1 hora para as três concentrações superiores; mas além de 1 hora de ponto no tempo, houve um aumento dependente de tempo e dose em liberação de LDH e diminuição em TEER, o que indica citotoxicidade sob estas condições. É observável que, nos estudos clínicos humanos de Fase 1, a concentração de até 2.500 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (~8 vezes superior a 333 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, a concentração mais alta testada neste estudo *in vitro*) foi bem tolerada quando administrada por via tópica em seres humanos por 6 horas, e uma concentração de até 75 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (intermediária entre 33,3 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ e 333 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) foi tolerada quando administrada topicamente a seres humanos por exposição contínua de mais de 21 em pele normal e

desgastada. Isto indica que as condições de modelo *in vitro* podem ser muito mais sensíveis à forma particulada do que condições fisiológicas *in vivo*, representando em excesso o risco verdadeiro de citotoxicidade da forma de particulado. Independentemente, as concentrações não tóxicas mais altas de ambas as formas de BisEDT testadas neste modelo de citotoxicidade *in vitro*, particuladas ou solubilizadas, fornecem 25 a 345 vezes a MIC necessária para ser eficaz contra um amplo espectro de patógenos bacterianos de CF difícil de tratar, resistentes a antibióticos.

[00441] Os dados deste estudo demonstram que a versão solubilizada de BisEDT é segura em múltiplos suficientes da dose clínica antecipada.

Atividade de compostos de BT contra biofilmes de isolado de CF

[00442] A atividade de compostos de BT contra biofilmes cultivados de isolados de CF foi testada. MR14 é um isolado de CF multirresistente (MDR) de *Pseudomonas aeruginosa*. As reduções em viabilidade de célula de biofilme de 2 logs (MB-6) a 4 logs (MB-1-B3) ocorreu em 25 ng/ml (Figura 14). Os compostos de bismuto-tiol foram anteriormente relatados na literatura como tendo efeitos antibiofilme em concentrações subinibidoras com tratamento de 24 horas com 0,25 µg/ml. Não há nada comparável na literatura científica.

[00443] AG14 é um isolado de CF resistente a aminoglicosídeo de *Pseudomonas aeruginosa*. As reduções em viabilidade de célula de biofilme de 2 logs (MB-6) a aproximadamente 3,5 logs (MB-1-B3) ocorreu em 0,25 µg/ml. Novamente, um nível muito avançado de atividade antibiofilme (uma redução de 6 log) com tratamento de 24 horas ocorreu com 0,25 µg/ml; este nível potente de atividade é muito propenso a ser único para os compostos de bismuto-tiol (Figura 15).

[00444] Combinados, os resultados de teste de biofilmes de *Pseudomonas* (MR14 e AG14) demonstram um nível único possivelmente

avançado de atividade antibiofilme contra *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente e resistente a antibiótico (MDR); isto pode representar uma nova atividade terapêutica e estratégia clínica no tratamento de infecções pulmonares associadas à fibrose cística.

[00445] AU197 é um isolado de CF de *B. cenocepacia*. Embora, neste caso, a atividade antibiofilme não ocorra em um nível subinibidor (como com os exemplos anteriores de *P. aeruginosa*), este nível de atividade antibiofilme (uma redução de log 6 a uma concentração de 2,5 µg/ml de BisEDT) é, independentemente, extremamente potente, e é muito propensa a ser terapêuticamente alcançável (Figura 16).

[00446] AMT0130-8 representa um isolado de CF do MABSC clinicamente relevante, que complica frequentemente o tratamento de infecções pulmonares de CF. Neste caso, enquanto BisBDT demonstrou apenas reduções modestas em viabilidade de célula de biofilme, novamente, BisEDT demonstrou uma redução de log 6 em 2,5 µg/ml, assim como uma resposta de dose de 2,5 ng/ml a 2,5 µg/ml. De modo interessante, a MIC contra esta cepa foi demonstrada como inferior para BisBDT (0,0625 µg/ml) do que para BisEDT (0,125 µg/ml), ainda assim, a atividade antibiofilme de BisEDT foi aparentemente demonstrada como muito mais potente – embora não seja surpreendente ver tais diferenças em atividade entre compostos de bismuto-tiol distintos, esta cepa de MABSC particular aparentemente se demonstrou difícil de trabalhar de modo técnico (consultar observações por itens abaixo da figura), o que também pode ser responsável por tais diferenças (aparentes) na atividade (Figura 17).

[00447] AMT0089-5 é um MABSC resistente a amicacina, resistente a macrolídeo. O envolvimento de tais cepas resistentes a antibiótico de MABSC nas infecções pulmonares de pacientes com CF é extremamente problemático. Aqui, quando BisEDT mostrou uma redução de log 2,5 em células de biofilme viáveis em uma concentração de 2,5

µg/ml, BisBDT demonstrou ter células de biofilme viáveis por 6 logs em uma concentração de 2,5 µg/ml (Figura 18).

[00448] ATCC-19977 é *M. abscessus* (resistente a macrolídeo; induzível). Uma resposta de dose se demonstra mostrando uma redução de log 3 em células de biofilme viável em 2,5 µg/ml ATCC-19977 é *M. abscessus* (resistente a macrolídeo; induzível). Uma resposta de dose é demonstrada abaixo, com uma redução de log 3 em células de biofilme viáveis em 2,5 µg/ml (Figura 19).

[00449] Os bismuto-tióis não foram observados com ativos contra o biofilme formado por um isolado de CF de MABSC, embora esta cepa tivesse crescimento lento, uma exposição mais longa aos compostos de bismuto-tiol pode ter sido necessária para demonstrar atividade (Figura 20).

[00450] *Achromobacter* spp. foram testados até concentrações de 250 µg/ml tanto de BisEDT quanto de BisBDT, o que resultou em uma redução de log 5 em células de biofilme viáveis. Uma resposta de dose também é aparentemente associada a ambos os compostos (Figura 21).

[00451] Infelizmente, nenhuma atividade foi evidente para qualquer composto de bismuto-tiol contra *Stenotrophomonas maltophilia* (Figura 22).

[00452] Finalmente, a atividade antibiofilme também foi demonstrada nas concentrações mais altas de ambos os compostos (uma redução de log 5) quando testados contra *E. coli* (Figura 23).

[00453] Tanto BisEDT quanto BisBDT demonstram ter valores de MIC muito baixos contra *M. abscessus*, MDR *P. aeruginosa*, *Achromobacter* spp., e *Burkholderia* spp. Como antes, as cepas de controle de ATCC são utilizadas para padronizar os dados. Entretanto, nesta avaliação, os bismuto-tióis foram comparados de igual para igual com amicacina e claritromicina (um antibiótico de macrolídeo clinicamente

importante). Conforme pode ser visto a partir destes dados abaixo na Tabela 4, os bismuto-tióis são notável e consistentemente mais potentes do que tanto amicacina quanto claritromicina (mais dramaticamente quando considerando a cepa de MABSC ATCC 19977, que foi induzida para ser resistente a macrolídeo).

Tabela 4A: Comparação de antibióticos convencionais vs atividade de BisEDT e BisBDT contra cepas bacterianas

SUMÁRIO DE RESULTADOS DE MIC		Características de cepa especiais (se houver)	MIC (mcg/ml) Amicacina	MIC (mcg/ml) Claritromicina	MIC (mcg/ml) Bis-EDT	MIC (mcg/ml) Bis-BDT
Designação de Cepa	Espécie					
ATCC 19977	Complexo M abscessus/massiliense	Resistente a macrolídeo (induzível)	8 ²	>32 ²	0,06 ²	<0,03 ²
AMT0130-8	Complexo M abscessus/massiliense		16 ²	1	0,06 ²	<0,03 ²
AMT153-9	Complexo M abscessus/massiliense		32 ²	2	0,13 ²	<0,03 ²
AMT0068-40	Complexo M abscessus/massiliense		32 ²	1	0,25 ²	0,06 ²
AMT0119-7	Complexo M abscessus/massiliense		32 ²	1	0,06 ²	<0,03 ²
AMT0493-2	Complexo M abscessus/massiliense	Resistente à amicacina	>64 ²	2	0,5 ²	0,125 ²
AGR1	P. aeruginosa		16	nd	1	1
AGR14	P. aeruginosa	Multirresistente	>64	nd	0,5	1
MR14	P. aeruginosa	Multirresistente	>64	nd	1	1
SM21	S. maltophilia		64	nd	0,25	0,13
AX1	Achromobacter spp.		64	nd	1	1
AX4	A. xylooxidans		>64	nd	0,25	0,5
BC5b	B. multivorans (Complexo B cepacia)		>64	nd	0,25	1
BC15	B. cenocepacia (Complexo B cepacia)		>64	nd	2	4
BC17	B. cepacia (complexo B cepacia)		>64	nd	8	8
AU197	B. cenocepacia (Complexo B cepacia)		>64	nd	0,5	4

TABELA 4B: MIC DE BISED T E BISBDT CONTRA CEPAS BACTERIANAS DE CONTROLE

ATCC ou outras cepas usadas para controlar a atividade de fármaco		Resultados esperados (faixa aceitável) em mcg/ml (por CLSI M100-S24 ou fornecido por Microbion)			
(consultar dados detalhados para MICs medidas com cada definição de ensaio)		Amicacina	Claritromicina	BisEDT	BisBDT
Cepa	Espécie				
ATCC 29213	S. aureus	2 (1 a 4)	0,25 (0,12 a 0,5)	0,25 a 0,5 (0,13 a 1)	0,25 (0,12 a 0,5)
ATCC 25922	E. coli	1 a 2 (0,5 a 4)	nd	1 (0,5 a 2)	nd

AVALIAÇÃO DE EFEITO DE COMPOSTO DE BT EM CITOTOXICIDADE EM UM EPITÉLIO DE VIA RESPIRATÓRIA HUMANA COMPLETAMENTE DIFERENCIADA (MUCILAIR™)

[00454] O objetivo deste estudo é avaliar o efeito tóxico local potencial de BisEDT em epitélio de via respiratória. O projeto é dividido em 2 fases: Estudo 1: teste de Toxicidade Aguda de BisEDT em solução; Estudo 2: teste de Toxicidade Aguda de BisEDT como sólido.

[00455] O sistema de ensaio usado neste estudo é tecnologia de Epithelix MucilAir™. MucilAir™ é um modelo completamente diferenciado e 3D pronto para uso de epitélio de via respiratória humana, constituído com células epiteliais humanas primárias recém-isoladas de biópsias nasais, traqueais ou brônquicas. MucilAir™ (Figura 24), não é apenas morfológica e funcionalmente diferenciado, como também pode ser mantido em um estado homeostático por um longo período de tempo (Huang *et al.*, 2009).

[00456] MucilAir™ é composto de células basais, células ciliadas e células de muco. A proporção destes vários tipos de célula é preservada em comparação com o que é observado *in vivo* (Huang *et al.*, 2011). Além disto, o epitélio se inicia a partir de células não diferenciadas. As células são submetidas a uma diferenciação progressiva com o tempo. Após 45 dias de cultura, os epitélios são completamente ciliados, secretam muco e são eletricamente restritos ($TEER > 200 \Omega \cdot cm^2$). A atividade dos canais iônicos epiteliais principais, como CFTR, EnaC, Na/K ATPase, é preservada e os epitélios demonstram responder de maneira regulada e vetorial ao estímulo pró-inflamatório, TNF- α (Huang *et al.*, 2011). Um grande painel de citocinas, quimiocinas e metaloproteinases foi detectado em MucilAir™ (por exemplo, IL-8, IL-6, GM-CSF, MMP-9, GRO- α).

Teste de Toxicidade Aguda de BisEDT em solução

[00457] O objetivo desta fase é avaliar a toxicidade aguda potencial

de BisEDT em solução uma vez aplicada na superfície apical em um modelo 3D de epitélio de via respiratória humana completamente diferenciado (MucilAir™) após 1, 8, 24 e 48 horas de exposição.

TABELA 5: INFORMAÇÕES DE PACIENTE

Número de lote	Idade do paciente	Sexo dos pacientes	Idade da cultura	Comentários especiais
MD014101	38 anos	NA	105 dias	Doador normal

TABELA 6: MATERIAL DE TESTE

Nome de Identificação	Concentrações	Veículo	Solubilidade
BisEDT (MB-1-B3)	0,001, 0,01, 0,1, 1, 10, 30 µM	DMSO 0,5% em Solução Salina Tamponada	OK

[00458] BisEDT (MB-1-B3) foi aplicado na superfície apical de MucilAir™ durante 1, 8, 24 e 48 horas (Figura 13). O efeito de 6 concentrações foi estudado: 0,001, 0,01, 0,1, 1, 10 e 30 µM. O composto foi diluído em uma solução salina tamponada (NaCl 0,9% - CaCl₂ 1,25 mM-HEPES 10 mM) com DMSO 0,5%. 30 µl de solução na concentração selecionada foram aplicados na superfície apical de MucilAir™. O controle negativo corresponde à solução de veículo (0 µM) e culturas não tratadas. O controle positivo corresponde a 50 µl para Triton X-100 10% diluído em uma solução salina tamponada. O estudo foi executado em triplicatas.

[00459] Durante o estudo, insertos foram mantidos em uma incubadora de CO₂ (37 °C, CO₂ 5%, 100% de umidade). Os seguintes pontos finais foram determinados:

- *Monitoramento de integridade de tecido*: medição de Resistência Elétrica Trans-Epitelial (TEER) (quantitativa) em D0, D1 e D2.
- *Monitoramento de citotoxicidade*: teste de LDH (quantitativo) em D0, D1 e D2.
- *Morfologia*: integridade celular e de tecido examinada sob microscópio de contraste em D0, D1 e D2.

[00460] Três dias antes do experimento, os seguintes controles de qualidade foram realizados em cada epitélio:

- *Lavagem*: insertos foram lavados com 200 µl de meio de cultura MucilAir™. A lavagem remove o muco acumulado na superfície de tecido que pode interferir com o teste.

- *Resistência Elétrica Trans-Epitelial (TEER)*: TEER foi medida para verificar que todos os insertos selecionados têm barreiras epiteliais e o tecido em si não foi rompido antes da aplicação do material de teste.

- *Morfologia de tecido*: cada inserto foi inspecionado sob um microscópio invertido convencional para garantir a qualidade dos epitélios e determinar qualitativamente que o movimento de cílios foi visível. A presença de muco foi detectada pelo aspecto refratário da superfície apical.

RESULTADOS

[00461] Barras de erro nos seguintes gráficos se referem ao erro padrão da média (SEM). Todas as comparações são versus o controle negativo (solução de veículo, 0 µM).

[00462] Antes da exposição: Cada inserto foi inspecionado sob um microscópio invertido convencional para garantir a qualidade dos epitélios. O movimento dos cílios foi claramente visível para todos os insertos selecionados. A presença de muco foi detectada pelo aspecto refratário da superfície apical.

[00463] Após a exposição: Nenhuma mudança de morfologia foi observada para o controle de veículo e todas as concentrações e pontos no tempo testados.

[00464] *Avaliação de citotoxicidade*: A Figura 25 mostra a porcentagem de citotoxicidade (medição de LDH) em 1, 8, 24 e 48 horas de exposição. O controle (0 µM, solução de veículo) corresponde a uma liberação fisiológica de LDH (<5%). A liberação de LDH não foi altera-

da após a exposição a BisEDT em todas as concentrações testadas e em todos os pontos no tempo. Portanto, nenhum efeito tóxico foi observado.

[00465] *Avaliação de integridade de tecido:* a Figura 26 mostra o monitoramento de TEER em D1. Deve ser observado que TEER é um parâmetro dinâmico que pode ser afetado por diversos fatores. Uma diminuição da atividade de canal iônico pode levar a um aumento de TEER, e uma ativação dos canais iônicos pode diminuir os valores de TEER. Quando um epitélio é danificado, uma diminuição de TEER seria associada a um aumento de liberação de LDH. BisEDT não mostrou efeito significativo em TEER em todas as concentrações e pontos no tempo testados.

Teste de toxicidade aguda de BisEDT como sólido: 1º conjunto de Experimentos

[00466] O objetivo deste estudo é avaliar a toxicidade aguda potencial de BisEDT como sólido (em 0,033, 0,33, 3,33, 33,3, 333 µg/cm²) uma vez aplicada à superfície apical em um modelo 3D de epitélio de via respiratória humana completamente diferenciado (MucilAir™) após 1, 8, 24 e 48 horas de exposição.

TABELA 7: TECIDOS (INFORMAÇÕES DE PACIENTE)

Número de lote	Idade do paciente	Sexo dos pacientes	Idade da cultura	Comentários especiais
MD014101	38 anos	NA	119 dias	Doador normal

TABELA 8: MATERIAL DE TESTE

Nome de Identificação	Concentrações	Veículo
MB-1-B3	0,033, 0,33, 3,33, 33,3, 333 µg/cm ²	Pó de dextrano (C60) Ref: Pharmacosmos 5510 0060 1007

[00467] O composto BisEDT foi aplicado na superfície apical de MucilAir™. O efeito de 5 concentrações após 1, 8, 24 e 48 horas de

exposição foi estudado: 0,033, 0,33,3,33, 33,3, 333 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. O composto foi diluído em pó de dextrano pó na concentração alvejada e comprimido a fim de obter um comprimido. O estudo foi executado em triplicatas. Durante o estudo, insertos foram mantidos em uma incubadora CO₂ (37°C, CO₂ 5%, 100% de umidade). A análise de depuração mucociliar foi realizada após 1 hora e 24 horas de exposição.

[00468] *Controle de qualidade e lavagem da superfície apical*: Três dias antes do experimento, os controles de qualidade seguintes foram realizados em cada epitélio:

- *Lavagem*: insertos foram lavados com 200 μl de meio de cultura MucilAir™. A lavagem remove o muco acumulado na superfície de tecido que pode interferir com o teste.

- *Resistência Elétrica Trans-Epitelial (TEER)*: TEER foi medida para verificar que todos os insertos selecionados têm barreiras epiteliais restritas e o tecido em si não foi rompido antes da aplicação do material de teste.

- *Morfologia de tecido*: cada inserto foi inspecionado sob um microscópio invertido convencional para garantir a qualidade dos epitélios e determinar qualitativamente que o movimento de cílios foi visível. A presença de muco foi detectada pelo aspecto refratário da superfície apical.

RESULTADOS

[00469] Barras de erro nos seguintes gráficos se referem ao erro padrão da média (SEM). Todas as comparações são versus o controle negativo (Carrier, Dextran).

[00470] Antes da exposição: Cada inserto foi inspecionado sob um microscópio invertido convencional para garantir a qualidade dos epitélios. O movimento dos cílios foi claramente visível para todos os insertos selecionados. A presença de muco foi detectada pelo aspecto refratário da superfície apical.

[00471] Após a exposição: Nenhuma mudança de morfologia foi observada para os controles não tratados e de veículo.

- 0,033 e 0,33 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$: Nenhuma modificação morfológica foi observada.

- 3,33 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$: Os tabletes aplicados de modo apical foram dissolvidos de modo insatisfatório nos epitélios em 24 e 48 h após a exposição. As células foram redondas e opacas na adjacência de insertos. Gradualmente, as células se tornam desafixadas uma da outra. A aparência do meio de cultura proveniente do lado basal na superfície apical foi observada.

- 33,3 e 333 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$: Os tabletes aplicados de modo apical foram insatisfatoriamente dissolvidos nos epitélios em 8, 24 e 48 h após a exposição. As células foram redondas e opacas nos insertos. Gradualmente, as células se tornam desafixadas uma da outra. O meio de cultura vazou para o lado apical.

[00472] *Avaliação de citotoxicidade*: Figura 27 mostra a porcentagem de citotoxicidade (medição de LDH) em D1. O controle (Dextrano) corresponde a uma liberação fisiológica de LDH (<5%). Nenhum efeito significativo em liberação de LDH em 0,033 e 0,33 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ em todos os pontos no tempo testados. Uma citotoxicidade dependente de tempo e dose é observada em 3,3; 33,3 e 333 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$.

[00473] *Avaliação de integridade de tecido*: a Figura 28 mostra o monitoramento de TEER em D1. Deve ser observado que TEER é um parâmetro dinâmico que pode ser afetado por diversos fatores. Uma diminuição da atividade de canal iônico pode levar a um aumento de TEER, e uma ativação dos canais iônicos pode diminuir os valores de TEER. Quando um epitélio é danificado, uma diminuição de TEER seria associada a um aumento de liberação de LDH. Nenhum efeito significativo foi observado em TEER em 0,033 e 0,33 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ em todos os pontos no tempo testados. Após 1 hora de exposição, nenhum efeito

significativo em TEER é observado em todas as doses testadas. A perda de integridade de tecido é observada em 3,33, 33,3 e 333 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ após 8, 24 e 48 H de exposição.

TESTE DE TOXICIDADE AGUDA DE BISEDT COMO SÓLIDO: 2º CONJUNTO DE EXPERIMENTOS

[00474] O objetivo desta fase é avaliar a toxicidade aguda potencial de BisEDT como sólido (em 1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) uma vez aplicada à superfície apical em um modelo 3D de epitélio de via respiratória humana completamente diferenciado (MucilAir™) após 1, 8, 24 e 48 horas de exposição.

TABELA 9: INFORMAÇÕES DE PACIENTE

Número de lote	Idade do paciente	Sexo dos pacientes	Idade da cultura	Comentários especiais
MD014101	38 anos	NA	125 dias	Doador normal

TABELA 10: INFORMAÇÕES DE COMPOSTO

Nome de Identificação	Concentrações	Veículo
MB-1-B3	1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	Pó de dextrano (C60) Ref: Pharmacosmos 5510 0060 1007

[00475] *Estratégia de Teste e Protocolo:* O composto BisEDT foi aplicado na superfície apical de MucilAir™. O efeito de concentrações 1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ após 1, 8, 24 e 48 horas de exposição foi estudado. O composto foi diluído em pó de dextrano pó na concentração alvejada e comprimido a fim de obter um comprimido. O estudo foi executado em triplicatas. Durante o estudo, insertos foram mantidos em uma incubadora de CO² (37°C, CO₂ 5%, 100% de umidade). A análise de depuração mucociliar foi realizada após 1 hora e 24 horas de exposição.

[00476] *Controle de qualidade e lavagem da superfície apical:* Três dias antes do experimento, os controles de qualidade seguintes foram realizados em cada epitélio:

- *Lavagem:* insertos foram lavados com 200 μl de meio de cultura Mu-

cilAir™. A lavagem remove o muco acumulado na superfície de tecido que pode interferir com o teste.

- *Resistência Elétrica Trans-Epitelial (TEER)*: TEER foi medida para verificar que todos os insertos selecionados têm barreiras epiteliais restritas e o tecido em si não foi rompido antes da aplicação do material de teste.

- *Morfologia de tecido*: cada inserto foi inspecionado sob um microscópio invertido convencional para garantir a qualidade dos epitélios e determinar qualitativamente que o movimento de cílios foi visível. A presença de muco foi detectada pelo aspecto refratário da superfície apical.

RESULTADOS

[00477] Barras de erro nos seguintes gráficos se referem ao erro padrão da média (SEM). Todas as comparações são versus o controle negativo (Dextrano Carreador).

MORFOLOGIA

[00478] *Morfologia, Antes da exposição*: Cada inserto foi inspecionado sob um microscópio invertido convencional para garantir a qualidade dos epitélios. O movimento dos cílios foi claramente visível para todos os insertos selecionados. A presença de muco foi detectada pelo aspecto refratário da superfície apical.

[00479] *Morfologia, Após a exposição*: Nenhuma mudança de morfologia foi observada para os controles não tratados e de veículo. 1 µg/cm²: após 1 hora e 8 horas de exposição, nenhuma mudança morfológica importante foi observada. Após 24 h de exposição, as células epiteliais em 2 insertos dentre 3 estiveram mortas. Após 48 h, as células epiteliais em todos os 3 insertos estiveram mortas.

[00480] *Avaliação de citotoxicidade*: Figura 29 representa a porcentagem de citotoxicidade (medição de LDH) em D1. O controle (Dextrano) corresponde a uma liberação fisiológica de LDH (<5%). Nenhum

efeito significativo em liberação de LDH em $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ após 1 hora de exposição. Uma citotoxicidade dependente de tempo e dose é observada em 8, 24 e 48 h após a exposição.

[00481] *Avaliação de Integridade de Tecido:* A Figura 30 representa o monitoramento de TEER em D1. Deve ser observado que TEER é um parâmetro dinâmico que pode ser afetado por diversos fatores. Uma diminuição da atividade de canal iônico pode levar a um aumento de TEER, e uma ativação dos canais iônicos pode diminuir os valores de TEER. Quando um epitélio é danificado, uma diminuição de TEER seria associada a um aumento de liberação de LDH.

[00482] Após 1 hora de exposição, nenhum efeito significativo em TEER foi observado em $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. A perda de integridade de tecido é observada em $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ após 8, 24 e 48 h de exposição. Após 48 h de exposição, os epitélios não foram mais restritos.

CONCLUSÕES

[00483] O objetivo deste estudo é avaliar o efeito tóxico local potencial de BisEDT em epitélio de via respiratória em solução líquida ou sólida. Para avaliar os efeitos potenciais de exposição de BisEDT em epitélios nasais humanos diferenciados cultivados na superfície ar-líquido, dois conjuntos de experimentos foram conduzidos, a saber, BisEDT em soluções líquidas ou BisEDT como sólido.

[00484] Em geral, no estudo apresentado, o composto de BisEDT em solução líquida não mostrou toxicidade local no epitélio de via respiratória em concentrações testadas diferentes (0,001, 0,01, 0,1, 1, 10, 30 μM) e exposição de tempo (1, 8, 24, e 48 horas). Nenhum efeito na morfologia dos epitélios em liberação de TEER e LDH foi observado.

[00485] Resultados similares foram obtidos quando o composto foi aplicado como sólido em baixas doses (0,033 e 0,33 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ para exposições de 1, 8, 24, e 48 horas). Entretanto, em 1 e 3,33 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, BisEDT induz a citotoxicidade em 24 h e 48 h de exposição, demonstra-

da por um aumento de liberação de LDH e uma redução do valor de *TEER*. Para concentrações superiores (33,3, 333 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$), a toxicidade forte foi observada com uma alta quantidade de LDH liberada, valores de *TEER* muito baixos e mudanças morfológicas importantes.

REFERÊNCIAS

[00486] Huang, S; Caul-Futy, M; "A novel *in vitro* cell model of the human airway epithelium" Boletim de Informações 3R nº 41, outubro de 2009.

[00487] Huang, S., Wiszniewski, L., & Constant, S. (2011). The use of *in vitro* 3D cell models in drug development for respiratory diseases. Drug Discovery and Development— Present and Future

EXEMPLO 6: ESTUDOS DE ESPUTO

[00488] As curvas de extermínio bacteriano com BisEDT e BisBDT foram realizadas na presença de três espútos de paciente com fibrose cística a fim de determinar a possibilidade de os compostos de teste serem potencialmente inativados por esputo. O ensaio é descrito em King P, Lomovskaya O, Griffith DC, Burns JL, Dudley MN. *In vitro* pharmacodynamics of levofloxacin and other aerosolized antibiotics under multiple conditions relevant to chronic pulmonary infection in cystic fibrosis. *Antimicrob Agents Chemother*, 54:143 a 148, 2010.

[00489] O esputo foi coletado de voluntários pacientes com fibrose cística (CF) sem exposição de antibiótico recente após a aprovação de IRB apropriada. O esputo foi esterilizado por irradiação UV e a esterilização foi confirmada por cultura. Uma cultura de um dia para o outro de cepa *Pseudomonas aeruginosa* PA01 foi usada para inocular culturas frescas em caldo Mueller-Hinton ajustado por cátion ou caldo Mueller-Hinton ajustado por cátion mais esputo de paciente com CF 10%. Os fármacos foram adicionados aos tubos de cultura individual com e sem esputo nas seguintes concentrações final:

BisEDT: 0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$, e 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$

BisBDT: 0,1 µg/ml, 4 µg/ml, e 20 µg/ml

[00490] Tobramicina a 1 µg/ml foi usada como um controle de fármaco comparador conhecido como parcialmente inativado pelo esputo de paciente. As culturas foram incubadas com agitação a 37 °C e as alíquotas foram removidos a cada hora para quantificação para unidades de formação de colônia por ml (CFU/ml) por diluição em série e transferência para placa em ágar de soja tríptica por um total de 6 horas. CFU foram contadas após a incubação das placas de um dia para o outro 37 °C.

[00491] Os controles para este ensaio foram realizados conforme esperado. A proliferação de PA01 não foi obviamente inibida ou intensificada pela adição de esputo de paciente estéril na ausência de fármaco adicional para culturas bacterianas (Figura 31, círculos fechados e abertos). Conforme mostrado, o esputo inibe parcialmente a atividade de extermínio bacteriano de tobramicina, com aproximadamente log 0,5 a 1 de CFU/ml mais altos na maioria dos pontos no tempo em culturas com esputo em comparação com culturas sem esputo.

[00492] A atividade bacteriana de BisEDT parece ser parcialmente inibida por esputo de paciente com CF com base no ensaio (Figura 32). BisEDT não é bacteriano contra PA01 em 0,1 µg/ml. Com BisEDT a 2 µg/ml, a adição de esputo reduz o extermínio por aproximadamente 1 a 2 log CFU/ml em 3 a 6 horas. Quando a concentração de BisEDT é adicionalmente aumentada para 20 µg/ml, a inibição de extermínio bacteriano por esputo é menos pronunciada, com o extermínio na presença de esputo em atraso por apenas log 0,5 a 1 de CFU/ml em relação a culturas sem esputo em pontos iniciais no tempo (1 a 3 horas). Eventualmente, com esta dose mais alta testada, as bactérias na cultura com o esputo são reduzidas abaixo do limite de detecção 1 hora antes da amostra sem esputo, o que sugere que, em concentrações de fármaco superiores, a inibição de BisEDT por esputo é gran-

demente superada.

[00493] De modo similar, a atividade bactericida de BisBDT parece ser parcialmente inibida por esputo de paciente com CF (Figura 33). BisBDT em 0,1 µg/ml não é bactericida contra PA01. Na ausência de esputo, BisBDT 4 µg/ml demonstrou atividade bactericida lenta contra PA01, com o extermínio de cerca de apenas 1 log pelo ensaio de 6 horas; as culturas com esputo demonstraram aproximadamente log 0,5 a 0,8 de CFU/ml mais sobreviventes a 3 a 6 horas. Na concentração mais alta de BisBDT testada, 20 µg/ml, há um atraso inicial no extermínio em PA01 em 1 a 2 horas com a adição de esputo, mas ambas as amostras com e sem esputo são esterilizadas abaixo do limite de detecção por 5 horas.

[00494] Ambos os compostos de BisEDT e BisBDT são bactericidas contra a cepa PA01 de *Pseudomonas aeruginosa* neste ensaio, e esta atividade bactericida é parcialmente inibida na presença de esputo de paciente de CF. Esta inibição parcial de atividade bactericida pode ser superada por concentração aumentada dos compostos de teste. Deste modo, uma concentração superior de composto de bismuto-tiol pode ser necessária em áreas em que o esputo está presente em comparação com compartimentos corporais sem esputo.

EXEMPLO 7: ATIVIDADE IN VITRO DE BISMUTO-TIÓIS E COMPARADORES CONTRA ISOLADOS CLÍNICOS DE HAEMOPHILUS INFLUENZA

[00495] Neste Exemplo, a atividade de três compostos de bismuto-tiol é avaliada contra *Haemophilus influenzae*, um patógeno prevalente de doença respiratória incluindo pneumonia, otite média, conjuntivite, e meningite.

[00496] *Agentes de Teste e Controle:* Os compostos de teste (BisEDT, e análogos BisBDT/PYR e BisEDT/PYR) foram transportados de Micromyx e armazenados a -20 °C até ser ensaiado. O solvente

para todos os compostos de teste foi DMSO 100%, a concentração de estoque foi 2.560 µg/ml, e a faixa testada foi 64 a 0,06 µg/ml. Permitiu-se que todas as soluções de estoque repousassem por pelo menos uma hora antes do uso para autoesterilização.

[00497] Os fármacos comparadores foram fornecidos por Micromyx. Os fornecedores, números de lote, diluente, concentrações de estoque, e faixas de teste foram conforme o seguinte:

Teste/Agentes de controle	Fornecedor	Número de lote	Diluente	Concentração de solução de estoque (µg/ml)	Faixa de teste (µg/ml)
Azitromicina	USP	JOI240	DMSO	2.560	64 a 0,06
Ampicilina	Sigma	BCBF0407V	Tampão Sorenson com pH 7,5	1.280	32 a 0,03
Cefuxorima	Sigma	031M0823V	dH2O	2.560	64 a 0,06
Levofloxacin	Sigma	BCBC2112V	DMSO	2.560	64 a 0,06 1 a 0,001

ORGANISMOS DE TESTE

[00498] Os organismos de teste foram mantidos congelados a -80 °C. Os organismos foram originalmente adquiridos a partir da American Type Culture Collection ou dos laboratórios clínicos. Os isolados foram subcultivados em placas Chocolate Agar (Remel; Lenexa, KS) e incubadas de um dia para o outro a 35 °C com CO₂ 5%. *H. influenzae* ATCC 49247 foi testado com os propósitos de controle de qualidade para os compostos de comparador.

[00499] *Meio de Ensaio de Concentração Inibidora Mínima (MIC)*: O meio empregado para o ensaio de MIC de microdiluição de caldo foi Meio de Teste *Haemophilus* (HTM; Remel; Lenexa, KS; nº de Catálogo R112380; nº de Lote 056737) conforme recomendado pelo Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI; 1).

[00500] *Procedimento de Ensaio de Concentração Inibidora Mínima*

de Caldo (MIC) : valores de MIC foram determinados com o uso de um método de microdiluição de caldo conforme recomendado por CLSI (1, 2). Manipuladores de líquidos automatizados (Multidrop 384, Labsystems, Helsinki, Finlândia; Biomek 2000 e Biomek F/X, Beckman Coulter, Fullerton CA) foram usados para conduzir diluições em série e fazer transferências de líquido.

[00501] Os poços de uma placa de microdiluição de 96 de poços padrão (Costar 3795; Corning Inc.; Corning, NY) foram carregados com 150 µl do solvente apropriado nas colunas 2 a 12 no Multidrop 384. Esta placa foi usada para preparar o fármaco "placa mãe" que forneceu as diluições de fármaco em série para as "placas filhas" replicatas. O Biomek 2000 foi usado para transferir 150 µl de cada solução de estoque dos poços na Coluna 1 da placa mãe para produzir dez diluições em série de 2 vezes subsequentes. Os poços da Coluna 12 não continham fármaco e foram os poços de controle de proliferação de organismo. Cada placa mãe tem a capacidade para criar um total de 15 placas mãe.

[00502] As placas filhas foram carregadas com 185 µl de HTM com o uso do Multidrop 384. Os poços das placas filhas continham finalmente 185 µl de HTM, 5 µl de solução de fármaco, e 10 µl de inóculo. As placas filhas foram preparadas no instrumento Biomek F/X que transferiu 5 µl de solução de fármaco de cada poço da placa mãe para cada poço correspondente de cada placa filha em uma única etapa.

[00503] Um inóculo padronizado de cada organismo foi preparado por métodos de CLSI (1). O inóculo para cada organismo foi dispensado em reservatórios esterilizados divididos por comprimento (Beckman Coulter), e o Biomek 2000 foi usado para inocular as placas. As placas filhas foram colocadas na superfície de trabalho Biomek 2000 invertidas de modo que a inoculação ocorra de concentração de fármaco baixa a alta. O Biomek 2000 distribuiu 10 µl de inóculo padronizado em

cada poço. Estas diluições renderam uma concentração de célula final nas placas filhas de aproximadamente $5,0 \times 10^5$ unidades formadoras de colônia/ml.

[00504] As placas foram empilhadas em três, cobertas com uma tampa na placa superior, colocadas em bolsas de plástico, e incubadas a 35 °C por aproximadamente 24 h. Após a incubação, as microplacas foram removidas da incubadora e vistas do fundo com o uso de um visualizador de placa. Uma placa de controle de solubilidade não inoculada foi observada para evidência de precipitação de fármaco. A MIC foi lida e registrada como a concentração mais lenta de fármaco que inibiu proliferação visível significativa do organismo.

RESULTADOS

[00505] A examinação das placas de solubilidade de fármaco não inoculado não exibiu nenhuma precipitação de qualquer um dos agentes avaliados sobre a faixa de concentração testada. Contra *H. influenzae* ATCC 49247, os comparadores avaliados tiveram MICs na faixa aceitável para controle de qualidade estabelecido por CLSI (2) quando aplicável.

[00506] Todos os compostos de teste de bismuto-tiol foram ativos contra todas as cepas de *H. influenzae* avaliadas independentemente de resistência a outros agentes, incluindo isolados que foram resistentes à ampicilina negativos em beta-lactamase (BLNAR). Os MICs de BisEDT e análogos de BisEDT/PYR e BisBDT/PYR estiveram todos em ou abaixo da concentração mais baixa avaliada no estudo ($<0,06$ µg/ml). Esta atividade foi superior à azitromicina (MIC₅₀ e MIC₉₀ de 2 µg/ml), ampicilina (MIC₅₀ de 2 µg/ml e MIC₉₀ de 4 µg/ml), e cefuroxima (MIC₅₀ de 4 µg/ml e MIC₉₀ de 16 µg/ml). Levofloxacina, que foi testado abaixo tão baixo quanto 0,001 µg/ml com propósitos de controle de qualidade teve uma MIC₅₀ e MIC₉₀ de 0,015 µg/ml. Visto que os compostos de bismuto-tiol foram testados de 0,06 a 64 µg/ml neste estudo,

e suas MICs foram $< 0,06 \mu\text{g/ml}$, não se sabe se sua atividade excede aquela de levofloxacina que teve, em geral, MICs de $0,015 \mu\text{g/ml}$.

[00507] Este estudo demonstrou um alto grau de potência para os compostos de bismuto-tiol testados contra *H. influenzae* em níveis que excedem aqueles de ampicilina, azitromicina e cefuroxima. Esta atividade ilustra que *H. influenzae* é incluído como parte do espectro amplo de atividade mostrado in vitro para esta classe de agentes terapêuticos inovadores.

REFERÊNCIAS

[00508] 1.) Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Padrão Aprovado—Nona Edição. Clinical and Laboratory Standards Institute documento M07-A9 [ISBN 1-56238-784-7]. Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pensilvânia 19087-1898 EUA, 2012.

[00509] 2.) Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Vigésimo Segundo Suplemento Informativo. CLSI documento M100-S22 [ISBN 1-56238-786-3]. Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pensilvânia 19087 EUA, 2012.

EXEMPLO 8: ESTUDOS IN VIVO

[00510] Objetivos: O objetivo primário deste estudo é avaliar a tolerância de BisEDT (Dalton Pharma Services; nº de Lote ED268-1-11-01 armazenado à temperatura ambiente) após exposição de inalação apenas nasal em ratos F344. Os animais serão expostos a concentrações diferentes (baixa, média, alta) por até 180 minutos. O sangue será coletado em pontos no tempo predeterminados para analisar a presença sistêmica de BisEDT. Na conclusão do estudo (24 h pós-exposição), os animais serão submetidos à eutanásia e à necrópsia, em que os pulmões serão lavados e coletados para futura análise po-

tencial. Os tecidos relacionados ao trato respiratório adicional como a cavidade nasal, laringe, faringe, nasofaringe, traqueia, brônquio, e carina também serão coletados. O fluido de lavagem será analisado quanto à química clínica e parâmetros de hematologia, incluindo contagens celulares e diferenciais. Fígado, rim, esôfago, estômago, intestino delgado e intestino grosso também serão coletados para futura análise potencial.

[00511] Animais: Ratos F344 macho e fêmea fornecidos por Charles River Labs, Wilmington, MA foram usados neste estudo. Os ratos tiveram aproximadamente 7 a 9 semanas de idade no tempo de chegada e 8 a 10 semanas na iniciação de estudos. Os pesos corporais de animais individuais foi $\pm 20\%$ da média de grupo. Os animais serão unicamente identificados por marcações numéricas na cauda (feitas com tinta indelével, como Sharpie®) para pesos corporais, aleatorização, e administração de tratamento. Cartões de gaiola codificados por cor também serão colocados nas gaiolas. Um total de quarenta (40) ratos F344 machos e fêmeas (20 M/20 F) (incluindo extras) foram pedidos para o estudo. Trinta e seis (36) animais foram aleatorizados em 3 grupos de estudo, em que cada um consiste em 12 animais por grupo (6 M/6F). Os 4 animais restantes (2 M 12 F) foram extras. Mediante remoção da quarentena, trinta e seis (36) ratos serão aleatorizados em 3 grupos de estudo cada um, consistindo em 12 animais (6 M/6 F) por grupo por estratificação de peso corporal. Os extras não usados serão submetidos à eutanásia ou transportados para outro protocolo de estudo aprovado. Antes do início de exposições, os animais serão condicionados a tubos de exposição apenas nasais.

[00512] Criação Animal: Os animais serão alojados por um mínimo de 7 dias, até 2 por gaiola em gaiolas de policarbonato com Alpha Dri ou leito de lascas de madeira. A gaiola e o leito foram submetidos à autoclave. Antes da injeção, os animais foram introduzidos pelo menos

uma vez para restringir tubos que serão usados para dosagem de veia caudal. O alimento animal foi 2016C Harlan Global Certified Rodent Chow, (Harlan Tekland, Madison, WI) com acesso ilimitado, exceto durante os procedimentos de estudo. Cada lote de alimento foi analisado em relação a contaminantes pelo fabricante e será usado na vida em prateleira designada pelo fabricante. Os animais receberam água municipal (filtrada em 5, 1, e 0,2 p.m) com acesso ilimitado, exceto durante os procedimentos de estudo. Apenas animais saudáveis foram usados neste estudo. Um veterinário animal laboratorial ou pessoa responsável examinou visualmente os animais antes da liberação da quarentena.

[00513] Condições Ambientais: As condições alvejadas para ambiente de sala de animal e fotoperíodo serão conforme o seguinte: Temperatura: 18 a 26 °C; Umidade: 30 a 70%; Ciclo de Luz: 12 h. Excursões de luz, umidade e temperatura são definidos como uma leitura sustentada que fica fora da faixa especificada por mais do que 3 horas.

[00514] Experimental Design: O projeto experimental para este estudo foi: Grupo 1: Baixa dose; inalação; 6 machos e 6 fêmeas; coleta de sangue em 0,5, 2 h e 8 h pós-exposição e 24 h (terminal); e necrópsia em 24 horas pós-inalação. Grupo 2: Dose média; inalação; 6 machos e 6 fêmeas; coleta de sangue em 0,5, 2 h e 8 h pós-exposição e 24 h (terminal); e necrópsia em 24 horas pós-inalação. Grupo 3: alta dose; inalação; 6 machos e 6 fêmeas; coleta de sangue em 0,5, 2 h e 8 h pós-exposição e 24 h (terminal); e necrópsia em 24 horas pós-inalação. Os animais foram pesados e aleatorizados em grupos de estudo após o período de quarentena. Os animais foram divididos em 3 grupos que consistem, cada um, em 6 M e 6 F por grupo. Os grupos foram expostos a três níveis de dose diferentes de BisEDT. A exposição inicial foi uma concentração de formulação de 100 mg/ml para um

tempo de exposição de 60 minutos; com base no desenvolvimento de método, se espera que resulte em uma dose de 3 mg/kg. A duração máxima para exposições foi 180 minutos e a concentração de formulação máxima foi 100 mg/ml.

[00515] Após a exposição, as coletas de sangue não terminais foram realizadas em 2 animais por sexo em 0,5, 2, e 8 horas pós-exposição. Na conclusão do estudo (24 h pós-exposição), os animais foram submetidos à eutanásia e à necrópsia. O pulmão direito foi lavado, congelado, e coletado para futura análise potencial. O pulmão esquerdo foi congelado para futura análise potencial. Os tecidos relacionados ao trato respiratório adicional como a cavidade nasal, laringe, faringe, nasofaringe, traqueia, brônquio, e carina foram coletados. O fluido de lavagem foi analisado quanto à química clínica e parâmetros de hematologia, incluindo contagens celulares e diferenciais. Fígado, rim, esôfago, estômago, intestino delgado e intestino grosso foram coletados para futura análise potencial. Estas amostras de tecido de órgão foram congeladas e armazenadas com conclusão de estudo pendente. O fluido de lavagem foi analisado quanto à patologia clínica e hematologia (incluindo contagens celulares e diferenciais). Uma coleta de sangue total máxima também foi coletada na necrópsia. As amostras de sangue foram analisadas quanto à química clínica e hematologia, assim como uma alíquota congelada para análise potencial para BisEDT.

[00516] Exposição de Inalação: A exposição inicial de BisEDT (bis-muto-1,2-etanoditiol) foi formulada como uma solução em 100 mg/ml em suspensão em Tween 80 0,5%, fosfato de sódio 10 mM, pH 7,4, em NaCl (ajustado a aproximadamente 300 mOsm). Os aerossóis foram gerados com um nebulizador de jato de ar comprimido comercial, Pad LC Plus, operado com pressão de entrada de 0,14 MPa (20 psi). Um esquema é mostrado na Figura 1. Os aerossóis foram levados a

um sistema de exposição de inalação apenas nasal de roedor. O sistema de exposição foi operado com um fluxo de ar de entrada de $-5,2$ l/min e um fluxo de ar de exaustão de -5 l/min. Isto resultou em $0,31$ l/min para cada porta que é levemente superior a $1,5x$ o volume de minuto respiratório de um rato.

[00517] Concentração de Exposição e Monitoramento de Tamanho de Partícula: A concentração de aerossol foi monitorada na zona de respiração por coleta em um filtro GF/a. Os filtros foram analisados por meio de massa diferencial e outros métodos conhecidos na técnica. O tamanho de partícula de aerossol foi medido com o uso de um TSI Aerodynamic Particle Sizer (Modelo 3321, TSI, Inc., Shoreview, MN) ou um impactador em cascata In-Tox Mercer $2,0$ l/min.

[00518] Observações e medições: As observações foram documentadas em banco de dados Provantis ou o Sistema de Gerenciamento Animal (AMS, LRRI, Albuquerque).

[00519] Observações Clínicas e Mortalidade/Morbidez: As observações clínicas detalhadas foram registradas começando no dia de dose com observações registradas antes da exposição, durante a exposição, após a exposição à medida que os animais retornam para suas gaiolas iniciais, e na tarde pós-exposição. As observações serão registradas de acordo com um termo padrão (SOP TXP-1532 - Pharmacologic and Toxicologic Observations of Experimental Animals). As observações gerais incluem, mas sem limitação, apneia, respiração dificultada, mal-estar, descarga nasal marcada, etc. Atenção especial foi dada a sinais clínicos associados ao trato respiratório. Os animais que mostram sinais severos de perturbação foram submetidos à eutanásia imediatamente na descrição do Diretor de Estudo em consulta com a equipe veterinária. As examinações também foram orientadas em direção à (1) identificar animais mortos, fracos ou moribundos, e (2) documentar o início e a progressão de quaisquer sinais clínicos anor-

mais. Os animais moribundos ou mortos foram submetidos à necrópsia o mais cedo possível após serem encontrados, mas em nenhum caso depois de 16 horas após serem encontrados.

[00520] Pesos Corporais: Todos os animais foram pesados após a liberação da quarentena e este peso será o peso corporal pré-estudo usado para aleatorizar animais em grupos de dose. Os pesos corporais foram coletados na manhã antes da exposição e novamente em necrópsia.

[00521] Coleta de Sangue para Química Clínica e Hematologia: As amostras sanguíneas para hematologia e química clínica foram coletadas durante a necrópsia. Para Contagem Sanguínea Completa (CBC) com diferenciais absolutos, sangue total (alvo 0,5 ml) foi coletado e colocado em tubos que contêm etilenodiaminatetraacetato tripotássico (K_3EDTA) como um anticoagulante. As amostras de hematologia foram analisadas por análises automatizadas (ADVIA™ 120 Hematology System, Siemens Medical Solutions Diagnostics, Tarrytown, NY). Os parâmetros para hematologia são: Contagem de Eritrócitos (RBC) $10^6/\mu l$; Hemoglobina (HGB) g/dl; Hematócrito (HCT)%; Volume Corpuscular Médio (MCV) fl; Concentração (MCHC) g/dl; Hemoglobina Corpuscular Média (MCH) pg; Contagem de Plaquetas (PLT) ($10^3/\mu l$); Porcentagem de Reticulócitos (RETIC)% de RBC; Contagem de Leucócitos (WBC) $10^3/\mu l$; Neutrófilos (PMN) $10^3/\mu l$; Linfócitos (LYM) $10^3/\mu l$; Monócitos (MONO) $10^3/\mu l$; Eosinófilos (EOS) $10^3/\mu l$; Basófilos (BASO) $10^3/\mu l$; Células Não Coloridas Grandes (LUC) $10^3/\mu l$.

[00522] Para análises químicas clínicas, sangue total ($\geq 0,5$ ml) foi colocado em separador de soro ou tubo de coágulo para centrifugação e separação em frações celulares e séricas. As amostras séricas foram analisadas em um Sistema Hitachi Modular Analytics Clinical Chemistry (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN). Os parâmetros químicos clínicos medidos ou calculados são: Alanina Aminotransferase

(Alanina Transaminase)-Soro (ALT) IU/L; Albumina (ALB) g/dl; Aspartato Aminotransferase (Aspartato Transaminase)-Soro (AST) IU/L; Bilirrubina (Total) (BILI-T) mg/dl; Nitrogênio de Ureia Sanguínea (BUN) mg/dl; Cálcio (CA) mg/dl; Cloreto (Soro) (CL-S) mmol/L; Colesterol (Total) (CHOL) mg/dl; Creatinina (Soro) (CRE-S) mg/dl; Glicose (GLU) mg/dl; Glutamilttransferase Gama (GGT) IU/L; Fosfatase Alcalina (ALP) IU/L; Fosfato (PHOS) mg/dl; Potássio (Soro) (K-S) mmol/L; Proteína (Total) (TP) g/dl; Sódio (Soro) (NA-S) mmol/L; Triglicerídeos (TRIG) mg/dl; Albumina/Globulina (A/G) nenhuma unidade; Nitrogênio de Ureia Sanguínea/Creatinina (BUN/CRE) nenhuma unidade; Globulina (GLOBN) g/dl.

[00523] Avaliações de hematologia e química clínica foram realizadas em todos os animais de estudo para os quais os volumes de amostra são obtidos e para os quais nenhum problema analítico é encontrado. Se os volumes de coleta-alvo não são obtidos ou se avaliações não são realizadas, uma razão e notação serão incluídos nos dados brutos. As amostras sanguíneas restantes ou soro serão descartados após as análises.

[00524] Coleta Sanguínea para Análise Bioanalítica: Após a exposição, as coletas de sangue não terminais foram realizadas em 2 animais por sexo em 0,5, 2, e 8 horas pós-exposição. Aproximadamente 1 ml de sangue total sistêmico foram coletados por veia jugular em tubos que contêm K₃EDTA como um anticoagulante. Os tubos foram congelados com nitrogênio líquido armazenado sem processamento a -70 a -90 °C até o transporte para análise com o uso de ensaio ICP-MS para quantificação de bismuto como um representante para BisEDT.

[00525] Eutanásia e necrópsia: Os animais foram submetidos ao jejum de um dia para o outro antes da necrópsia programada (24 h pós-exposição). Em necrópsia programada ou em casos de morbidez,

animais foram submetidos à eutanásia por injeção intraperitoneal de uma overdose de um sedativo à base de barbiturato. As necrópsias grossas detalhadas foram realizadas em todos os animais (encontrados mortos, moribundos, ou com necrópsia programada) e consistiram em uma examinação externa e interna completa incluindo orifícios corporais e órgãos e tecidos cranianos, torácicos e abdominais. Todas as constatações grosseiras serão registradas em termos descritivos. O sangue total foi coletado para análise bioanalítica, hematologia, e química clínica em necrópsia. Pulmões coletados e pesados. O lóbulo esquerdo foi removido e congelado para futura análise potencial. Os lóbulos direitos foram lavados 3x com o uso de 4 ml/lavagem de solução salina tamponada com fosfato (PBS). Após a lavagem ser completa, os lóbulos direitos foram congelados em nitrogênio líquido para futura análise potencial.

[00526] Este Exemplo descreve os resultados de estudos de PK de rato de dose única de BisEDT que comparam inalação, IV, e dosagem oral. As conclusões primárias são que (1) BisEDT permanece no tecido pulmonar após a dosagem de inalação com uma meia-vida de aproximadamente 4 dias (Figura 34); (2) há concentrações sanguíneas muito baixas, mas sustentadas e mensuráveis após dosagem oral; (3) a dosagem IV parece seguir um padrão bifásico com distribuição inicial em tecidos por 18 horas, seguido por uma fase de eliminação sistêmica lenta; (4) BisEDT não divide de modo notável em tecido pulmonar após IV ou dosagem oral - nenhum nível de pulmão após baixos níveis orais e pulmonares detectado após dosagem IV (<5% vs grupo de inalação) e níveis caíram rapidamente com cerca de 24 horas de meia-vida. Isto indica que BisEDT sistêmico não se divide em tecido pulmonar e que os níveis de pulmão medidos após a dosagem de inalação são devido às partículas de fármaco depositadas na superfície apical; (5) após a dosagem de inalação, há exposição sanguínea moderada

sustentada com concentrações relativamente estáveis através do tempo, indicando que o fármaco nos pulmões atua como um depósito; (6) BisEDT foi tolerado em inalação 100 µg/kg e IV e oral 250 µg/kg. Com base nestes dados, as baixas doses dadas diariamente ou dia sim, dia não são propensas a fornecer níveis de fármaco muito estáveis em tecido e sangue (pequenas diferenças entre mínimo e máximo). Se a margem de segurança é demonstrada como grande o suficiente durante a toxicologia de GLP e/ou estudos clínicos, é possível alongar o intervalo de dosagem e aumentar a dose consequentemente. Aumentar a dose e o intervalo leva a flutuações maiores em níveis sanguíneos e de tecido entre níveis de pico (após dosagem) e através de níveis (antes da dosagem).

[00527] Com base nos dados de toxicologia in vivo e in vitro existentes, assim como dados de PK de rato e MIC in vitro, a suspensão de BisEDT para inalação pode ser confiavelmente administrado em doses que fornecem níveis pulmonares eficazes que são tolerados, e é portanto um candidato de desenvolvimento clínico viável. Conforme observado acima, BisEDT permanece no tecido pulmonar por muito tempo a após a dosagem de inalação com uma meia-vida de aproximadamente 4 dias (Figura 35). 24 horas após a dose de inalação única, 4.093 ng/g foram medidos no tecido pulmonar (que se iguala a 123 µg/ml em fluido de pulmão) e 4 dias (96 h) após a dose única 2.600 ng/g em tecido pulmonar (que se iguala a 78 µg/ml em fluido pulmonar). Sem se atrelar a qualquer teoria particular, acredita-se que a baixa solubilidade de BisEDT fornece dissolução lenta e longa exposição em fluidos de superfície pulmonar com exposição sistêmica limitada por meio de difusão através do epitélio pulmonar. O pulmão parece atuar como um depósito para exposição sistêmica lenta com cerca de níveis sistêmicos 10x inferiores em relação ao visto no pulmão. A fase terminal dos dados IV parece mostrar eliminação lenta após a distri-

buição de tecido inicial (Figura 36).

[00528] As Tabelas 11 e 12 abaixo mostram BisEDT de sangue total versus dados de tempo e concentração de BisEDT pulmonar em dados de tempo de sacrifício, respectivamente. Estes resultados também são mostrados graficamente nas Figuras 37 e 38.

TABELA 11: BISEDT DE SANGUE INTEGRAL VERSUS DADOS DE TEMPO

Dose (µg/kg)	Tempo Nominal (h)	Conc Média de BisEDT (ng/ml)	STDEV
3.000	1	485	244
3.000	2	2.504	547
3.000	8	6.570	1.729
3.000	24	20.525	4.907
47	8	114	64
47	12	98	35
47	24	282	84
47	30	373	201
400	8	1.701	542
400	12	1.252	368
400	24	2.700	607
400	30	2.738	1.028
124	8	247	3
124	12	187	78
124	24	571	93
124	30	668	239
0	30	0	N/D
0	30	0	N/D
0	30	0	N/D

TABELA 12: CONC. DE BISED T PULMONAR EM SACRIFÍCIO

Dose (µg/kg)	Tempo de sac (h)	Conc. Média de BisEDT (ng/g)	STDEV
3.000	24	82,3	8,7
400	30	12,1	4
124	30	5,9	0,9
47	30	4,8	1,1
0	30	0	N/D

[00529] A eficácia de BisEDT na redução de fardo bacteriano pulmonar associada à infecção pulmonar em um modelo de rato de infecção por *Pseudomonas aeruginosa* pulmonar foi avaliada. Os resultados seguem.

[00530] *Concentração de aerossol:* Os resultados de concentração de aerossol (gravimétrica e química) são apresentados na Tabela 13. Nenhum BisEDT foi detectado por análise química do veículo, conforme esperado. A análise gravimétrica é listada. A concentração de controle positivo (Tobramicina) foi determinada gravimetricamente e todas as atmosferas de exposição variaram em menos do que 10% através de ambos os coortes e todos os dias de exposição. A concentração de artigo de teste, determinada por análise química, variou em menos do que 5,1% para todos os coortes de exposição e dias e foi 11,5 µg/l.

TABELA 13. CONCENTRAÇÃO MÉDIA DE ATMOSFERAS DE EXPOSIÇÃO

Grupo	Método de Análise	Concentração Média	RSD
Veículo	Gravimétrica	0,11 ± 0,02 mg/L	14,8%
Tobramicina	Gravimétrica	1,26 ± 0,10 mg/L	8,3%
BisEDT	Química	11,5 ± 0,6 µg/L	5,1%

[00531] *Dose Distribuída:* Tabelas 14 e 15 descrevem as doses apresentadas e teóricas calculadas distribuídas para os animais neste

estudo. A dose apresentada é definida como a quantidade inalada total de material, que compreende material depositado nos seios nasais, garganta, região orofaríngea, pulmão, assim como material exalado. A dose teórica depositada, ou quantidade de material que é realmente depositada na superfície do pulmão, é considerada como 10% da dose apresentada em ratos (Inhal Toxicol. Outubro de 2008;20(13):1.179 a 1.189. doi: 10.1080/08958370802207318, que é incorporado a título de referência, em sua totalidade). Cada peso corporal atual do animal e condição de exposição foram considerados como fator nas equações acima para determinação de dose. As exposições de Grupo 3 e Grupo 4 tiveram 13 minutos e 30 minutos em duração, respectivamente. Os filtros de veículo foram analisados quimicamente para BisEDT e todos os filtros estiveram abaixo de limites de detecção. Os filtros de controle positivo (tobramicina) foram analisados de modo gravimétrico e a dose média apresentada para todos os coortes e dias foi 29,0 mg/kg, superior ao valor de 20 mg/kg especificado no protocolo de estudo. As doses médias apresentadas para os grupos de baixa e alta concentração de BisEDT foram 0,114 mg/kg e 0,264 mg/kg, respectivamente. O protocolo de estudo demandou doses de 0,1 mg/kg e 0,25 mg/kg para estes grupos. Os detalhes de doses recebidas por grupos de exposição por dia e coorte são listados nas Tabelas 14 e 15 abaixo.

TABELA 14. SUMÁRIO DE DOSE APRESENTADA

Grupo	Dia	Dose de Coorte 1 (mg/kg)	Dose de Coorte 2 (mg/kg)
Veículo	0	BDL	BDL
Veículo	2	BDL	BDL
Veículo	4	BDL	BDL
Tobramicina	1	31,0 ± 3,4	28,9 ± 1,8
Tobramicina	2	29,0 ± 1,9	27,9 ± 0,8

Grupo	Dia	Dose de Coorte 1 (mg/kg)	Dose de Coorte 2 (mg/kg)
Tobramicina	3	27,9 ± 0,7	29,3 ± 1,8
Tobramicina	4	29,3 ± 1,7	28,5 ± 2,3
BisEDT (0,1 mg/kg)	0	0,121 ± 0,002	0,110 ± 0,002
BisEDT (0,1 mg/kg)	2	0,120 ± 0,002	0,120 ± 0,002
BisEDT (0,1 mg/kg)	4	0,101 ± 0,002	0,114 ± 0,002
BisEDT 0,25 mg/kg	-1	0,263 ± 0,005	0,264 ± 0,003

Tabela 15. Sumário de Dose Depositada Teórica

Grupo	Dia	Dose de Coorte 1	Dose de Coorte 2
Veículo	0	BDL	BDL
Veículo	2	BDL	BDL
Veículo	4	BDL	BDL
Tobramicina	1	3,1 mg/kg	2,9 mg/kg
Tobramicina	2	2,9 mg/kg	2,8 mg/kg
Tobramicina	3	2,8 mg/kg	2,9 mg/kg
Tobramicina	4	2,9 mg/kg	2,9 mg/kg
BisEDT (0,1 mg/kg)	0	12,1 µg/kg	11,0 µg/kg
BisEDT (0,1 mg/kg)	2	12,0 µg/kg	12,0 µg/kg
BisEDT (0,1 mg/kg)	4	10,1 µg/kg	11,4 µg/kg
BisEDT 0,25mg/kg	-1	26,5 µg/kg	26,4 µg/kg

[00532] *Distribuição de Tamanho de Partícula:* As distribuições de tamanho de partícula (Figuras 38 a 40) para cada condição de exposição foram determinadas com o uso de um Impactador In-Tox Mercer. A Figura 39 mostra a distribuição de tamanho de aerossol de BisEDT medida durante o estudo. A Tabela 16 fornece sumários de distribuições de tamanho de partícula (PSD) e desvios padrão geométrico (GSD) por cada tipo de exposição.

TABELA 16. SUMÁRIO DE DISTRIBUIÇÕES DE TAMANHO PARA CONDIÇÕES DE EXPOSIÇÃO DIFERENTES

Condições de Exposição	MMAD (μm)	GSD (μm)
Veículo	1,26	1,81
Tobramicina	2,81	1,87
BisEDT	1,54	1,83

[00533] A Figura 42 mostra figuras de eficácia em rato que mostram a dose administrada cumulativa (total) (depositada no pulmão) nos dias 3 e 5. Conforme pode ser visto a partir desta figura, a razão de massa de fármaco distribuído é surpreendente em comparação com Tobi.

[00534] *Conclusão:* Animais foram divididos em quatro grupos de tratamento de inalação de experimento: 1) Grupo 1, um grupo de controle negativo tratado com solução salina nos Dias 0, 2, e 4; 2) Grupo 2, um grupo de controle positivo tratado com tobramicina (alvo de 20 mg/kg, BID, Dias 1 a 4); 3) Grupo 3, BisEDT (alvo de 0,1 mg/kg, QD, Dias 0, 2, 4); e Grupo 4, BisEDT (alvo de 0,25 mg/kg, uma vez, Dia -1). Os animais foram adicionalmente divididos em dois coortes, separados por um dia, para acomodar o desafio e o tratamento do número de animais. Todos os animais foram expostos por protocolo exceto pelos Grupos 1 e 3, coorte 2. Estes animais foram expostos nos Dias 0, 1, e 4 em vez de nos Dias 0, 2, 4.

[00535] BisEDT não foi detectado em animais que recebem solução salina (controle negativo). Animais tratados duas vezes por dia (8 doses) com tobramicina receberam uma dose média de 29,0 mg/kg. Esta dose representa 145% da dose alvejada. Visto que a tobramicina é usada como um controle positivo para garantir a função de modelo em vez de uma comparação direta, ou como um competidor, para a atividade do artigo de teste, a dose aumentada não impacta o estudo. Os

animais tratados com três doses alvejadas de BisEDT 0,1 mg/kg receberam uma média de 0,114 mg/kg que representa 114% da dose alvejada. Para o Grupo 3 (dose alvejada de 0,1 mg/kg), doses médias de coorte 1 e 2 para cada dia foram 0,114 e 0,115, respectivamente. Um teste t não pareado (GraphPad Prism 5.0) que compara a dose média pelos três dias de tratamento demonstrou que as diferenças entre os coortes não foram significativas (valor $p = 0,93$). Os animais que receberam a dose alvejada profilática única de 0,25 mg/kg receberam doses principalmente idênticas de 0,263 mg/kg (coorte 1) e 0,264 mg/kg (coorte 2) de BisEDT, ou 105% e 106%, respectivamente da dose alvejada.

[00536] As partículas geradas para exposição foram consideradas respiráveis. O MMAD médio de controle positivo (tobramicina) de 2,81 μm com um GSD de 1,87 μm . MMAD de partícula de aerossol de tratamento de controle negativo (solução salina) e tratamento de artigo de teste (BisEDT) foram 1,26 μm e 1,54 μm com um GSD de 1,81 e 1,83, respectivamente.

EXEMPLO 9: ESTUDO DE BISEDT APÓS INALAÇÃO DE MÁSCARA DE FACE EM CÃES BEAGLE

[00537] O objetivo do estudo é determinar a dose máxima tolerada (MTD) ou dose máxima praticável (MFD) de bismuto etanoditiol inalado (BisEDT) após exposição de inalação de máscara de face (até 60 min de exposição) em cães beagle macho e fêmea. Os animais serão monitorados por até 14 dias após o primeiro dia de exposição e o sangue será coletado em pontos no tempo predeterminados para analisar farmacocinética de BisEDT. Além disto, um painel de coagulação será conduzido antes da necrópsia. Na conclusão do estudo, os animais serão submetidos à eutanásia e serão submetidos à necrópsia durante a qual o trato respiratório será colhido para análise bioanalítica e histopatológica. Os resultados obtidos informarão um estudo de GLP de

dose repetida de acompanhamento. Este artigo de teste está atualmente sendo desenvolvido como uma formulação inovadora de um agente antimicrobiano/antibiofilme de espectro amplo, indicado para o tratamento de infecções pulmonares em pacientes com fibrose cística.

[00538] *Materiais:* BisEDT foi fornecido por Dalton Pharma Services; nº de Lote ED268-I-II-O I e armazenado à temperatura ambiente. O veículo usado neste estudo foi Tween 80 0,5%, fosfato de sódio 10 mM, pH 7,4, em NaCl (ajustado para aproximadamente 300 mOsm) em água que foi armazenada à temperatura ambiente.

[00539] *Caninos:* Caninos machos e caninos fêmeas, cães beagle, com idade de 5 a 7 meses foram usados neste estudo. Os machos pesaram 6 a 10 kg e as fêmeas pesaram 5 a 9 kg. 6 machos e 6 fêmeas foram usados.

[00540] *Alojamento:* Animais são alojados em canis internos ou externos.

[00541] *Condicionamento:* Animais são condicionados para máscaras de restrição e de face.

[00542] *Alimentação:* Dieta Proteica 2025C Harlan Global 25% (Harlan Teklad, Madison, WI) uma vez por dia (exceto durante exposições de condicionamento e inalação). Todos os cães são submetidos ao jejum à noite antes de todas as amostras sanguíneas coletadas para hematologia, química clínica, e análise de coagulação. Cada lote de alimento é analisado em relação a contaminantes pelo fabricante e usado na vida em prateleira designada pelo fabricante. Não se espera que nenhum contaminante esteja presente em níveis que interfeririam com o resultado do estudo. A água municipal com acesso ilimitado foi usada, exceto durante as exposições de condicionamento e inalação.

[00543] *Condições Ambientais:* As condições alvejadas para temperatura de canil e fotoperíodo será conforme o seguinte: Temperatura: 18 a 29 °C; Ciclo de Luz: 12 h (em cada dia de exposição, o ciclo de

luz pode ser estendido para acomodar as coletas de amostra sanguínea).

[00544] *Morbidez e Mortalidade:* Animais são observados duas vezes por dia quanto à morbidez e mortalidade. Se constatados como moribundos, os animais serão submetidos à eutanásia por uma overdose de uma solução de eutanásia aprovada. Apenas animais saudáveis são estudados.

[00545] Uma vez adequadamente condicionados ao dispositivo de restrição e máscaras de face, os animais são individualmente expostos aos aerossóis de artigo de teste. O projeto experimental é mostrado na Tabela 17. Os animais recebem uma exposição de inalação de máscara de face única em um projeto de estudo de rampa para testar os aerossóis de artigo por até 60 min. As observações de animais durante e pós-exposição determinam a tolerância de aerossóis de BisEDT inalados.

[00546] O Grupo 1 (veículo) é exposto a uma atmosfera de veículo por 30 minutos. O Grupo 2 (50 µg/kg) é exposto a BisEDT por 30 minutos. As durações de exposição e concentrações-alvo para os Grupos 3 a 5 têm base na presença de qualquer toxicidade por meio de observações clínicas ou constatações de necrópsia grosseiras. Em cada um dos Grupos 3 a 5, se nenhum sinal clínico adverso de toxicidade for observado, a exposição do próximo grupo será conduzida em uma dose-alvo mais alta. Se nenhum sinal clínico adverso de toxicidade for observado, a exposição do próximo grupo será conduzida em uma dose-alvo mais baixa. Esta abordagem é repetida para todas as doses de BisEDT. A duração de exposição documentada final é a dose tolerada máxima ou a dose praticável máxima.

[00547] Sangue é coletado para análise farmacocinética (PK), hematologia, química clínica e análise de coagulação.

[00548] Em cada ponto no tempo programado (ou em casos de morbidez), animais serão submetidos à eutanásia.

TABELA 17. PROJETO EXPERIMENTAL

Grupo	Exposição ^a	Dose-alvo	Gênero/IDs de Animal	Coleta de Sangue ^{d,e}
1	Dia 0 e Dia 7: Veículo TA	n/d	Macho: 1001 Fêmea: 1002	ND
2	Dia 0 e Dia 7: BisEDT	Baixo 50 µg/kg	Macho: 2001 Fêmea: 2002	4 h (±5 min), Dia 1, Dia 2, Dia 7 (pré-exposição), Dia 7 (pós-exposição), Dia 8, Dia 9, Dia 10, Dia 11, Dia 12, Dia 13, Dia 14
3	Dia 0 e Dia 7: BisEDT	Baixo-Médio: TBDc	Macho: 3001 Fêmea: 3002	
4	Dia 0 e Dia 7: BisEDT	Médio-Alto: TBDc	Macho: 4001, 4003 Fêmea: 4002, 4004	
5 ^b	Dia 0 e Dia 7: BisEDT	Alto: TBDc	Macho: 5001 Fêmea: 5002	
^a Todos os grupos consistem em 1 animal macho e 1 fêmea expostos no Dia 0 e Dia 7. Todos os Grupos são terminais no Dia 14. O Grupo 4 inclui 2 animais adicionais (1 fêmea e 1 macho) com necrópsia realizada no Dia 21. ^b O Grupo 5 será incluído se o Grupo 4 não mostrar sinais de toxicidade. ^c TBD: As concentrações serão documentadas por notas e incluídas no relato de estudo final e terão base nos resultados do grupo de exposição anterior. ^d As coletas de sangue para os animais adicionais (4003 e 4004) no Grupo 4 são: Dia 15, Dia 16, Dia 17, Dia 18, Dia 19, Dia 20, Dia 21. ^e Coleta de sangue para análise de PK.				

[00549] **Formulação de BisEDT:** A formulação de BisEDT 5,0 mg/ml inicial é preparada em Tween 80 0,5%, fosfato de sódio 10 mM, pH 7,4, em NaCl (ajustado a aproximadamente 300 mOsm). Em cada dia de exposição, a formulação é analisada.

[00550] **Administração de Artigo de Teste:** Um esquema representativo é apresentado na Figura 41. O sistema de geração de aerossol acopla um nebulizador de jato de ar comprimido comercialmente disponível a uma câmara que permite que os aerossóis transitem para os animais. A exposição é por inalação de máscara de face pelo projeto de estudo acima. As durações de exposição não excedem 60 min. A concentração de formulação e a duração de exposição são moduladas para alcançar doses-alvo se necessário.

[00551] Os animais serão transportados para a sala de exposição e colocados em tabelas de exposição com coleiras de restrição. As

máscaras de face conectadas à câmara serão colocadas no animal imediatamente antes do começo do período de exposição. O oxigênio de câmara de exposição e temperatura (%) será monitorado ao longo da exposição.

[00552] *Monitoramento de Concentração:* O monitoramento de concentração de aerossol é conduzido coletando-se aerossóis em filtros de 47 mm GF/A pré-pesados. Os filtros são amostrados a partir da câmara de exposição ao longo da exposição. A taxa de fluxo de amostragem de aerossol através de filtros GF/A é mantida em $0,5 \pm 0,1$ l/min. Após a coleta de amostra, os filtros são pesados para determinar a concentração de aerossol total no sistema de exposição. Os filtros são extraídos e analisados. Com base na concentração de aerossol de exposição média de BisEDT, a dose depositada é calculada.

[00553] *Determinação de Tamanho de Partícula:* A distribuição de tamanho de partícula de aerossóis é medida da zona de respiração da exposição câmara por um impactador em cascata de sete estágios estilo Mercer (Intox Products, Inc., Albuquerque, NM). A distribuição de tamanho de partícula é determinada em termos de diâmetro aerodinâmico mediano de massa (MMAD) e desvio padrão geométrico (GSD). A amostra de impactador em cascata é coletada em uma taxa de fluxo de $2,0 \pm 0,1$ l/min.

[00554] *Determinação de Dose Pulmonar:* A dose depositada é calculada com o uso da equação abaixo. Neste cálculo, a concentração de aerossol média medida da exposição juntamente com o peso corporal dos animais individuais para cada dia de exposição específico será usada. Desta maneira, a quantidade estimada de BisEDT que é depositada nos pulmões será calculada com o uso da concentração de aerossol de BisEDT medida.

$$DD(\mu\text{g/kg}) = \frac{AC(\mu\text{g/L}) \times RMV(\text{L/min.}) \times DF \times T(\text{min.})}{BW(\text{kg})}$$

em que:

Dose Depositada = (DD) $\mu\text{g/kg}$

Volume respiratório por minuto (RMV) = $0,608 \times \text{BW}^{0,852}$
(Alexander DJ *et al.*, 2008)

Concentração de exposição de aerossol (AC) = concentração de aerossol de BisEDT ($\mu\text{g/l}$)

Fração de Deposição (DF) = fração de deposição assumida de 25%

BW = peso corporal do animal individual em estudo (kg)

OBSERVAÇÕES E MEDIÇÕES

[00555] *Observações Clínicas e Mortalidade/Morbidez:* As observações clínicas detalhadas são registradas começando no dia de dose com observações registradas duas vezes por dia (manhã e tarde) da chegada do dia de exposição. As observações gerais incluem, mas sem limitação, apneia, respiração dificultada, mal-estar, descarga nasal marcada, etc. Atenção especial é dada a sinais clínicos associados ao trato respiratório. Os animais que mostram sinais severos de perturbação são submetidos à eutanásia na discricção do Diretor de Estudo e em consulta com a equipe veterinária. As examinações são orientadas em direção à (1) identificar animais mortos, fracos ou moribundos, e (2) documentar o início e a progressão de quaisquer sinais clínicos anormais. Os animais moribundos ou mortos são submetidos à necrópsia o mais cedo possível após serem encontrados, mas em nenhum caso depois de 16 h após serem encontrados.

[00556] *Pesos Corporais:* Todos os animais são pesados após a liberação da quarentena e este peso será o peso corporal pré-estudo usado para aleatorizar animais em grupos de dose. Pesos corporais são coletados na manhã antes da exposição e na necrópsia.

[00557] *Coletas de Sangue e Análise Bioanalítica:* O sangue é coletado para análise farmacocinética (PK) antes da exposição, então, em 4 h (± 5 min) pós-exposição, e novamente no Dia 1, Dia 2, Dia 7 (pré- e

4 h (± 5 min)-pós-exposição), Dia 8, Dia 9, Dia 10, Dia 11, Dia 12, Dia 13, e Dia 14. Um total de 0,25 ml é coletado em cada ponto no tempo. Nenhum sangue de PK é coletado dos animais de controle de veículo (Grupo 1); apenas animais expostos a BisEDT têm sangue coletado para análise de PK. As amostras coletadas são congeladas sem o processamento para transporte para Medpace para análise bioanalítica. Sangue adicional é coletado de todos os animais em todos os grupos para hematologia (1 ml) e química clínica (1 ml) na linha basal, Dia 7 (pré-exposição), e novamente em eutanásia. Sangue (2-2 ml) é coletado de todos os animais em necrópsia para análise de coagulação (d-dímero, fibrinogênio, PT, e PTT).

[00558] As amostras sanguíneas são coletadas da veia jugular ou outra veia periférica (cefálica ou safena).

[00559] O sangue para análise farmacocinética (0,25 ml) é coletado em tubos que contêm K₃EDTA como um anticoagulante. Os tubos são congelados com nitrogênio líquido e armazenados sem processamento a -70 a -90 °C até o transporte para análise com o uso de ensaio ICP-MS para quantificação de bismuto como um representante para BisEDT.

[00560] Para análises de hematologia, o sangue total (1 ml) será coletado com vacutainers que contêm K₃EDTA como um anticoagulante.

[00561] Para análises químicas clínicas, sangue total (1 ml) é colocado em separador de soro ou tubo de coágulo e processado para plasma por centrifugação em um mínimo de 1.300 g em 2 a 8 °C por 10 (± 1) min. As amostras de plasma são armazenadas em -70 a -90 °C até a análise.

[00562] Para análises de coagulação, sangue (2-2 ml de amostras) é coletado em tubos que contêm anticoagulante de citrato de sódio, processados, e o plasma citado congelado e mantido para análise. Tempo de Protrombina (PT), Tempo de Tromboplastina Parcial ativada (aPTT), d-Dímero, e fibrinogênio são analisados em cada animal. As

amostras serão centrifugadas (1.500 rpm, 15 minutos), plasma dividido em alíquotas em frascos criogênicos, e armazenados em congelamento (-70 a -90 °C) até a análise.

[00563] *Hematologia e Química Clínica*: Todos os cães são submetidos ao jejum à noite antes de todas as amostras sanguíneas coletadas para hematologia, química clínica, e análise de coagulação.

[00564] As amostras de hematologia são analisadas por análises automatizadas (ADVIA™ 120 Hematology System, Siemens Medical Solutions Diagnostics, Tarrytown, NY). A disposição será registrada na forma de processamento de amostra. Parâmetros para hematologia são mostrados na Tabela 18.

[00565] As amostras clínicas são analisadas em um Sistema Hitachi Modular Analytics Clinical Chemistry (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN). Os parâmetros de química clínica são mostrados na Tabela 19.

[00566] Se os volumes de coleta-alvo necessários para hematologia ou análise de química clínica não são obtidos, nenhuma análise será realizada para este animal. Além disto, se as avaliações não podem ser realizadas, uma razão e uma notação serão incluídos no arquivo de estudo.

TABELA 18. PARÂMETROS DE HEMATOLOGIA

Parâmetro	Abreviação ^a	Unidades
Contagem de Eritrócitos	RBC	10 ⁶ /μl
Hemoglobina	HGB	g/dl
Hematócrito	HCT	%
Volume Corpuscular Médio	MCV	fl
Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média	MCHC	g/dl
Hemoglobina Corpuscular Média	MCH	pg
Contagem de Plaquetas	PLT	10 ³ /μl
Porcentagem de Reticulócitos	RETIC	% de RBC
Contagem de Leucócitos e Diferencial Absoluto		
Contagem de Leucócitos Neutrófilos	WBC PMN	10 ³ /μl 10 ³ /μl
Linfócitos	LYM	10 ³ /μl
Monócitos	MONO	10 ³ /μl
Eosinófilos	EOS	10 ³ /μl

Parâmetro	Abreviação ^a	Unidades
Basófilos	BASO	103/ μ l
Células Grandes Não Coloridas	LUC	103/ μ l
^a As abreviações do sistema de hematologia diferem daquelas listadas acima, entretanto, os resultados finais serão relatados conforme descrito acima		

TABELA 19. PARÂMETROS DE QUÍMICA CLÍNICA

Analito	Abreviação ^a	Unidades
Alanina Aminotransferase (Alanina Transaminase)-Soro	ALT	IU/L
Albumina	ALB	g/dl
Aspartato Aminotransferase (Aspartato Transaminase)-Soro	AST	IU/L
Bilirrubina (Total)	BILI-T	mg/dl
Nitrogênio de Ureia Sanguínea	BUN	mg/dl
Cálcio	CA	mg/dl
Cloreto (Soro)	CL-S	mmol/l
Colesterol (Total)	CHOL	mg/dl
Creatinina (Soro)	CRE-S	mg/dl
Glicose	GLU	mg/dl
Glutamiltransferase Gama	GGT	IU/L
Fosfatase Alcalina	ALP	IU/L
Fosfato	PHOS	mg/dl
Potássio (Soro)	K-S	mmol/l
Proteína (Total)	TP	g/dl
Sódio (Soro)	NA-S	mmol/l
Triglicerídeos	TRIG	mg/dl
Razões e Parâmetros Calculados		
Albumina/Globulina	A/G	Nenhum
Nitrogênio de Ureia Sanguínea/Creatinina	BUN/CRE	Nenhum
Globulina	GLOBN	g/dl
^a As abreviações do sistema de química diferem daquelas listadas acima, entretanto, os resultados finais serão relatados conforme descrito acima		

EUTANÁSIA, NECRÓPSIA E HISTOLOGIA

[00567] *Eutanásia*: Em necrópsias programadas (Dia 14 ou Dia 21, respectivamente) ou nos casos de estado moribundo, os animais são tranquilizados e submetidos à eutanásia por um veterinário ou seu dono. Os animais são tranquilizados por administração de acepromazina (0,02 a 0,2 mg/kg, IM) e butorfanol ($\geq$ 0,33 mg/kg, IM). Após a seda-

ção, um cateter intravenoso é colocado para acomodar a administração de um coquetel de cetamina/diazepam e enxaguado com uma solução salina. O coquetel é uma mistura proporcional de 1 ml de cetamina (100 mg/ml) e 1 ml de diazepam (5 mg/ml). O coquetel é, então, administrado a uma dose de ≥ 1 ml/ 9 kg de peso corporal. Nota: Se um cão é suficientemente sedado após o uso de acepromazina e butorfanol, a administração de coquetel de cetamina/diazepam pode não ser necessária ou administrada e será documentada. O animal é, então, submetido à eutanásia por uma overdose de um sedativo à base de barbiturato (Euthasol®, ≥ 1 ml/4,5 kg, IV) e enxaguado com uma solução salina. Se necessário, exsanguinação pode ser realizada.

[00568] *Necrópsia*: Necrópsias grossas detalhadas são realizadas em todos os animais e consistirão em uma examinação externa e interna incluindo orifícios corporais (olhos, narinas, boca, ânus, etc.) e órgãos e tecidos cranianos, torácicos e abdominais. Todas as constatações grosseiras são registradas em termos descritivos, tipicamente incluindo localização (ou localizações), tamanho (em mm), formato, cor, consistência e número. Os animais encontrados mortos serão refrigerados até a necrópsia poder ser realizada. Uma causa de morte é determinada se possível.

[00569] O lóbulo esquerdo do pulmão é usado para histopatologia e será fixado em NBF 10%. O lóbulo intermediário direito tem três seções de aproximadamente 1 grama coletadas e congeladas com nitrogênio líquido para análise bioanalítica; as amostras serão armazenadas a -70 a -90 °C até o transporte para análise com o uso de ensaio ICP-MS para quantificação de bismuto como um representante para BisEDT. Fígado, baço, rim, cérebro, coração, e trato respiratório são coletados e fixados para futura análise potencial.

[00570] *Histologia e Patologia*: Pulmões são preparados e incorporados, cortados e montados em placas, coloridos com hematoxilina e

eosina, e avaliados por um patologista. Além disto, as lesões representativas observadas e coletadas durante a necrópsia podem ser avaliadas. A histologia é conduzida no Grupo 1 e no Grupo 4; as análises adicionais podem ser conduzidas por Emenda ao Protocolo de Estudo Aprovado.

RESULTADOS

[00571] A Tabela 20 mostra a dose depositada real de BisEDT no pulmão para cães testados. A Tabela 21 mostra os resultados de hematologia e a Tabela 22 mostra resultados de química clínica para os cães testados.

TABELA 20: DOSES DEPOSITADAS NO PULMÃO REAIS POR GRUPO/Nº DE ANIMAL:

Nº de Animal	Grupo	Dose depositada de pulmão, ug/kg
1001	1	0
1002	1	0
2001	2	55
2002	2	56
3001	3	112
3002	3	111
4001	4	176
4002	4	180
4003	4	195
4004	4	197

TABELA 21: SUMÁRIO DE HEMATOLOGIA

Indivíduo/ Lote de QC	Sexo / Identi- ficador de QC	WBC ^3/ul	RBC ^6/ul	HGB g/dl	HCT %	MCV fl	MCH pg	MCHC g/dl	PLT ^3/ul	NEUT ^3/ul	LYMP ^3/ul	MONO ^3/ul	EOS ^3/ul	BASO ^3/ul	LUC ^3/ul	RET% %
1001	Masculino	13,48	6,75	15,9	46,6	69,1	23,5	34,0	250	8,56	3,73	0,82	0,15	0,20	0,03	0,72
1001	Masculino	7,98	5,89	13,8	39,8	67,7	23,4	34,7	241	5,00	2,26	0,54	0,08	0,07	0,02	0,34
1001	Masculino	9,32	6,15	14,3	42,8	69,6	23,2	33,4	106	6,37	2,22	0,57	0,05	0,08	0,01	0,39
1002	Feminino	9,18	7,54	17,0	51,2	67,9	22,6	33,2	297	3,97	3,89	0,39	0,73	0,17	0,02	0,51
1002	Feminino	8,67	6,75	16,0	44,6	66,1	23,6	35,8	168	5,92	1,83	0,68	0,10	0,13	0,01	0,23
1002	Feminino	7,98	6,47	15,0	45,2	69,9	23,3	33,3	193	5,38	1,75	0,72	0,07	0,06	0,02	0,44
Grp 1	Média	11,33	7,15	16,5	48,9	68,5	23,1	33,6	273,5	6,27	3,81	0,61	0,44	0,19	0,03	0,62
Grp 1	Média	8,33	6,32	14,9	42,2	66,9	23,5	35,3	204,5	5,46	2,05	0,61	0,09	0,10	0,02	0,29
Grp 1	Média	8,65	6,31	14,7	44,0	69,8	23,3	33,4	149,5	5,88	1,99	0,65	0,06	0,07	0,02	0,42
2001	Masculino	9,18	6,83	15,6	45,8	67,0	22,8	34,1	197	5,31	2,81	0,63	0,30	0,12	0,01	0,34
2001	Masculino	9,13	6,49	15,0	43,1	66,4	23,2	34,9	166	5,11	2,73	0,67	0,45	0,15	0,01	0,55
2001	Masculino	5,99	6,28	14,2	41,8	66,5	22,7	34,1	161	2,88	2,09	0,53	0,39	0,08	0,02	0,60
2002	Feminino	6,99	7,05	16,4	49,0	69,5	23,2	33,4	206	3,96	2,27	0,50	0,14	0,11	0,02	0,65
2002	Feminino	7,77	6,74	15,0	43,7	64,8	22,3	34,4	294	4,26	2,82	0,51	0,09	0,10	0,01	0,25
2002	Feminino	8,10	6,50	14,3	42,9	66,0	21,9	33,2	304	4,83	2,61	0,51	0,06	0,07	0,01	0,31
Grp 2	Média	8,09	6,94	16,0	47,4	68,3	23,0	33,8	201,5	4,64	2,54	0,57	0,22	0,12	0,02	0,50
Grp 2	Média	8,45	6,62	15,0	43,4	65,6	22,8	34,7	230,0	4,69	2,78	0,59	0,27	0,13	0,01	0,40

Indivíduo/ Lote de QC	Sexo / Identi- ficador de QC	WBC ^3/ul	RBC ^6/ul	HGB g/dl	HCT %	MCV fl	MCH pg	MCHC g/dl	PLT ^3/ul	NEUT ^3/ul	LYMP ^3/ul	MONO ^3/ul	EOS ^3/ul	BASO ^3/ul	LUC ^3/ul	RET% %
Grp 2	Média	7,05	6,39	14,3	42,4	66,3	22,3	33,7	232,5	3,86	2,35	0,52	0,23	0,08	0,02	0,46
3001	Masculino	8,74	6,11	13,6	40,2	65,8	22,3	33,9	310	4,36	3,29	0,44	0,57	0,07	0,02	0,61
3001	Masculino	7,25	6,35	14,2	41,0	64,6	22,3	34,5	321	3,52	2,93	0,45	0,27	0,07	0,02	0,79
3001	Masculino	12,97	6,98	15,8	48,2	69,1	22,7	32,8	255	7,28	4,35	0,83	0,38	0,11	0,02	1,02
3002	Feminino	11,50	7,17	16,2	47,3	65,9	22,6	34,3	325	6,77	3,67	0,67	0,17	0,20	0,03	0,91
3002	Feminino	9,18	6,12	14,6	43,1	70,4	23,9	34,0	247	5,29	2,86	0,79	0,12	0,10	0,02	0,94
3002	Feminino	14,08	7,36	16,7	49,8	67,6	22,7	33,5	319	9,25	3,80	0,76	0,15	0,10	0,02	0,72
Grp 3	Média	10,12	6,64	14,9	43,8	65,9	22,5	34,1	317,5	5,57	3,48	0,56	0,37	0,14	0,03	0,76
Grp 3	Média	8,22	6,24	14,4	42,1	67,5	23,1	34,3	284,0	4,41	2,90	0,62	0,20	0,09	0,02	0,87
Grp 3	Média	13,53	7,17	16,3	49,0	68,4	22,7	33,2	287,0	8,27	4,08	0,80	0,27	0,11	0,02	0,87
4001	Masculino	8,23	6,44	14,8	42,7	66,3	23,0	34,7	208	4,61	2,68	0,39	0,48	0,07	0,01	0,41
4001	Masculino	10,09	6,81	16,0	47,5	69,7	23,4	33,6	214	5,96	3,18	0,37	0,50	0,07	0,02	0,33
4001	Masculino	9,86	6,37	14,6	45,4	71,3	22,9	32,2	213	6,30	2,78	0,37	0,35	0,04	0,01	0,58
4004	Feminino	10,41	6,46	14,7	41,9	64,8	22,8	35,2	246	5,98	2,88	0,49	0,95	0,09	0,02	0,27
4004	Feminino	10,37	7,19	16,6	50,6	70,4	23,1	32,8	238	5,95	3,04	0,50	0,77	0,09	0,01	0,62
4004	Feminino	10,50	6,71	15,4	47,6	70,9	22,9	32,4	251	6,74	2,82	0,39	0,47	0,06	0,01	0,43
Grp 4	Média	9,32	6,45	14,75	42,30	65,55	22,90	34,95	227,00	5,30	2,78	0,44	0,72	0,08	0,02	0,34
Grp 4	Média	10,23	7,00	16,30	49,05	70,05	23,25	33,20	226,00	5,96	3,11	0,44	0,64	0,08	0,02	0,48
Grp 4	Média	10,18	6,54	15,00	46,50	71,10	22,90	32,30	232,00	6,52	2,80	0,38	0,41	0,05	0,01	0,51

Indivíduo/ Lote de QC	Sexo / Identi- ficador de QC	WBC ^3/ul	RBC ^6/ul	HGB g/dl	HCT %	MCV fl	MCH pg	MCHC g/dl	PLT ^3/ul	NEUT ^3/ul	LYMP ^3/ul	MONO ^3/ul	EOS ^3/ul	BASO ^3/ul	LUC ^3/ul	RET% %
4002	Feminino	10,21	5,68	13,7	39,8	70,1	24,1	34,4	257	6,73	2,46	0,73	0,18	0,09	0,01	1,07
4002	Feminino	7,45	6,61	13,8	40,7	61,6	20,9	34,0	308	4,11	2,59	0,50	0,13	0,10	0,02	0,88
4003	Masculino	6,63	6,11	12,8	37,1	60,8	21,0	34,6	313	3,60	2,32	0,45	0,19	0,04	0,02	0,51
4003	Masculino	11,18	5,92	14,3	44,2	74,7	24,2	32,4	248	7,39	2,87	0,61	0,21	0,10	0,01	0,83
Grp 4	Média	8,42	5,90	13,25	38,45	65,45	22,55	34,50	285,00	5,17	2,39	0,59	0,19	0,07	0,02	0,79
Grp 4	Média	9,32	6,27	14,05	42,45	68,15	22,55	33,20	278,00	5,75	2,73	0,56	0,17	0,10	0,02	0,86

TABELA 22: SUMÁRIO CLÍNICO

Indivíduo/ Lote de QC	Sexo / Iden- tificador de QC	Na mmol/l	K mmol/l	Cl mmol/l	GLUC mg/dl	BUN mg/dl	CREA mg/dl	P mg/dl	TBIL mg/dl	ALPK IU/L	ALT IU/L	AST IU/L	GGT IU/L	TP g/dl	ALB g/dl	CA2 mg/dl	TRIG mg/dl	CHOL mg/dl	GLOB g/dl	AGR
1001	Masculino	149	4,7	109	90	14	0,7	7,6	0,15	248	25	29	3	5,0	3,3	11,0	53	132	1,7	1,9
1001	Masculino	146	4,7	111	78	15	0,5	6,4	0,15	243	29	29	3	5,0	3,3	10,6	39	133	1,7	1,9
1001	Masculino	150	4,2	113	92	17	0,5	6,6	0,15	235	21	33	3	5,5	3,7	10,9	38	130	1,8	2,1
1002	Feminino	148	5,1	109	92	13	0,7	6,4	0,15	91	24	27	3	4,9	3,3	10,3	37	107	1,6	2,1
1002	Feminino	147	4,9	113	88	15	0,7	6,4	0,15	125	26	33	3	5,0	3,6	10,7	32	129	1,4	2,6
1002	Feminino	148	4,5	113	89	13	0,7	6,2	0,15	120	27	34	3	5,0	3,5	10,4	29	116	1,5	2,3
Grp 1	Média	149	4,9	109	91	14	0,7	7,0	0,15	170	25	28	3	5,0	3,3	10,7	45	120	1,7	2,0
Grp 1	Média	147	4,8	112	83	15	0,6	6,4	0,15	184	28	31	3	5,0	3,5	10,7	36	131	1,6	2,3

Indivíduo/ Lote QC	Sexo / Iden- tificador de QC	Na mmol/l	K mmol/l	Cl mmol/l	GLUC mg/dl	BUN mg/dl	CREA mg/dl	P mg/dl	TBIL mg/dl	ALPK IU/L	ALT IU/L	AST IU/L	GGT IU/L	TP g/dl	ALB g/dl	CA2 mg/dl	TRIG mg/dl	CHOL mg/dl	GLOB g/dl	AGR
Grp 1	Média	149	4,4	113	91	15	0,6	6,4	0,15	178	24	34	3	5,3	3,6	10,7	34	123	1,7	2,2
2001	Masculino	149	4,5	109	91	12	0,7	6,8	0,15	130	22	48	3	5,0	3,3	10,9	66	168	1,7	1,9
2001	Masculino	147	4,9	113	97	16	0,6	5,9	0,15	140	22	36	3	5,1	3,4	10,8	80	167	1,7	2,0
2001	Masculino	147	4,7	108	102	15	0,6	5,5	0,15	128	22	36	3	5,5	3,5	11,0	63	152	2,0	1,8
2002	Feminino	149	5,0	110	95	13	0,6	7,4	0,15	241	18	35	3	5,2	3,3	10,9	38	138	1,9	1,7
2002	Feminino	147	5,2	114	98	14	0,6	6,4	0,15	111	29	41	3	5,2	3,6	10,8	39	123	1,6	2,3
2002	Feminino	148	4,6	113	89	14	0,6	5,7	0,15	103	27	38	3	5,3	3,7	10,6	31	114	1,6	2,3
Grp 2	Média	149	4,8	110	93	13	0,7	7,1	0,15	186	20	42	3	5,1	3,3	10,9	52	153	1,8	1,8
Grp 2	Média	147	5,1	114	98	15	0,6	6,2	0,15	126	26	39	3	5,2	3,5	10,8	60	145	1,7	2,2
Grp 2	Média	148	4,7	111	96	15	0,6	5,6	0,15	116	25	37	3	5,4	3,6	10,8	47	133	1,8	2,1
3001	Masculino	146	4,7	111	100	13	0,6	6,5	0,15	142	26	30	3	4,8	3,2	10,7	26	100	1,6	2,0
3001	Masculino	146	5,1	110	88	17	0,7	6,8	0,15	135	24	32	3	5,1	3,4	10,5	34	111	1,7	2,0
3001	Masculino	148	5,8	109	51	33	1,0	7,2	0,15	121	22	33	3	5,0	3,4	10,0	52	111	1,6	2,1
3002	Feminino	149	5,5	112	112	11	0,6	6,6	0,15	164	28	30	3	5,0	3,5	11,2	34	126	1,5	2,3
3002	Feminino	145	5,3	109	90	12	0,5	6,5	0,15	90	20	28	3	5,5	3,5	10,8	43	175	2,0	1,8
3002	Feminino	149	5,9	110	65	25	0,9	7,5	0,15	176	20	30	3	5,1	3,7	10,4	58	141	1,4	2,6
Grp 3	Média	148	5,1	112	106	12	0,6	6,6	0,15	153	27	30	3	4,9	3,4	11,0	30	113	1,6	2,2

Indivíduo/ Lote QC	Sexo / Iden- tificador de QC	Na mmol/l	K mmol/l	Cl mmol/l	GLUC mg/dl	BUN mg/dl	CREA mg/dl	P mg/dl	TBIL mg/dl	ALPK IU/L	ALT IU/L	AST IU/L	GGT IU/L	TP g/dl	ALB g/dl	CA2 mg/dl	TRIG mg/dl	CHOL mg/dl	GLOB g/dl	AGR
Grp 3	Média	146	5,2	110	89	15	0,6	6,7	0,15	113	22	30	3	5,3	3,5	10,7	39	143	1,9	1,9
Grp 3	Média	149	5,9	110	58	29	1,0	7,4	0,15	149	21	32	3	5,1	3,6	10,2	55	126	1,5	2,4
4001	Masculino	152	4,7	120	102	11	0,7	6,5	0,15	103	27	32	3	5,2	3,6	10,8	49	153	1,6	2,3
4001	Masculino	147	4,8	116	82	12	0,7	6,6	0,15	114	27	39	3	5,3	3,4	10,6	46	147	1,9	1,8
4001	Masculino	145	4,7	113	86	11	0,6	6,0	0,15	119	28	34	3	4,9	3,2	10,4	40	111	1,7	1,9
4004	Feminino	153	4,6	119	102	13	0,6	5,9	0,15	103	28	33	3	5,1	3,4	10,8	53	125	1,7	2,0
4004	Feminino	148	5,1	115	70	13	0,6	6,3	0,15	93	25	38	3	5,2	3,3	10,8	49	124	1,9	1,7
4004	Feminino	146	4,3	114	96	13	0,6	5,6	0,15	95	24	31	3	5,0	3,3	10,6	44	112	1,7	1,9
Grp 4	Média	153	4,7	120	102	12	0,7	6,2	0,15	103	28	33	3	5,2	3,5	10,8	51	139	1,7	2,2
Grp 4	Média	148	5,0	116	76	13	0,7	6,5	0,15	104	26	39	3	5,3	3,4	10,7	48	136	1,9	1,8
Grp 4	Média	146	4,5	114	91	12	0,6	5,8	0,15	107	26	33	3	5,0	3,3	10,5	42	112	1,7	1,9
4002	Feminino	153	5,3	116	106	13	0,6	6,4	0,15	147	20	32	3	5,6	3,5	11,1	34	182	2,1	1,7
4002	Feminino	149	5,3	112	79	12	0,5	6,9	0,15	103	21	35	3	5,5	3,5	11,2	41	169	2,0	1,8
4003	Masculino	149	4,9	117	109	16	0,6	7,2	0,15	146	40	30	3	5,4	3,5	11,2	55	152	1,9	1,8
4003	Masculino	147	4,9	112	81	15	0,7	7,1	0,15	129	23	33	3	5,4	3,3	11,0	53	176	2,1	1,6

Referências

- [00572] Alexander DJ, Collins CJ, Coombs DW, Gilkison, IS, Hardy, CJ, Healey, G, Karantabias, G, Johnson, N, Karlsson, A, Kilgour, JD, e McDonald, P. Association of Inhalation Toxicologists (AIT) working party recommendation for standard delivered dose calculation and expression in non-clinical aerosol inhalation toxicology studies with pharmaceuticals. *Inhalation Toxicology*; 20(13): 1.179 a 1.189, 2008.
- [00573] National Research Council, 2011. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. National Academy Press, Washington, DC.
- [00574] Tepper, JS, Kuehl, PK, Cracknell, S, Nikula, KJ, Pei, L, e Blanchard, JD. 2016. Resumo de Simpósio: "Breath In, Breath Out, Its Easy: What You Need to Know About Developing Inhaled Drugs." *Int. J. Toxicol.* 35(4) 376 a 392.

EXEMPLO 10: INTERAÇÃO ANTIMICROBIANA DE BISEDIT COM AGENTES USADOS PARA TRATAR INFECÇÕES DE FIBROSE CÍSTICA CAUSADAS POR *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* E COMPLEXO *BURKHOLDERIA CEPACIA*

[00575] *Introdução:* A interação entre BisEDT e uma variedade de agentes usados no tratamento de pacientes com fibrose cística (CF) foi avaliada contra *P. aeruginosa* e *Burkholderia* spp. A interação antimicrobiana foi determinada medindo-se as concentrações inibidoras fracionárias (FIC) em uma tabela de ensaios.

MATERIAIS E MÉTODOS

[00576] *Artigos de teste:* BisEDT foi fornecido como um pó seco e foi armazenado à temperatura ambiente no escuro antes do teste. Os compostos de comparador foram manipulados de acordo com diretrizes do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI; 1, 2). As informações específicas nos lotes de fármaco individual e faixas de concentração testadas são mostradas na Tabela 23 abaixo:

TABELA 23: LOTES DE FÁRMACO E FAIXAS DE CONCENTRAÇÃO TESTADAS

Artigos de Teste	Fornecedor	Número de Lote	Solvente	Faixas de concentração testadas (µg/ml) (MIC)	Faixas de concentração testadas (µg/ml) (FIC)
BisEDT	Microbion	ED268-1-11-01	DMSO	64 a 0,06	16 a 0,25; 4 a 0,06
Tobramicina	Sigma	109K1184	dH2O esterilizada	256 a 0,25; 2 a 0,002	256 a 0,25
Amicacina	Sigma	058K0803	dH2O esterilizada	256 a 0,25; 2 a 0,002	256 a 0,25
Aztreonam	USP	R041F0	NaHCO3 saturado	256 a 0,25; 2 a 0,002	256 a 0,25
Meropenem	USP	J0K434	dH2O esterilizada	256 a 0,25; 2 a 0,002	64 a 0,06
Ciprofloxacina	USP	R05170	dH2O esterilizada	256 a 0,25; 2 a 0,002	256 a 0,25
Colistina	Sigma	SLBV1747	dH2O esterilizada	256 a 0,25; 2 a 0,002	256 a 0,25

[00577] Os solventes apropriados foram adicionados aos fármacos que foram preparados em 40 vezes a concentração de teste superior. Foi permitido que as soluções de estoque repousassem por aproximadamente 1 h à temperatura ambiente no escuro para autoesterilização antes de serem usadas para teste. Os estoques de fármaco nos comparadores foram congelados e armazenados a -80 °C.

[00578] *Organismos*: Os organismos de teste foram isolados clínicos anteriormente adquiridos por Micromyx ou de American Type Culture Collection (ATCC). Mediante recebimento em Micromyx, os isolados foram semeados sob condições adequadas em meio ágar apropriado para cada organismo. Os organismos foram incubados por 18 a 24 h a 35 °C. As colônias colhidas destas placas de proliferação foram ressuspensas no meio apropriado que contém um crioprotetor. As alíquotas de cada suspensão foram, então, congeladas a -80 °C. Antes do ensaio, os organismos foram semeados em ágar de soja triptica mais sangue ovino 5% (BD; Sparks, MD; nº de lote 8179506) e foram incubados conforme descrito acima.

[00579] *Meios de Teste*: O meio empregado para o ensaio foi caldo Mueller Hinton ajustado por cátion (MHB II; Becton-Dickinson, Sparks, MD; nº de lote 8096574). O meio foi preparado de acordo com diretrizes CLSI (2).

[00580] *Metodologia de Ensaio de MIC*: As placas de ensaio de MIC foram preparadas com o uso do procedimento de microdiluição de caldo de CLSI (1, 2). Manipuladores de líquidos automatizados (Multidrop 384, Biomek 2000 e Biomek FX) foram usados para conduzir diluições em série e transferências de líquidos. Todos os poços nas colunas 2 a 12 de uma placa de microdiluição de 96 poços padrão (Costar 3795) foram carregadas com 150 µl do diluente apropriado. Trezentos µl de cada fármaco de teste (em 40X) foram adicionados a cada poço na Coluna 1 das placas. Esta placa foi usada para preparar o fármaco

"placa mãe" que forneceu as diluições de fármaco em série para as "placas filhas" replicatas. O Biomek 2000 foi usado para completar as transferências em série através da Coluna 11 nas placas mãe. Os poços da Coluna 12 não continham fármaco e foram os poços de controle de proliferação de organismo.

[00581] As placas filhas foram carregadas com 185 µl por poço do CAMHB descrito com o uso do Multidrop 384. As placas filhas foram completadas no instrumento Biomek FX que transferiu 5 µl de solução de fármaco de cada poço de uma placa mãe para cada poço correspondente de cada placa filha em uma única etapa.

[00582] Um inóculo padronizado de cada organismo foi preparado por métodos de CLSI (2). As suspensões foram preparadas para se igualar a um padrão McFarland 0,5, seguido por diluição em meio de teste 1:20. Os inóculos foram dispensados em reservatórios esterilizados divididos por comprimento (Beckman Coulter), e o Biomek 2000 foi usado para inocular as placas. As placas filhas foram colocadas na superfície de trabalho Biomek 2000 em orientação invertida de modo que a inoculação tenha ocorrido de concentração de fármaco baixa a alta. O Biomek 2000 distribuiu 10 µl da suspensão diluída em cada poço resultando em uma concentração final de aproximadamente 5×10^5 CFU/ml. As placas foram empilhadas em 3 a 4, cobertas com uma tampa esterilizada na placa superior, colocadas em bolsas de plástico, e incubadas a 35 °C por aproximadamente 18 h.

[00583] As microplacas foram visualizadas do fundo com o uso de um visualizador de placa e a MIC foi lida. A MIC foi registrada como a concentração mais baixa de fármaco que inibiu proliferação visível do organismo. As placas de controle de solubilidade não inoculadas também foram observadas para evidência de preparação de fármaco.

[00584] *Procedimento de Ensaio de FIC*: Faixas de teste de FIC foram definidas com base em dados de teste de MIC de microdiluição de

caldo. As placas de ensaio de FIC foram preparadas com o uso do procedimento de microdiluição de caldo CLSI (1, 2) e manipuladores de líquido automatizados (Multidrop 384, Biomek 2000 e Biomek FX) para conduzir diluições em série e transferências líquidas.

[00585] Os poços de uma placa de microdiluição de 96 poços padrão (Costar) foram carregados com 150 µl do diluente apropriado nas colunas 2 a 12. Uma alíquota de 300 µl a 40X na concentração final mais alta a ser testada foi adicionada a cada poço na Coluna 1 da placa. O Biomek 2000 foi usado para fazer onze diluições em série de 2 vezes na placa "mãe de agente de combinação" das colunas 2 a 11.

[00586] Os poços da placa "mãe de agente de teste" foram carregados com 150 µl de diluente nas linhas B a H. A linha A desta placa foi carregada com 300 µl das soluções de estoque de agente de teste em 40X a concentração final mais alta a ser testada. As diluições de 2 vezes em série foram, então, preparadas a partir da linha B a G manualmente com o uso de uma pipeta multicanal.

[00587] As "placas filhas" foram carregadas com 180 µl de CAMHB com o uso do Multidrop 384. O Biomek FX foi usado para transferir 5 µl de solução de fármaco de cada poço da placa mãe de agente de combinação ao poço correspondente em todas as placas filhas em uma única etapa. Então, uma alíquota de 5 µl de cada poço da placa mãe de agente de teste foi transferida com o Biomek FX no poço correspondente da placa mãe. A Linha H e a Coluna 12 continham, cada uma, diluições em série de agente de combinação e o agente de teste sozinho, respectivamente, para determinação do MIC. Este procedimento foi repetido para agentes de teste e os agentes de combinação avaliados.

[00588] Um inóculo padronizado de cada organismo foi preparado por métodos de CLSI (2). As colônias foram coletadas da placa primária e uma suspensão foi preparada para se igualar ao padrão de turbi-

dez McFarland 0,5. As suspensões foram adicionalmente diluídas em 1:20. Um inóculo padronizado de 10 µl foi distribuído em cada poço com o uso do Biomek 2000 de concentração baixa a alta. Estas inoculações renderam uma concentração de célula final nas placas filhas de aproximadamente 5×10^5 CFU/ml em cada poço.

[00589] O formato de teste resultou na criação de uma tabela 8 x 12 em que cada composto foi testado sozinho (Coluna 12 e Linha H) e em combinação em razões variáveis de concentração de fármaco (consultar Figura 43).

[00590] As placas foram empilhadas em 3 a 4, cobertas com uma tampa esterilizada na placa superior, colocadas em bolsas de plástico, e incubadas a 35 °C por aproximadamente 18 h (com a exceção de isolado de *P. aeruginosa* 8798 que foi incubada por 42 h devido à proliferação insatisfatória em 18 h). As placas foram visualizadas do fundo com o uso de um visualizador de placa. Folhas de leitura preparadas foram marcadas para a MIC do agente de combinação (linha H), a MIC de agente de teste (coluna 12), e os poços da interface de proliferação-sem proliferação de poços que contêm agente de teste e agente de combinação em razões variáveis. A FIC foi lida e registrada como a concentração mais baixa de fármaco que não exibiu proliferação do organismo por linha em que os agentes foram testados em combinação (linhas B a G). Pinpoint trailing não foi interpretado como proliferação.

[00591] Cálculos de FIC/FICI: FICs foram calculadas essencialmente conforme descrito por Eliopoulos, *et al.* (3), conforme aplicável.

[00592] Para cada linha relevante do painel, o índice de FIC (FICI) foi calculado conforme abaixo:

$$FIC_{\text{fármaco A}}/MIC_{\text{fármaco A}} + FIC_{\text{fármaco B}}/MIC_{\text{fármaco B}} = \text{índice de FIC (FICI)}$$

FICI médio foi determinado para a combinação.

[00593] No caso em que uma MIC para um dos agentes de teste foi

fora de escala (superior à concentração de teste mais alta avaliada, por exemplo, >32 µg/ml), a MIC foi definida para a concentração de 2 vezes mais alta para determinação da FIC (por exemplo, se a MIC foi >32 µg/ml, a FIC foi calculada com base em uma MIC de 64 µg/ml).

[00594] Com o uso dos critérios descritos acima por Odds (4), o FI-CI médio para a combinação foi interpretado conforme o seguinte: $\leq 0,5$ = sinergia, $>0,5$ a 4 = aditivo/indiferente, e >4 = antagonismo.

[00595] Uma interpretação de "sinergia" é coerente com a inibição de proliferação de organismo por combinações em concentrações significativamente abaixo (>4 vezes) a MIC de qualquer composto sozinho, resultando em um valor de FICI baixo ($\leq 0,50$). Uma interpretação de "indiferença" é coerente com inibição de proliferação em concentrações em ou levemente abaixo/acima dos valores de MIC dos compostos individuais sozinhos, resultando em um valor de FICI de $> 0,50$, mas inferior ou igual a $4,0$. Uma interpretação de "antagonismo" é resultante quando as concentrações dos compostos em combinação que são necessários para inibir a proliferação de organismo são substancialmente maiores (>4 vezes) do que aquelas para os compostos individualmente, resultando em um valor de FICI de $> 4,0$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

[00596] Os valores de MIC de microdiluição de caldo para os agentes avaliados contra os organismos de teste conforme observado durante o teste de MIC inicial são resumidos na Tabela 24. Os valores de MIC para BisEDT e os outros agentes de teste contra *P. aeruginosa* ATCC 27853 estiveram dentro das faixas de QC de CLSI (1). BisEDT manteve a atividade através dos isolados avaliados apesar do alto grau de resistência a outros agentes. Com base nos fenótipos resultantes, os isolados sombreados em cinza foram selecionados para avaliação subsequente em tabelas de ensaio com BisEDT em combinação com outros agentes de teste.

[00597] Os valores de MIC observados durante o teste de FIC são resumidos na Tabela 25. Conforme esperado, estes resultados foram consistentes (tipicamente idênticos ou em 2 vezes) com aqueles observados durante teste de MIC inicial (Tabela 24). Os casos raros em que os valores de MIC diferiram 4 vezes com aqueles observados durante teste de MIC inicial são sombreados em cinza. Durante o teste de MIC inicial, BisEDT e os outros agentes de teste tiveram valores de MIC dentro das faixas de QC para *P. aeruginosa* ATCC 27853. O valor de MIC média de BisEDT conforme observado através de 6 painéis de tabela é relatado na Tabela 25 ao lado da faixa de MIC. Os valores de MIC observados com BisEDT foram consistentes através de painéis de tabela durante o teste de FIC, conforme esperado.

[00598] Todos os dados de teste de painéis de FIC são mostrados pelo organismo nas Tabelas 28 a 87. Os valores de FICI médios observados para BisEDT em combinação com todos os agentes avaliados através dos isolados selecionados são resumidos na Tabela 26. Os casos em que os valores de FICI individuais em painéis de tabela exibiram sinergia/antagonismo também são observados.

[00599] Excluindo colistina e ciprofloxacina, a maior parte das interações observadas entre BisEDT e outros agentes por FICI foram aditivos/indiferentes com valores de FICI médios e valores de FICI através dos painéis de tabela geralmente entre 0,5 a 4. Para um subconjunto de isolados, a sinergia entre BisEDT e colistina foi observada com base em valores de FICI médios $\leq 0,50$; para a colistina-R independente de *P. aeruginosa* (isolado 8798), para ambos os isolados de *B. cepacia*, e para um isolado de *B. cenocepacia* (isolado 0548). Para um dentre *P. aeruginosa* (isolado 9108), antagonismo entre BisEDT e ciprofloxacina foi observada com base em um valor de FICI médio >4 . Para BisEDT em combinação com ciprofloxacina, houve 3 isolados adicionais em que houve pelo menos uma linha no painel de FIC que

teve um valor de FICI indicativo de antagonismo. Houve apenas um isolado de *B. cepacia* (isolado 1793) em que houve uma fileira com um valor de FICI indicativo de antagonismo para BisEDT em combinação com meropenem.

[00600] Em resumo, a interação geral entre BisEDT e outros agentes usados para tratar CF foi aditiva/indiferente contra os patógenos de CF *P. aeruginosa* e complexo *B. cepacia* com a exceção de casos selecionados em que a sinergia foi evidente para BisEDT em combinação com colistina e casos selecionados em que o antagonismo foi evidente para BisEDT em combinação com ciprofloxacina. A possibilidade de estes casos indicarem sinergia verdadeira ou antagonismo para estas combinações necessita de investigação adicional por análise de cinética time-kill.

TABELA 24: SUMÁRIO DE ATIVIDADE CONFORME OBSERVADO DURANTE TESTE DE MIC INICIAL

Organismo	ID de Isolado	Fenótipo ¹	MIC (µg/ml)							
			BisEDT	MEM	TOB	AMK	CIP	AZT	COL	
P. aeruginosa	103 (ATCC 25922)	-	1 (0,5 a 4)2	1 (0,12 a 1)	1 (0,25 a 1)	2 (1 a 4)	0,5 (0,12 a 1)	8 (2 a 8)	0,5 (0,5 a 4)	
	1497	TOB-R, AMK-R, CIP-I, AZT-R, COL-R	0,5	0,06	16	64	2	32	4	
	1530	TOB-R, AMK-R, CIP-R	1	0,5	32	64	8	4	0,5	
	1553	TOB-R, AMK-R, CIP-R	2	0,5	>256	64	4	8	0,5	
	6322	MEM-R, TOB-R, AMK-R, CIP-R, AZT-R	2	16	128	64	64	64	0,5	
	6977	MEM-I, TOB-R, CIP-R, AZT-I	1	4	128	16	128	16	1	
	7745	MEM-R, CIP-R, AZT-R	2	16	0,5	4	4	32	0,5	
	7754	MEM-R, TOB-R, CIP-R, AZT-I	1	32	32	8	8	16	0,5	
	7762	MEM-I, CIP-I	2	4	1	8	2	8	1	
	7871	MEM-R, AZT-I	1	8	0,5	2	0,25	16	0,5	

Organismo	ID de Isolado	Fenótipo ¹	MIC (µg/ml)									
	7886	MEM-R, CIP-R, AZT-R	2	32	1	8	8	8	64	0,5		
	7874	-	1	1	0,5	2	0,12	4	4	1		
	8797	MEM-R, TOB-R, AMK-R, CIP-R, AZT-R, COL-R	0,25	32	>256	>256	8	>256	>256	>256		
	8798	MEM-R, TOB-R, AMK-R, CIP-R, AZT-R, COL-R	2	64	32	128	4	256	>256	>256		
	9108	CIP-R, AZT-I	2	0,5	0,5	4	32	16	0,5			

TABELA 25: SUMÁRIO DE ATIVIDADE CONFORME OBSERVADO DURANTE TESTE DE MIC INICIAL

Organismo	ID de Isolado	Fenótipo ¹	MIC (µg/ml)									
			BisEDT	MEM	TOB	AMK	CIP	AZT	COL			
<i>B. cepacia</i>	0546	-	2	4	64	64	2	16	>256			
	0547	-	1	2	128	128	1	16	>256			
	9040	-	1	4	8	8	1	32	>256			
	1793	-	0,5	4	64	64	0,5	128	>256			
	1794	-	2	4	64	128	1	32	>256			

Organismo	ID de Isolado	Fenótipo ¹	MIC (µg/ml)							
			BisEDT	MEM	TOB	AMK	CIP	AZT	COL	
<i>B. cenocepacia</i>	0548	CIP-R	8	4	64	256	8	64	>256	
	0813	CPI-I	2	2	256	>256	4	8	>256	
	1631	-	2	4	128	256	2	32	>256	
	1783	-	2	4	128	256	2	32	>256	
	8555	-	2	4	128	256	2	256	>256	
<i>B. multivorans</i>	1580	CIP-R	2	2	128	128	8	64	>256	
	1791	-	1	4	64	128	1	4	>256	
	1795	MEM-I, CIP-R	2	8	>256	>256	32	4	>256	
	5665	CIP-I	1	2	64	256	4	4	>256	
	8952	CIP-I	4	2	16	64	4	8	>256	

MEM = meropenem, TOB = tobramicina, AMK = amikacina, CIP = ciprofloxacina, AZT = aztreonam, COL = colistina, - R = resistente, -I = intermediário

¹ O fenótipo tem base na interpretação de MIC de acordo com pontos de interrupção de CLSI (1) ou no caso de colistina e pontos de interrupção *P. aeruginosa* EUCAST (v.8.1)

Deve ser observado que o complexo *B. cepacia* é intrinsecamente resistente a aminoglicosídeos, aztreonam e

colistina (1)

² Faixa de QC de CLSI mostrada em parênteses quando aplicável

[00601] As células sombreadas em cinza foram selecionadas para teste de FIC

TABELA 26. SUMÁRIO DE ATIVIDADE CONFORME OBSERVADO DURANTE TESTE DE FIC

Organismo	ID de Isolado	Fenótipo ¹	MIC (µg/ml)						
			BisEDT ³	MEM	TOB	AMK	CIP	AZT	COL
<i>P. aeruginosa</i>	103 (ATCC 25922) ²	-	1 (0,5 a 4)	1 (0,12 a 1)	1 (0,25 a 1)	4 (1 a 4)	1 (0,12 a 1)	8 (2 a 8)	0,5 (0,5 a 4)
	6322	MEM-R, TOB-R, AMK-R, CIP-R, AZT-R	1 a 2 (2)	16	128	64	128	32	0,5
	6977	MEM-I, TOB-R, CIP-R, AZT-I	1 (1)	8	128	16	128	64	1
	7745	MEM-R, CIP-R, AZT-R	1 a 2 (2)	16	0,5	4	2	16	0,5
	8798	MEM-R, TOB-R, AMK-R, CIP-R, AZT-R, COL-R	2 (2)	32	16	128	8	>256	>256
	9108	CIP-R, AZT-I	2 a 4 (2)	1	0,5	4	16	16	0,5
<i>B. cepacia</i>	0546	-	2 a 4 (2, 4)	4	32	64	2	32	>256
	1793	-	1 a 1 (2)	4	16	32	0,5	128	>256
<i>B. cenocepacia</i>	0548	CIP-R	4 (4)	4	32	128	2	64	>256
	0813	CIP-I	2 a 4 (2, 4)	2	256	>256	2	32	>256
<i>B. multivorans</i>	1795	MEM-I, CIP-R	2 (2)	4	>256	>256	32	16	>256

MEM = meropenem, TOB = tobramicina, AMK = ampicilina, CIP = ciprofloxacina, AZT = aztreonam, COL = colistina, -

R = resistente, -I = intermediário

¹ Fenótipo determinado com base em teste de MIC inicial conforme mostrado na Tabela 1

Observar que o complexo *B. cepacia* é intrinsecamente resistente to aminoglicosídeos, aztreonam, e colistina (1)

² Faixa de QC de CLSI mostrada em parênteses para ATCC 25922; ATCC 25922 não foi testado em painéis de tabela com agentes em combinação, cada agente foi testado sozinho somente com o propósito de QC

³ Com a exceção de ATCC 25922 em que apenas uma replicata foi testada com o propósito de controle de qualidade (faixa de QC mostrada em parênteses), o resultado de MIC para BisEDT representa a faixa de MIC e modo conforme observado através de seis painéis de FIC diferentes.

TABELA 27. SUMÁRIO DE DADOS DE FICI MÉDIOS PARA BISED T EM COMBINAÇÃO COM AGENTES AVALIADOS

ID de Isolado	Fenótipo ¹	FICI médio					
		MEM	TOB	AMK	CIP	AZT	COL
6322	MEM-R, TOB-R, AMK-R, CIP-R, AZT-R	1,19	1,19	2,23	1,19	1,19	1,23
6977	MEM-I, TOB-R, CIP-R, AZT-1	1,73	2,23	2,23	2,23	1,23	1,23
7745	MEM-R, CIP-R, AZT-R	0,64	1,19	1,23	2,59*	0,99	1,19
8798	MEM-R, TOB-R, AMK-R, CIP-R, AZT-R, COL-R	1,19	0,91	1,09	0,99	0,89	0,22
9108	CIP-R, AZT-I	1,19	1,19	1,29	4,50	0,79	1,08
0546	-	1,99	0,69	0,64	1,35	1,16	0,25

ID de Isolado	Fenótipo ¹	FICI médio							
1793	-	2,59*	1,11	1,29	1,98	1,23	0,33		
0548	CIP-R	1,11	0,67	0,67	3,23*	1,23	0,41		
0813	CIP-I	1,08	0,91	0,99	2,85*	1,19	0,72		
1795	MEM-I, CIP-R	1,33	1,33	1,33	1,19	1,39	1,33		

MEM = meropenem, TOB = tobramicina, AMK = amikacina, CIP = ciprofloxacina, AZT = aztreonam, COL = colistina, - R = resistente, -I = intermediário

¹ Fenótipo determinado com base em teste de MIC inicial conforme mostrado na Tabela 1

** indica que pelo menos uma linha no painel de teste teve um valor de FICI individual $\leq 0,5$ (indicativo de sinergia)

* indica que pelo menos uma linha do painel de teste teve um valor de FICI individual > 4 (indicativo de antagonismo)

TABELA 28. MIC ($\mu\text{G/ML}$), FIC, FICI, PARA BISEDT EM COMBINAÇÃO COM MEROPENEM

Organismo: <i>P. aeruginosa</i>	6322			FICI (N):		5
Fármaco A: BisEDT	MIC de Fármaco A:		2	SOMA DE FICI:		5,97
Fármaco B: Meropenem	MIC de Fármaco B:		16	FICI MÉDIO:		1,19
Linha	MIC _A	FIC _A	MIC _B	FIC _B	FICI	
A						
B						
C	1	0,5	16	1	1,5	
D	0,5	0,25	16	1	1,25	
E	0,25	0,125	16	1	1,125	
F	0,12	0,06	16	1	1,06	
G	0,06	0,03	16	1	1,03	
H						

TABELA 29. MIC ($\mu\text{G/ML}$), FIC, FICI, PARA BISEDT EM COMBINAÇÃO COM TOBRAMICINA

Organismo: <i>P. aeruginosa</i>	6322			FICI (N):		5
Fármaco A: BisEDT	MIC de Fármaco A:		2	SOMA DE FICI:		5,97
Fármaco B: Tobramicina	MIC de Fármaco B:		128	FICI MÉDIO:		1,19
Linha	MIC _A	FIC _A	MIC _B	FIC _B	FICI	
A						
B						
C	1	0,5	128	1	1,5	
D	0,5	0,25	128	1	1,25	
E	0,25	0,125	128	1	1,125	
F	0,12	0,06	128	1	1,06	
G	0,06	0,03	128	1	1,03	
H						

TABELA 30. MIC ($\mu\text{G/ML}$), FIC, FICI, PARA BISEDT EM COMBINAÇÃO COM AMICACINA

Organismo: <i>P. aeruginosa</i>	6322			FICI (N):		4
Fármaco A: BisEDT	MIC de Fármaco A:		1	SOMA DE FICI:		8,93
Fármaco B: Amicacina	MIC de Fármaco B:		64	FICI MÉDIO:		2,23
Linha	MIC _A	FIC _A	MIC _B	FIC _B	FICI	
A						
B						
C						
D	0,5	0,5	128	2	2,5	
E	0,25	0,25	128	2	2,25	
F	0,12	0,12	128	2	2,12	
G	0,06	0,06	128	2	2,06	
H						

TABELA 31. MIC ($\mu\text{G/ML}$), FIC, FICI, PARA BISEDT EM COMBINAÇÃO COM CIPROFLOXACINA

Organismo: <i>P. aeruginosa</i>	6322			FICI (N):		5
Fármaco A: BisEDT	MIC de Fármaco A:		2	SOMA DE FICI:		5,97
Fármaco B: Ciprofloxacina	MIC de Fármaco B:		128	FICI MÉDIO:		1,19
Linha	MIC _A	FIC _A	MIC _B	FIC _B	FICI	
A						
B						
C	1	0,5	128	1	1,5	
D	0,5	0,25	128	1	1,25	
E	0,25	0,125	128	1	1,125	
F	0,12	0,06	128	1	1,06	
G	0,06	0,03	128	1	1,03	
H						

TABELA 32. MIC ($\mu\text{G/ML}$), FIC, FICI, PARA BISEDT EM COMBINAÇÃO COM AZTREONAM

Organismo: <i>P. aeruginosa</i>	6322			FICI (N):		5
Fármaco A: BisEDT	MIC de Fármaco A:		2	SOMA DE FICI:		5,97
Fármaco B: Aztreonam	MIC de Fármaco B:		32	FICI MÉDIO:		1,19
Linha	MIC _A	FIC _A	MIC _B	FIC _B	FICI	
A						
B						
C	1	0,5	16	0,5	1	
D	0,5	0,25	16	0,5	0,75	
E	0,25	0,125	32	1	1,125	
F	0,12	0,06	32	1	1,06	
G	0,06	0,03	64	2	2,03	
H						

TABELA 33. MIC ($\mu\text{G/ML}$), FIC, FICI, PARA BISEDT EM COMBINAÇÃO COM COLISTINA

Organismo: <i>P. aeruginosa</i>	6322			FICI (N):		4
Fármaco A: BisEDT	MIC de Fármaco A:		1	SOMA DE FICI:		4,93
Fármaco B: Colistina	MIC de Fármaco B:		0,5	FICI MÉDIO:		1,23
Linha	MIC _A	FIC _A	MIC _B	FIC _B	FICI	
A						
B						
C						
D	0,5	0,5	0,5	1	1,5	
E	0,25	0,25	0,5	1	1,25	
F	0,12	0,12	0,5	1	1,12	
G	0,06	0,06	0,5	1	1,06	
H						

TABELA 34. MIC ($\mu\text{G/ML}$), FIC, FICI, PARA BISEDT EM COMBINAÇÃO COM MEROPENEM

Organismo: <i>P. aeruginosa</i>	6977			FICI (N):		4
Fármaco A: BisEDT	MIC de Fármaco A:		1	SOMA DE FICI:		6,93
Fármaco B: Meropenem	MIC de Fármaco B:		8	FICI MÉDIO:		1,73
Linha	MIC _A	FIC _A	MIC _B	FIC _B	FICI	
A						
B						
C						
D	0,5	0,5	16	2	2,5	
E	0,25	0,25	16	2	2,25	
F	0,12	0,12	8	1	1,12	
G	0,06	0,06	8	1	1,06	
H						

TABELA 35. MIC ($\mu\text{G/ML}$), FIC, FICI, PARA BISEDT EM COMBINAÇÃO COM TOBRAMICINA

Organismo: <i>P. aeruginosa</i>	6977			FICI (N):		4
Fármaco A: BisEDT	MIC de Fármaco A:		1	SOMA DE FICI:		8,93
Fármaco B: Tobramicina	MIC de Fármaco B:		128	FICI MÉDIO:		2,23
Linha	MIC _A	FIC _A	MIC _B	FIC _B	FICI	
A						
B						
C						
D	0,5	0,5	256	2	2,5	
E	0,25	0,25	256	2	2,25	
F	0,12	0,12	256	2	2,12	
G	0,06	0,06	256	2	2,06	
H						

TABELA 36. MIC ($\mu\text{G/ML}$), FIC, FICI, PARA BISEDT EM COMBINAÇÃO COM AMICACINA

Organismo: <i>P. aeruginosa</i>	6977			FICI (N):		4
Fármaco A: BisEDT	MIC de Fármaco A:		1	SOMA DE FICI:		8,93
Fármaco B: Amicacina	MIC de Fármaco B:		16	FICI MÉDIO:		2,23
Linha	MIC _A	FIC _A	MIC _B	FIC _B	FICI	
A						
B						
C						
D	0,5	0,5	32	2	2,5	
E	0,25	0,25	32	2	2,25	
F	0,12	0,12	32	2	2,12	
G	0,06	0,06	32	2	2,06	
H						

TABELA 37. MIC ($\mu\text{G/ML}$), FIC, FICI, PARA BISEDT EM COMBINAÇÃO COM CIPROFLOXACINA

Organismo: <i>P. aeruginosa</i>	6977			FICI (N):		4
Fármaco A: BisEDT	MIC de Fármaco A:		1	SOMA DE FICI:		8,93
Fármaco B: Ciprofloxacina	MIC de Fármaco B:		128	FICI MÉDIO:		2,23
Linha	MIC _A	FIC _A	MIC _B	FIC _B	FICI	
A						
B						
C						
D	0,5	0,5	256	2	2,5	
E	0,25	0,25	256	2	2,25	
F	0,12	0,12	256	2	2,12	
G	0,06	0,06	256	2	2,06	
H						

TABELA 38. MIC ($\mu\text{G/ML}$), FIC, FICI, PARA BISEDT EM COMBINAÇÃO COM AZTREONAM

Organismo: <i>P. aeruginosa</i>	6977			FICI (N):	4
Fármaco A: BisEDT	MIC de Fármaco A:		1	SOMA DE FICI:	4,93
Fármaco B: Aztreonam	MIC de Fármaco B:		64	FICI MÉDIO:	1,23
Linha	MIC _A	FIC _A	MIC _B	FIC _B	FICI
A					
B					
C					
D	0,5	0,5	64	1	1,5
E	0,25	0,25	64	1	1,25
F	0,12	0,12	64	1	1,12
G	0,06	0,06	64	1	1,06
H					

TABELA 39. MIC ($\mu\text{G/ML}$), FIC, FICI, PARA BISEDT EM COMBINAÇÃO COM COLISTINA

Organismo: <i>P. aeruginosa</i>	6977			FICI (N):	4
Fármaco A: BisEDT	MIC de Fármaco A:		1	SOMA DE FICI:	4,93
Fármaco B: Colistina	MIC de Fármaco B:		1	FICI MÉDIO:	1,23
Linha	MIC _A	FIC _A	MIC _B	FIC _B	FICI
A					
B					
C					
D	0,5	0,5	1	1	1,5
E	0,25	0,25	1	1	1,25
F	0,12	0,12	1	1	1,12
G	0,06	0,06	1	1	1,06
H					

TABELA 40. MIC ($\mu\text{G/ML}$), FIC, FICI, PARA BISEDT EM COMBINAÇÃO COM MEROPENEM

Organismo: <i>P. aeruginosa</i>	7745			FICI (N):		5
Fármaco A: BisEDT	MIC de Fármaco A:		2	SOMA DE FICI:		3,22
Fármaco B: Meropenem	MIC de Fármaco B:		16	FICI MÉDIO:		0,64
Linha	MIC _A	FIC _A	MIC _B	FIC _B	FICI	
A						
B						
C	1	0,5	4	0,25	0,75	
D	0,5	0,25	8	0,5	0,75	
E	0,25	0,125	8	0,5	0,625	
F	0,12	0,06	8	0,5	0,56	
G	0,06	0,03	8	0,5	0,53	
H						

TABELA 41. MIC ($\mu\text{G/ML}$), FIC, FICI, PARA BISEDT EM COMBINAÇÃO COM TOBRAMICINA

Organismo: <i>P. aeruginosa</i>	7745			FICI (N):		5
Fármaco A: BisEDT	MIC de Fármaco A:		2	SOMA DE FICI:		5,97
Fármaco B: Tobramicina	MIC de Fármaco B:		0,5	FICI MÉDIO:		1,19
Linha	MIC _A	FIC _A	MIC _B	FIC _B	FICI	
A						
B						
C	1	0,5	0,5	1	1,5	
D	0,5	0,25	0,5	1	1,25	
E	0,25	0,125	0,5	1	1,125	
F	0,12	0,06	0,5	1	1,06	
G	0,06	0,03	0,5	1	1,03	
H						

TABELA 42. MIC ($\mu\text{G/ML}$), FIC, FICI, PARA BISEDT EM COMBINAÇÃO COM AMICACINA

Organismo: <i>P. aeruginosa</i>	7745			FICI (N):		4
Fármaco A: BisEDT	MIC de Fármaco A:		1	SOMA DE FICI:		4,93
Fármaco B: Amicacina	MIC de Fármaco B:		4	FICI MÉDIO:		1,23
Linha	MIC _A	FIC _A	MIC _B	FIC _B	FICI	
A						
B						
C						
D	0,5	0,5	4	1	1,5	
E	0,25	0,25	4	1	1,25	
F	0,12	0,12	4	1	1,12	
G	0,06	0,06	4	1	1,06	
H						

TABELA 43. MIC ($\mu\text{G/ML}$), FIC, FICI, PARA BISEDT EM COMBINAÇÃO COM CIPROFLOXACINA

Organismo: <i>P. aeruginosa</i>	7745			FICI (N):		5
Fármaco A: BisEDT	MIC de Fármaco A:		2	SOMA DE FICI:		12,97
Fármaco B: Ciprofloxacina	MIC de Fármaco B:		2	FICI MÉDIO:		2,59
Linha	MIC _A	FIC _A	MIC _B	FIC _B	FICI	
A						
B						
C	1	0,5	4	2	2,5	
D	0,5	0,25	8	4	4,25	
E	0,25	0,125	4	2	2,125	
F	0,12	0,06	4	2	2,06	
G	0,06	0,03	4	2	2,03	
H						

TABELA 44. MIC (μ G/ML), FIC, FICI, PARA BISEDT EM COMBINAÇÃO COM AZTREONAM

Organismo: <i>P. aeruginosa</i>	7745			FICI (N):		5
Fármaco A: BisEDT	MIC de Fármaco A:		2	SOMA DE FICI:		4,97
Fármaco B: Aztreonam	MIC de Fármaco B:		16	FICI MÉDIO:		0,99
Linha	MIC_A	FIC_A	MIC_B	FIC_B	FICI	
A						
B						
C	1	0,5	8	0,5	1	
D	0,5	0,25	8	0,5	0,75	
E	0,25	0,125	16	1	1,125	
F	0,12	0,06	16	1	1,06	
G	0,06	0,03	16	1	1,03	
H						

TABELA 45. MIC (μ G/ML), FIC, FICI, PARA BISEDT EM COMBINAÇÃO COM COLISTINA

Organismo: <i>P. aeruginosa</i>	7745			FICI (N):		5
Fármaco A: BisEDT	MIC de Fármaco A:		2	SOMA DE FICI:		5,97
Fármaco B: Colistina	MIC de Fármaco B:		0,5	FICI MÉDIO:		1,19
Linha	MICA	FICA	MICB	FICB	FICI	
A						
B						
C	1	0,5	0,5	1	1,5	
D	0,5	0,25	0,5	1	1,25	
E	0,25	0,125	0,5	1	1,125	
F	0,12	0,06	0,5	1	1,06	
G	0,06	0,03	0,5	1	1,03	
H						

TABELA 46. MIC (μ G/ML), FIC, FICI, PARA BISEDT EM COMBINAÇÃO COM MEROPENEM

Organismo: P. aeruginosa	8798			FICI (N):		5
Fármaco A: BisEDT	MIC de Fármaco A:		2	SOMA DE FICI:		5,97
Fármaco B: Meropenem	MIC de Fármaco B:		32	FICI MÉDIO:		1,19
Linha	MICA	FICA	MICB	FICB	FICI	
A						
B						
C	1	0,5	32	1	1,5	
D	0,5	0,25	32	1	1,25	
E	0,25	0,125	32	1	1,125	
F	0,12	0,06	32	1	1,06	
G	0,06	0,03	32	1	1,03	
H						

TABELA 47. MIC (μ G/L), FIC, FICI, PARA BISEDT EM COMBINAÇÃO COM TOBRAMICINA

Organismo: P. aeruginosa	8798			FICI (N):		6
Fármaco A: BisEDT	MIC de Fármaco A:		2	SOMA DE FICI:		5,47
Fármaco B: Tobramicina	MIC de Fármaco B:		16	FICI MÉDIO:		0,91
Linha	MICA	FICA	MICB	FICB	FICI	
A						
B						
C	1	0,5	8	0,5	1	
D	0,5	0,25	16	1	1,25	
E	0,25	0,125	16	1	1,125	
F	0,12	0,06	16	1	1,06	
G	0,06	0,03	16	1	1,03	
H						

TABELA 48. MIC ($\mu\text{G/ML}$), FIC, FICI, PARA BISEDT EM COMBINAÇÃO COM AMICACINA

Organismo: P. aeruginosa	8798			FICI (N):		5
Fármaco A: BisEDT	MIC de Fármaco A:		2	SOMA DE FICI:		5,47
Fármaco B: Amicacina	MIC de Fármaco B:		128	FICI MÉDIO:		1,09
Linha	MICA	FICA	MICB	FICB	FICI	
A						
B						
C	1	0,5	64	0,5	1	
D	0,5	0,25	128	1	1,25	
E	0,25	0,125	128	1	1,125	
F	0,12	0,06	128	1	1,06	
G	0,06	0,03	128	1	1,03	
H						

TABELA 49. MIC ($\mu\text{G/ML}$), FIC, FICI, PARA BISEDT EM COMBINAÇÃO COM CIPROFLOXACINA

Organismo: P. aeruginosa	8798			FICI (N):		5
Fármaco A: BisEDT	MIC de Fármaco A:		2	SOMA DE FICI:		4,97
Fármaco B: Ciprofloxacina	MIC de Fármaco B:		8	FICI MÉDIO:		0,99
Linha	MICA	FICA	MICB	FICB	FICI	
A						
B						
C	1	0,5	4	0,5	1	
D	0,5	0,25	4	0,5	0,75	
E	0,25	0,125	8	1	1,125	
F	0,12	0,06	8	1	1,06	
G	0,06	0,03	8	1	1,03	
H						

TABELA 50. MIC ($\mu\text{G/ML}$), FIC, FICI, PARA BISEDT EM COMBINAÇÃO COM AZTREONAM

Organismo: P. aeruginosa	8798			FICI (N):		5
Fármaco A: BisEDT	MIC de Fármaco A:		2	SOMA DE FICI:		4,47
Fármaco B: Aztreonam	MIC de Fármaco B:		>256	FICI MÉDIO:		0,89
Linha	MICA	FICA	MICB	FICB	FICI	
A						
B						
C	1	0,5	256	0,5	1	
D	0,5	0,25	256	0,5	0,75	
E	0,25	0,125	256	0,5	1,625	
F	0,12	0,06	>256	1	1,06	
G	0,06	0,03	>256	1	1,03	
H						

TABELA 51. MIC ($\mu\text{G/ML}$), FIC, FICI, PARA BISEDT EM COMBINAÇÃO COM COLISTINA

Organismo: P. aeruginosa	8798			FICI (N):		5
Fármaco A: BisEDT	MIC de Fármaco A:		2	SOMA DE FICI:		1,12
Fármaco B: Colistina	MIC de Fármaco B:		>256	FICI MÉDIO:		0,22
Linha	MICA	FICA	MICB	FICB	FICI	
A						
B						
C	1	0,5	8	0,016	0,516	
D	0,5	0,25	8	0,016	0,266	
E	0,25	0,125	16	0,031	0,156	
F	0,12	0,06	16	0,031	0,091	
G	0,06	0,03	32	0,063	0,093	
H						

TABELA 52. MIC (μ G/ML), FIC, FICI, PARA BISEDT EM COMBINAÇÃO COM MEROPENEM

Organismo:	P. aeruginosa 9108			FICI (N):	5
Fármaco A:	BisEDT	MIC de Fármaco A:	1	SOMA DE FICI:	5,97
Fármaco B:	Meropenem	MIC de Fármaco B:	1	FICI MÉDIO:	1,19
Linha	MICA	FICA	MICB	FICB	FICI
A					
B					
C	1	0,5	1	1	1,5
D	0,5	0,25	1	1	1,25
E	0,25	0,125	1	1	1,125
F	0,12	0,06	1	1	1,06
G	0,06	0,03	1	1	1,03
H					

TABELA 53. MIC (μ G/ML), FIC, FICI, PARA BISEDT EM COMBINAÇÃO COM TOBRAMICINA

Organismo:	P. aeruginosa 9108			FICI (N):	5
Fármaco A:	BisEDT	MIC de Fármaco A:	2	SOMA DE FICI:	5,97
Fármaco B:	Tobramicina	MIC de Fármaco B:	0,5	FICI MÉDIO:	1,19
Linha	MICA	FICA	MICB	FICB	FICI
A					
B					
C	1	0,5	0,5	1	1,5
D	0,5	0,25	0,5	1	1,25
E	0,25	0,125	0,5	1	1,125
F	0,12	0,06	0,5	1	1,06
G	0,06	0,03	0,5	1	1,03
H					

TABELA 54. MIC ($\mu\text{G/ML}$), FIC, FICI, PARA BISEDT EM COMBINAÇÃO COM AMICACINA

Organismo:	P. aeruginosa 9108			FICI (N):	5
Fármaco A:	BisEDT	MIC de Fármaco A:	2	SOMA DE FICI:	4,47
Fármaco B:	Amicacina	MIC de Fármaco B:	4	FICI MÉDIO:	1,29
Linha	MICA	FICA	MICB	FICB	FICI
A					
B					
C	1	0,5	2	0,5	1
D	0,5	0,25	8	2	2,25
E	0,25	0,125	4	1	1,125
F	0,12	0,06	4	1	1,06
G	0,06	0,03	4	1	1,03
H					

TABELA 55. MIC ($\mu\text{G/ML}$), FIC, FICI, PARA BISEDT EM COMBINAÇÃO COM CIPROFLOXACINA

Organismo:	P. aeruginosa 9108			FICI (N):	6
Fármaco A:	BisEDT	MIC de Fármaco A:	4	SOMA DE FICI:	27,00
Fármaco B:	Ciprofloxacina	MIC de Fármaco B:	16	FICI MÉDIO:	4,50
Linha	MICA	FICA	MICB	FICB	FICI
A					
B	2	0,5	0,25	0,01563	0,51563
C	1	0,25	128	8	8,25
D	0,5	0,125	128	8	8,125
E	0,25	0,063	64	4	4,063
F	0,12	0,03	64	4	4,03
G	0,06	0,015	32	2	2,015
H					

TABELA 56. MIC (μ G/ML), FIC, FICI, PARA BISEDT EM COMBINAÇÃO COM AZTREONAM

Organismo:	P. aeruginosa 9108			FICI (N):		5
Fármaco A:	BisEDT	MIC de Fármaco A:	2	SOMA DE FICI:		3,97
Fármaco B:	Aztreonam	MIC de Fármaco B:	16	FICI MÉDIO:		0,79
Linha	MICA	FICA	MICB	FICB	FICI	
A						
B						
C	1	0,5	8	0,5	1	
D	0,5	0,25	8	0,5	0,75	
E	0,25	0,125	8	0,5	0,625	
F	0,12	0,06	8	0,5	0,56	
G	0,06	0,03	16	1	1,03	
H						

TABELA 57. MIC (μ G/ML), FIC, FICI, PARA BISEDT EM COMBINAÇÃO COM COLISTINA

Organismo:	P. aeruginosa 9108			FICI (N):		6
Fármaco A:	BisEDT	MIC de Fármaco A:	4	SOMA DE FICI:		6,48
Fármaco B:	Colistina	MIC de Fármaco B:	0,5	FICI MÉDIO:		1,08
Linha	MICA	FICA	MICB	FICB	FICI	
A						
B	2	0,5	0,25	0,5	1	
C	1	0,25	0,5	1	1,25	
D	0,5	0,125	0,5	1	1,125	
E	0,25	0,0625	0,5	1	1,0625	
F	0,12	0,03	0,5	1	1,03	
G	0,06	0,015	0,5	1	1,015	
H						

TABELA 58. MIC (μ G/ML), FIC, FICI, PARA BISEDT EM COMBINAÇÃO COM MEROPENEM

Organismo:	B. cepacia 546			FICI (N):		5
Fármaco A:	BisEDT	MIC de Fármaco A:	2	SOMA DE FICI:		9,97
Fármaco B:	Meropenem	MIC de Fármaco B:	4	FICI MÉDIO:		1,99
Linha	MICA	FICA	MICB	FICB	FICI	
A						
B						
C	1	0,5	4	1	1,5	
D	0,5	0,25	8	2	2,25	
E	0,25	0,125	8	2	2,125	
F	0,12	0,06	8	2	2,06	
G	0,06	0,03	8	2	2,03	
H						

TABELA 59. MIC (μ G/ML), FIC, FICI, PARA BISEDT EM COMBINAÇÃO COM TOBRAMICINA

Organismo:	B. cepacia 546			FICI (N):		5
Fármaco A:	BisEDT	MIC de Fármaco A:	2	SOMA DE FICI:		3,47
Fármaco B:	Tobramicina	MIC de Fármaco B:	32	FICI MÉDIO:		0,69
Linha	MICA	FICA	MICB	FICB	FICI	
A						
B						
C	1	0,5	16	0,5	1	
D	0,5	0,25	16	0,5	0,75	
E	0,25	0,125	16	0,5	0,625	
F	0,12	0,06	16	0,5	0,56	
G	0,06	0,03	16	0,5	0,53	
H						

TABELA 60. MIC (µG/ML), FIC, FICI, PARA BISEDT EM COMBINAÇÃO COM AMICACINA

Organismo:	B. cepacia 546			FICI (N):	5
Fármaco A:	BisEDT	MIC de Fármaco A:	2	SOMA DE FICI:	3,22
Fármaco B:	Amicacina	MIC de Fármaco B:	64	FICI MÉDIO:	0,64
Linha	MICA	FICA	MICB	FICB	FICI
A					
B					
C	1	0,5	16	0,25	0,75
D	0,5	0,25	32	0,5	0,75
E	0,25	0,125	32	0,5	0,625
F	0,12	0,06	32	0,5	0,56
G	0,06	0,03	32	0,5	0,53
H					

TABELA 61. MIC (µG/ML), FIC, FICI, PARA BISEDT EM COMBINAÇÃO COM CIPROFLOXACINA

Organismo:	B. cepacia 546			FICI (N):	6
Fármaco A:	BisEDT	MIC de Fármaco A:	4	SOMA DE FICI:	8,11
Fármaco B:	Ciprofloxacina	MIC de Fármaco B:	2	FICI MÉDIO:	1,35
Linha	MICA	FICA	MICB	FICB	FICI
A					
B	2	0,5	0,25	0,125	0,625
C	1	0,25	4	2	2,25
D	0,5	0,125	4	2	2,125
E	0,25	0,063	2	1	1,063
F	0,12	0,03	2	1	1,03
G	0,06	0,015	2	1	1,015
H					

TABELA 62. MIC (μ G/ML), FIC, FICI, PARA BISEDT EM COMBINAÇÃO COM AZTREONAM

Organismo:	B. cepacia 546			FICI (N):	6
Fármaco A:	BisEDT	MIC de Fármaco A:	4	SOMA DE FICI:	6,98
Fármaco B:	Aztreonam	MIC de Fármaco B:	32	FICI MÉDIO:	1,16
Linha	MICA	FICA	MICB	FICB	FICI
A					
B	2	0,5	32	1	1,5
C	1	0,25	32	1	1,25
D	0,5	0,125	32	1	1,125
E	0,25	0,063	32	1	1,063
F	0,12	0,03	32	1	1,03
G	0,06	0,015	32	1	1,015
H					

TABELA 63. MIC (μ G/ML), FIC, FICI, PARA BISEDT EM COMBINAÇÃO COM COLISTINA

Organismo:	B. cepacia 546			FICI (N):	6
Fármaco A:	BisEDT	MIC de Fármaco A:	4	SOMA DE FICI:	1,44
Fármaco B:	Colistina	MIC de Fármaco B:	>256	FICI MÉDIO:	0,24
Linha	MICA	FICA	MICB	FICB	FICI
A					
B	2	0,5	0,25	0,0005	0,500
C	1	0,25	8	0,016	0,266
D	0,5	0,125	32	0,063	0,188
E	0,25	0,063	64	0,125	0,188
F	0,12	0,03	64	0,125	0,155
G	0,06	0,015	64	0,125	0,14
H					

TABELA 64. MIC ($\mu\text{G/ML}$), FIC, FICI, PARA BISEDT EM COMBINAÇÃO COM MEROPENEM

Organismo:	B. cepacia 1793			FICI (N):	5
Fármaco A:	BisEDT	MIC de Fármaco A:	2	SOMA DE FICI:	12,97
Fármaco B:	Meropenem	MIC de Fármaco B:	4	FICI MÉDIO:	2,59
Linha	MICA	FICA	MICB	FICB	FICI
A					
B					
C	1	0,5	8	2	2,5
D	0,5	0,25	8	2	2,25
E	0,25	0,125	16	4	4,125
F	0,12	0,06	8	2	2,06
G	0,06	0,03	8	2	2,03
H					

TABELA 65. MIC ($\mu\text{G/ML}$), FIC, FICI, PARA BISEDT EM COMBINAÇÃO COM TOBRAMICINA

Organismo:	B. cepacia 1793			FICI (N):	4
Fármaco A:	BisEDT	MIC de Fármaco A:	1	SOMA DE FICI:	4,43
Fármaco B:	Tobramicina	MIC de Fármaco B:	16	FICI MÉDIO:	1,11
Linha	MICA	FICA	MICB	FICB	FICI
A					
B					
C					
D	0,5	0,5	8	0,5	1
E	0,25	0,25	16	1	1,25
F	0,12	0,12	16	1	1,12
G	0,06	0,06	16	1	1,06
H					

TABELA 66. MIC ($\mu\text{G/ML}$), FIC, FICI, PARA BISEDT EM COMBINAÇÃO COM AMICACINA

Organismo:	B. cepacia 1793			FICI (N):	5	
Fármaco A:	BisEDT	MIC de Fármaco A:	1	SOMA DE FICI:	6,43	
Fármaco B:	Amicacina	MIC de Fármaco B:	32	FICI MÉDIO:	1,29	
Linha	MICA	FICA	MICB	FICB	FICI	
A						
B						
C	1	1	16	0,5	1,5	
D	0,5	0,5	32	1	1,5	
E	0,25	0,25	32	1	1,25	
F	0,12	0,12	32	1	1,12	
G	0,06	0,06	32	1	1,06	
H						

TABELA 67. MIC ($\mu\text{G/ML}$), FIC, FICI, PARA BISEDT EM COMBINAÇÃO COM CIPROFLOXACINA

Organismo:	B. cepacia 1793			FICI (N):	4	
Fármaco A:	BisEDT	MIC de Fármaco A:	1	SOMA DE FICI:	7,93	
Fármaco B:	Cipro-floxacina	MIC de Fármaco B:	0,5	FICI MÉDIO:	1,98	
Linha	MICA	FICA	MICB	FICB	FICI	
A						
B						
C						
D	0,5	0,5	1	2	2,5	
E	0,25	0,25	1	2	2,25	
F	0,12	0,12	1	2	2,12	
G	0,06	0,06	0,5	1	1,06	
H						

TABELA 68. MIC (μ G/ML), FIC, FICI, PARA BISEDT EM COMBINAÇÃO COM AZTREONAM

Organismo:	B. cepacia 1793			FICI (N):	4
Fármaco A:	BisEDT	MIC de Fármaco A:	1	SOMA DE FICI:	4,93
Fármaco B:	Aztreonam	MIC de Fármaco B:	128	FICI MÉDIO:	1,23
Linha	MICA	FICA	MICB	FICB	FICI
A					
B					
C					
D	0,5	0,5	128	1	1,5
E	0,25	0,25	128	1	1,25
F	0,12	0,12	128	1	1,12
G	0,06	0,06	128	1	1,06
H					

TABELA 69. MIC (μ G/ML), FIC, FICI, PARA BISEDT EM COMBINAÇÃO COM COLISTINA

Organismo:	B. cepacia 1793			FICI (N):	4
Fármaco A:	BisEDT	MIC de Fármaco A:	1	SOMA DE FICI:	1,32
Fármaco B:	Colistina	MIC de Fármaco B:	>256	FICI MÉDIO:	0,33
Linha	MICA	FICA	MICB	FICB	FICI
A					
B					
C					
D	0,5	0,5	8	0,016	0,516
E	0,25	0,25	64	0,125	0,375
F	0,12	0,12	64	0,125	0,245
G	0,06	0,06	128	0,125	0,185
H					

TABELA 70. MIC (μ G/ML), FIC, FICI, PARA BISEDT EM COMBINAÇÃO COM MEROPENEM

Organismo:	B. cenocepacia 548			FICI (N):	4
Fármaco A:	BisEDT	MIC de Fármaco A:	4	SOMA DE FICI:	4,44
Fármaco B:	Meropenem	MIC de Fármaco B:	4	FICI MÉDIO:	1,11
Linha	MICA	FICA	MICB	FICB	FICI
A					
B					
C					
D	2	0,5	2	0,5	1
E	1	0,25	4	1	1,25
F	0,5	0,125	4	1	1,125
G	0,25	0,063	4	1	1,063
H					

TABELA 71. MIC (μ G/ML), FIC, FICI, PARA BISEDT EM COMBINAÇÃO COM TOBRAMICINA

Organismo:	B. cenocepacia 548			FICI (N):	4
Fármaco A:	BisEDT	MIC de Fármaco A:	4	SOMA DE FICI:	2,69
Fármaco B:	Tobramicina	MIC de Fármaco B:	32	FICI MÉDIO:	0,67
Linha	MICA	FICA	MICB	FICB	FICI
A					
B					
C					
D	2	0,5	8	0,25	0,75
E	1	0,25	16	0,5	0,75
F	0,5	0,125	16	0,5	0,625
G	0,25	0,063	16	0,5	0,563
H					

TABELA 72. MIC ($\mu\text{G/ML}$), FIC, FICI, PARA BISEDT EM COMBINAÇÃO COM AMICACINA

Organismo:	B. cenocepacia 548			FICI (N):	4
Fármaco A:	BisEDT	MIC de Fármaco A:	4	SOMA DE FICI:	2,69
Fármaco B:	Amicacina	MIC de Fármaco B:	128	FICI MÉDIO:	0,67
Linha	MICA	FICA	MICB	FICB	FICI
A					
B					
C					
D	2	0,5	32	0,25	0,75
E	1	0,25	64	0,5	0,75
F	0,5	0,125	64	0,5	0,625
G	0,25	0,063	64	0,5	0,563
H					

TABELA 73. MIC ($\mu\text{G/ML}$), FIC, FICI, PARA BISEDT EM COMBINAÇÃO COM CIPROFLOXACINA

Organismo:	B. cenocepacia 548			FICI (N):	4
Fármaco A:	BisEDT	MIC de Fármaco A:	4	SOMA DE FICI:	12,94
Fármaco B:	Ciprofloxacina	MIC de Fármaco B:	2	FICI MÉDIO:	3,23
Linha	MICA	FICA	MICB	FICB	FICI
A					
B					
C					
D	2	0,5	8	4	4,5
E	1	0,25	8	4	4,25
F	0,5	0,125	4	2	2,125
G	0,25	0,063	4	2	2,063
H					

TABELA 74. MIC (µG/ML), FIC, FICI, PARA BISEDT EM COMBINAÇÃO COM AZTREONAM

Organismo:	B. cenocepacia 548			FICI (N):	4
Fármaco A:	BisEDT	MIC de Fármaco A:	4	SOMA DE FICI:	4,94
Fármaco B:	Aztreonam	MIC de Fármaco B:	64	FICI MÉDIO:	1,23
Linha	MICA	FICA	MICB	FICB	FICI
A					
B					
C					
D	2	0,5	64	1	1,5
E	1	0,25	64	1	1,25
F	0,5	0,125	64	1	1,125
G	0,25	0,063	64	1	1,063
H					

TABELA 75. MIC (µG/ML), FIC, FICI, PARA BISEDT EM COMBINAÇÃO COM COLISTINA

Organismo:	B. cenocepacia 548			FICI (N):	4
Fármaco A:	BisEDT	MIC de Fármaco A:	4	SOMA DE FICI:	1,63
Fármaco B:	Colistina	MIC de Fármaco B:	>256	FICI MÉDIO:	0,41
Linha	MICA	FICA	MICB	FICB	FICI
A					
B					
C					
D	2	0,5	32	0,063	0,563
E	1	0,25	64	0,125	0,375
F	0,5	0,125	128	0,25	0,375
G	0,25	0,063	128	0,25	0,313
H					

TABELA 76. MIC ($\mu\text{G/ML}$), FIC, FICI, PARA BISEDT EM COMBINAÇÃO COM MEROPENEM

Organismo:	B. cenocepacia 813			FICI (N):	6
Fármaco A:	BisEDT	MIC de Fármaco A:	4	SOMA DE FICI:	6,48
Fármaco B:	Meropenem	MIC de Fármaco B:	2	FICI MÉDIO:	1,08
Linha	MICA	FICA	MICB	FICB	FICI
A					
B	2	0,5	1	0,5	1
C	1	0,25	2	1	1,25
D	0,5	0,125	2	1	1,125
E	0,25	0,063	2	1	1,063
F	0,12	0,03	2	1	1,03
G	0,06	0,015	2	1	1,015
H					

TABELA 77. MIC ($\mu\text{G/ML}$), FIC, FICI, PARA BISEDT EM COMBINAÇÃO COM TOBRAMICINA

Organismo:	B. cenocepacia 813			FICI (N):	6
Fármaco A:	BisEDT	MIC de Fármaco A:	4	SOMA DE FICI:	5,48
Fármaco B:	Tobramicina	MIC de Fármaco B:	256	FICI MÉDIO:	0,91
Linha	MICA	FICA	MICB	FICB	FICI
A					
B	2	0,5	128	0,5	1
C	1	0,25	128	0,5	0,75
D	0,5	0,125	128	0,5	0,625
E	0,25	0,063	256	1	1,063
F	0,12	0,03	256	1	1,03
G	0,06	0,015	256	1	1,015
H					

TABELA 78. MIC (µG/ML), FIC, FICI, PARA BISEDT EM COMBINAÇÃO COM AMICACINA

Organismo:	B. cenocepacia 813			FICI (N):	5
Fármaco A:	BisEDT	MIC de Fármaco A:	2	SOMA DE FICI:	4,97
Fármaco B:	Amicacina	MIC de Fármaco B:	>256	FICI MÉDIO:	0,99
Linha	MICA	FICA	MICB	FICB	FICI
A					
B					
C	1	0,5	256	0,5	1
D	0,5	0,25	256	0,5	0,75
E	0,25	0,125	>256	1	1,125
F	0,12	0,06	>256	1	1,06
G	0,06	0,03	>256	1	1,03
H					

TABELA 79. MIC (µG/ML), FIC, FICI, PARA BISEDT EM COMBINAÇÃO COM CIPROFLOXACINA

Organismo:	B. cenocepacia 813			FICI (N):	6
Fármaco A:	BisEDT	MIC de Fármaco A:	4	SOMA DE FICI:	17,11
Fármaco B:	Ciprofloxacina	MIC de Fármaco B:	2	FICI MÉDIO:	2,85
Linha	MICA	FICA	MICB	FICB	FICI
A					
B	2	0,5	0,25	0,125	0,625
C	1	0,25	8	4	4,25
D	0,5	0,125	8	4	4,125
E	0,25	0,063	8	4	4,063
F	0,12	0,03	4	2	2,03
G	0,06	0,015	4	2	2,015
H					

TABELA 80. MIC ($\mu\text{G/ML}$), FIC, FICI, PARA BISEDT EM COMBINAÇÃO COM AZTREONAM

Organismo:	B. cenocepacia 813			FICI (N):	5
Fármaco A:	BisEDT	MIC de Fármaco A:	2	SOMA DE FICI:	5,97
Fármaco B:	Aztreonam	MIC de Fármaco B:	32	FICI MÉDIO:	1,19
Linha	MICA	FICA	MICB	FICB	FICI
A					
B					
C	1	0,5	32	1	1,5
D	0,5	0,25	32	1	1,25
E	0,25	0,125	32	1	1,125
F	0,12	0,06	32	1	1,06
G	0,06	0,03	32	1	1,03
H					

TABELA 81. MIC ($\mu\text{G/ML}$), FIC, FICI, PARA BISEDT EM COMBINAÇÃO COM COLISTINA

Organismo:	B. cenocepacia 813			FICI (N):	5
Fármaco A:	BisEDT	MIC de Fármaco A:	2	SOMA DE FICI:	3,59
Fármaco B:	Colistina	MIC de Fármaco B:	>256	FICI MÉDIO:	0,72
Linha	MICA	FICA	MICB	FICB	FICI
A					
B					
C	1	0,5	64	0,125	0,625
D	0,5	0,25	256	0,5	0,75
E	0,25	0,125	256	0,5	0,625
F	0,12	0,06	256	0,5	0,56
G	0,06	0,03	>256	1	1,03
H					

TABELA 82. MIC (μ G/ML), FIC, FICI, PARA BISEDT EM COMBINAÇÃO COM MEROPENEM

Organismo:	B. multivorans 1795			FICI (N):	6
Fármaco A:	BisEDT	MIC de Fármaco A:	2	SOMA DE FICI:	7,97
Fármaco B:	Meropenem	MIC de Fármaco B:	4	FICI MÉDIO:	1,33
Linha	MICA	FICA	MICB	FICB	FICI
A					
B	2	1	4	1	2
C	1	0,5	4	1	1,5
D	0,5	0,25	4	1	1,25
E	0,25	0,125	4	1	1,125
F	0,12	0,06	4	1	1,06
G	0,06	0,03	4	1	1,03
H					

TABELA 83. MIC (μ G/ML), FIC, FICI, PARA BISEDT EM COMBINAÇÃO COM TOBRAMICINA

Organismo:	B. multivorans 1795			FICI (N):	6
Fármaco A:	BisEDT	MIC de Fármaco A:	2	SOMA DE FICI:	7,97
Fármaco B:	Tobramicina	MIC de Fármaco B:	>256	FICI MÉDIO:	1,33
Linha	MICA	FICA	MICB	FICB	FICI
A					
B	2	1	>256	1	2
C	1	0,5	>256	1	1,5
D	0,5	0,25	>256	1	1,25
E	0,25	0,125	>256	1	1,125
F	0,12	0,06	>256	1	1,06
G	0,06	0,03	>256	1	1,03
H					

TABELA 84. MIC (μ G/ML), FIC, FICI, PARA BISEDT EM COMBINAÇÃO COM AMICACINA

Organismo:	B. multivorans 1795			FICI (N):	6
Fármaco A:	BisEDT	MIC de Fármaco A:	2	SOMA DE FICI:	7,97
Fármaco B:	Amicacina	MIC de Fármaco B:	>256	FICI MÉDIO:	1,33
Linha	MICA	FICA	MICB	FICB	FICI
A					
B	2	1	>256	1	2
C	1	0,5	>256	1	1,5
D	0,5	0,25	>256	1	1,25
E	0,25	0,125	>256	1	1,125
F	0,12	0,06	>256	1	1,06
G	0,06	0,03	>256	1	1,03
H					

TABELA 85. MIC (μ G/ML), FIC, FICI, PARA BISEDT EM COMBINAÇÃO COM CIPROFLOXACINA

Organismo:	B. multivorans 1795			FICI (N):	5
Fármaco A:	BisEDT	MIC de Fármaco A:	2	SOMA DE FICI:	5,97
Fármaco B:	Ciprofloxacina	MIC de Fármaco B:	32	FICI MÉDIO:	1,19
Linha	MICA	FICA	MICB	FICB	FICI
A					
B					
C	1	0,5	32	1	1,5
D	0,5	0,25	32	1	1,25
E	0,25	0,125	32	1	1,125
F	0,12	0,06	32	1	1,06
G	0,06	0,03	32	1	1,03
H					

TABELA 86. MIC (μ G/ML), FIC, FICI, PARA BISEDT EM COMBINAÇÃO COM AZTREONAM

Organismo:	B. multivorans 1795			FICI (N):	5
Fármaco A:	BisEDT	MIC de Fármaco A:	2	SOMA DE FICI:	6,97
Fármaco B:	Aztreonam	MIC de Fármaco B:	16	FICI MÉDIO:	1,39
Linha	MICA	FICA	MICB	FICB	FICI
A					
B					
C	1	0,5	16	1	1,5
D	0,5	0,25	16	1	1,25
E	0,25	0,125	16	1	1,125
F	0,12	0,06	16	1	1,06
G	0,06	0,03	32	2	2,03
H					

TABELA 87. MIC (μ G/ML), FIC, FICI, PARA BISEDT EM COMBINAÇÃO COM COLISTINA

Organismo:	B. multivorans 1795			FICI (N):	6
Fármaco A:	BisEDT	MIC de Fármaco A:	2	SOMA DE FICI:	7,97
Fármaco B:	Colistina	MIC de Fármaco B:	>256	FICI MÉDIO:	1,33
Linha	MICA	FICA	MICB	FICB	FICI
A					
B	2		>256	1	2
C	1	0,5	>256	1	1,5
D	0,5	0,25	>256	1	1,25
E	0,25	0,125	>256	1	1,125
F	0,12	0,06	>256	1	1,06
G	0,06	0,03	>256	1	1,03
H					

REFERÊNCIAS

- [00602] 1.) Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. 28ª edição. CLSI suplemento M100. CLSI, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pensilvânia 19087 EUA, 2018.
- [00603] 2.) CLSI. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Padrão Aprovado—11ª Edição*. CLSI padrão M07. CLSI, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pensilvânia 19087 EUA, 2018.
- [00604] 3.) Eliopoulos G e R Moellering. 1991. Antimicrobial combinations. In *Antibiotics in Laboratory Medicine*, Terceira Edição, editada por V Lorian. Williams e Wilkins, Baltimore, MD, páginas 432-492.
- [00605] 4.) Odds FC. 2003. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. *J Antimicrob Chemother* 52(1):1.

EXEMPLO 11: ATIVIDADE *IN VITRO* DE BISMUTO-TIÓIS E COMPARADORES CONTRA BACTÉRIAS E LEVEDURA GRAM-POSITIVAS E NEGATIVAS RESISTENTES A FÁRMACO

[00606] *Introdução:* A atividade *in vitro* de três compostos de bismuto-tiol foi avaliada contra organismos atualmente identificados pelo Centro de Controle de Doenças (CDC; 1) como ameaças resistentes a fármaco principais nos Estados Unidos, incluindo patógenos ESKAPE (2, 3), *C. difficile*, *Candida* spp. resistente a gonococos e resistente a azol. A susceptibilidade de isolados de teste aos compostos de bismuto-tiol MB-1-B3, MB-2B, e MB-6 e comparadores relevantes foi avaliada de acordo com diretrizes do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI; 4-8).

MATERIAIS E MÉTODOS

[00607] *Agentes de Teste e Comparadores:* Os agentes de teste foram armazenados à temperatura ambiente até serem ensaiados. Todos os agentes de teste foram suspensos e diluídos em dimetilsul-

fóxico 100% (DMSO), e foram finalmente testados em uma concentração final de 0,06 a 64 µg/ml. Permitiu-se que as soluções de estoque repousassem por pelo menos 1 h antes do uso para autoesterilização.

[00608] Os fármacos comparadores foram testados por uma faixa de concentração que abrange faixas de controle de qualidade estabelecidas e pontos de interrupção. As informações sobre compostos comparadores usados durante o teste são descritas na Tabela 88 abaixo:

TABELA 88: COMPOSTOS COMPARADORES

Fármaco	Fabricante	Nº de Lote	Solvente	Diluyente
Levofloxacina	Sigma	BCBC2112V	NaOH 0,1 M	Água
Meropenem	USP	I0J244	Água	Água
Ceftazidima	USP	L1K237	Água	Água
Gentamicina	Sigma	SLBM9736V	Água	Água
Vancomicina			Água	Água
Penicilina	Sigma	071M0740V	Água	Água
Oxacilina	Sigma	BCBF5635V	Água	Água
Clindamicina	Sigma	021M1533V	Água	Água
Eritromicina	Sigma	011M1510V	Etanol 95%	Água
Ciprofloxacina	USP	1134335	Água	Água
Metronidazol	Sigma	095K0693	DMSO	Água
Fidaxomicina	Merck	SE-B13-01-001885	DMSO	Água
Fluconazol	USP	H1L308	DMSO	DMSO
Anfotericina B	Sigma	063M4043V	DMSO	DMSO
Trimetoprim	Sigma	080M4044	Água	Água
Sulfametoxazol	Fluka	BCBC7096V	Água e NaOH 2,5 M por gotejamento	Água
Ceftriaxona	USP	J1L040	Água	Água

[00609] *Organismos de Teste*: Os organismos de teste consistiram em cepas de referência do American Type Culture Collection (ATCC; Manassas, VA) ou isolados clínicos do repositório MMX. O espectro de organismos avaliados e suas informações fenotípicas correspondentes são mostrados nas Tabelas 89 a 95. Os organismos de controle de qualidade relevantes foram incluídos em cada dia de teste conforme especificado por CLSI (4 a 8). Os isolados foram subcultivados em um meio ágar apropriado antes do teste.

[00610] *Meio de Teste*: O meio de teste foi preparado e armazenado de acordo com as diretrizes de CLSI (4, 6, 7). O teste de susceptibilidade de microdiluição de caldo de bactérias aeróbicas foi realizado com o uso de caldo Mueller-Hinton ajustado por cátion (CAMHB; Becton Dickinson [BD], Sparks, MD; nº de lote 6117994) com a exceção de estreptococos em que CAMHB foi suplementado com sangue de cavalo lisado 5% (v/v) (Cleveland Scientific, Bath, OH; nº de lote 322799). *Neisseria gonorrhoeae* foi avaliado por diluição de ágar com o uso de ágar que consiste em base de meio GC (BD; nº de lote 4274618) suplementado com IsoVitaleX 1% (BD; nº de lote 5246843).

[00611] A susceptibilidade de bactérias anaeróbicas foi determinada por diluição de ágar com o uso de ágar de Brucella (BD/BBL; nº de lote 5237692) suplementado com hemina 5 µg/ml (Sigma, St. Louis, MO; nº de lote 108K1088), Vitamina K1 1 µg/ml e sangue desfibrinado de carneiro 5% (v/v) (Cleveland Scientific, Bath, OH; nº de lote 322799).

[00612] A susceptibilidade de isolados de levedura foi determinada por microdiluição de caldo em meio de RPMI (HyClone Laboratories, Logan, UT; nº de lote AZC184041B) tamponado com 0,165 M MOPS (Calbiochem, Billerica, MA; nº de lote 2694962). O pH do meio foi ajustado para 7,0 com NaOH 1 N, filtrado de modo esterilizado com o uso de um filtro PES de 0,2 µm, e armazenado a 4 °C até ser usado.

[00613] *Teste de MIC de Microdiluição de Caldo (Bactérias Aeróbi-*

cas e Levedura): O método de ensaio de microdiluição de caldo empregado para o teste de susceptibilidade de bactérias aeróbicas (excluindo *N. gonorrhoeae* que foi avaliada por diluição de ágar) e levedura seguiram essencialmente os procedimentos descritos por CLSI (3, 4, 7, 8) e empregaram manipuladores de líquido automatizados para conduzir diluições em série e transferências de líquido. Os manipuladores de líquido automatizados incluíram o Multidrop 384 (Lab systems, Helsinki, Finlândia) e Biomek 2000 (Beckman Coulter, Fullerton CA). Os poços nas colunas 2 a 12 em placas de microdiluição de 96 poços padrão (Costar 3795) foram carregados com 150 µl do diluente correto. Estas se tornariam as 'placas mãe' a partir das quais as placas 'filha' ou de teste seriam preparadas. Os fármacos (300 µl em 40X a concentração superior desejável nas placas de teste) foram dispensadas no poço apropriado na Coluna 1 das placas mãe. O Biomek 2000 foi usado para produzir diluições de duas vezes em série através da Coluna 11 na "placa mãe". Os poços da Coluna 12 não continham fármaco e serviram finalmente como os poços de controle de proliferação de organismo.

[00614] As placas filhas foram carregadas com 185 µl por poço do meio de teste apropriado com o uso do Multidrop 384. As placas filhas foram preparadas com o uso do Biomek FX que transferiu 5 µl de solução de fármaco de cada poço de uma placa mãe para o poço correspondente da placa filha correta em uma única etapa.

[00615] Um inóculo padronizado de cada organismo foi preparado por métodos de CLSI (3, 7). As colônias isoladas de cada isolado de teste foram coletadas da placa primária e uma suspensão foi preparada para se igualar ao padrão de turbidez McFarland 0,5. As suspensões padronizadas foram, então, diluídas 1:100 em meio de teste (1:100 para levedura, 1:20 para bactérias). Após a diluição, as suspensões de inóculo foram, então, transferidas para compartimentos de

reservatórios estéreis divididos por comprimento (Beckman Coulter), e o Biomek 2000 foi usado para inocular todas as placas. As placas filhas foram colocadas na Biomek 2000 em orientação invertida de modo que as placas tenham sido inoculadas de concentração de fármaco baixa a alta.

[00616] O Biomek 2000 distribuiu 10 µl de inóculo padronizado em cada poço da placa filha apropriada para uma diluição 1:20 adicional. Os poços das placas filhas continham finalmente 185 µl dos meios apropriados, 5 µl de solução de fármaco, e 10 µl de inóculo que corresponderam a uma concentração de inóculo final de 0,5 a 2,5 x 10³ CFU/ml de levedura e aproximadamente 5 x 10⁵ CFU/ml de bactérias por poço de teste. A concentração final de DMSO (se usada como um solvente) no poço de teste foi 2,5%.

[00617] As placas foram empilhadas em 4, cobertas com uma tampa na placa superior, colocadas em bolsas plásticas, e incubadas a 35 °C por aproximadamente 24 a 48 h para todos os isolados de levedura e 16 a 24 h para bactérias aeróbicas. As placas foram visualizadas do fundo com o uso de um visualizador de placa. Uma placa de controle de solubilidade não inoculada foi observada para evidência de precipitação de fármaco. Pontos finais de MIC para os agentes de teste e compostos de controle foram lidos por critérios de CLSI (3, 7).

[00618] *Teste de MIC de Diluição de Ágar (Bactérias Anaeróbicas e Gonococos)*: valores de MIC para bactérias anaeróbicas foram determinadas com o uso de um método de diluição de ágar de referência conforme descrito por CLSI (6). Os organismos foram cultivados a 35 °C na Câmara Anaeróbica Bactron II (Shel Lab, Cornelius, OR) por aproximadamente 48 h antes do ensaio. As diluições de fármaco e as placas de ágar suplementadas por fármaco foram preparadas manualmente por CLSI (6). Permitiu-se que as placas repousassem à temperatura ambiente por 1 h para permitir que a superfície de ágar seque

e seja pré-reduzida por aproximadamente 1 h na câmara anaeróbia antes da inoculação. Cada isolado foi suspenso ao equivalente de um padrão McFarland 0,5 em caldo de Brucella com o uso de um medidor de turbidez (Dade Behring MicroScan, West Sacramento, CA). Cada suspensão de célula bacteriana foi, então, diluída 1:10 em caldo de Brucella e transferida para poços em um bloco replicador de aço inoxidável que foi usado para inocular as placas de teste. As pontas no replicador distribuem aproximadamente 1 a 2 µl de inóculo para uma superfície de ágar. As manchas de inóculo resultantes continham aproximadamente 1×10^5 CFU/mancha. Após o inóculo secar, as placas ágar suplementadas com fármaco inoculado e nenhuma placa de proliferação de fármaco foi incubada a 35 °C por 42 a 48 h na câmara de anaeróbios. A MIC foi lida por diretrizes de CLSI (6).

[00619] Os valores de MIC para *N. gonorrhoeae* foram determinados com o uso do método de diluição de ágar de referência, conforme descrito por CLSI (4). Este método seguiu o mesmo método de diluição de ágar descrito acima para anaeróbios com a exceção de que placas de ágar continham base média de GC suplementada com Iso-VitaleX 1% e, após a inoculação, as placas foram incubadas aerobicamente a 35 °C em CO₂ 5% por 20 a 24 h.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

[00620] A atividade dos agentes de teste de bismuto-tiol MB-1-B3, MB-2B, e MB-6 e comparadores é mostrada abaixo para Enterobacteriaceae (Tabela 89), *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* (Tabela 90), *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus spp.* (Tabela 91), estreptococos (Tabela 92), *N. gonorrhoeae* (Tabela 93), anaeróbios (Tabela 94), e *Candida spp.* (Tabela 95). Através de todos os organismos avaliados, os resultados de MIC para agentes comparadores estiveram dentro das faixas de QC de CLSI estabelecidas para os isolados de QC de ATCC relevante (5, 8).

[00621] Os Enterobacteriaceae avaliados (Tabela 1) consistiram no isolado de QC de ATCC de *Escherichia coli*, *E. coli* ESBL positiva e *Klebsiella pneumoniae*, *K. pneumoniae* KPC positiva, e *E. coli* NDM-1 positiva, *K. pneumoniae*, e *Enterobacter cloacae*. Excluindo o isolado de QC de ATCC de *E. coli* que foi suscetível, a atividade dos comparadores ilustra a natureza resistente ao fármaco destes isolados. Independentemente do alto grau de resistência a fármaco, os agentes de teste de bismuto-tiol avaliados tiveram atividade consistente através de todos os isolados. MB-1-B3 (valores de MIC de 0,5 a 4 µg/ml) e MB-6 (valores de MIC de 0,5 a 2 µg/ml) tiveram atividade similar e esta atividade foi tipicamente 2 a 16 vezes inferior àquela observada com MB-2B (valores de MIC de 2 a 32 µg/ml).

[00622] A *P. aeruginosa* avaliada e *A. baumannii* (Tabela 90) consistiram no isolado de QC de ATCC de *P. aeruginosa* suscetível, e vários isolados com metalo-beta-lactamases ou multirresistência. Excluindo o isolado de QC, a atividade de comparadores ilustra a natureza resistente a fármaco destes isolados. Independentemente do alto grau de resistência a fármaco, os agentes de teste de bismuto-tiol avaliados tiveram atividade consistente através de todos os isolados. MB-1-B3 e MB-6 (valores de MIC de 0,5 a 2 µg/ml) tiveram atividade similar e esta atividade foi tipicamente 2 a 32 vezes inferior àquela observada com MB-2B (valores de MIC de 2 a 16 µg/ml).

[00623] Contra *S. aureus* e *Enterococcus* spp. (Tabela 91), todos os 3 compostos de teste de bismuto-tiol tiveram atividade potente independentemente do fenótipo de resistência (MRSA para *S. aureus* e VRE for *E. faecalis* e *E. faecium*). O MRSA avaliado foi grandemente suscetível à vancomicina e gentamicina, mas resistente aos comparadores restantes. Independentemente da resistência, MB-1-B3 e MB-6 tiveram valores de MIC de < 0,06 µg/ml contra MRSA e MB-2B também teve valores de MIC de < 0,06 µg/ml com a exceção do isolado de

QC e MRSA MMX 9203 (valores de MIC de 0,5 e 0,25 µg/ml, respectivamente). Contra enterococos, houve pouca atividade observada com os comparadores avaliados. Os agentes de teste de bismuto-tiol foram ativos, embora valores de MIC levemente superiores para *E. faecium* resistente à vancomicina em relação a *E. faecalis* resistente à vancomicina. Como com os isolados aeróbicos Gram-negativos, para enterococos MB-1-B3 (valores de MIC de 0,25 a 2 µg/ml) e MB-6 (valores de MIC de 0,25 a 1 µg/ml) tiveram atividade similar e esta atividade foi tipicamente 4 a 8 vezes inferior àquela observada com MB-2B (valores de MIC de 2 a 4 µg/ml).

[00624] Os estreptococos avaliados (Tabela 92) consistiram no isolado de QC de *S. pneumoniae* suscetível, pneumococos multirresistentes, *S. pyogenes* resistente a macrolídeo, e *S. agalactiae* resistente à clindamicina. Independentemente do fenótipo de resistência a fármaco, os agentes de teste de bismuto-tiol mantiveram a atividade contra estreptococos. Dentre os 3 agentes de teste de bismuto-tiol, houve uma tendência a valores de MIC levemente mais altos contra pneumococos em relação aos estreptococos beta-hemolíticos para MB- 1-B3 e MB-6. Contra pneumococos, MB-1-B3 (valores de MIC de 0,5 a 1 µg/ml) e MB-6 (valores de MIC de 0,5 a 8 µg/ml) tiveram atividade similar e esta atividade foi tipicamente 8 a 16 vezes inferior àquela observada com MB-2B (valores de MIC de 1 a 8 µg/ml). Contra estreptococos beta-hemolíticos, MB-1-B3 (valores de MIC de 0,03 a 1 µg/ml) e MB-6 (valores de MIC de 0,03 a 2 µg/ml) tiveram atividade similar e esta atividade foi tipicamente 4 a 16 vezes inferior àquela observada com MB-2B (valores de MIC de 0,25 a 8 µg/ml).

[00625] Conforme mostrado na Tabela 93, os agentes de teste de bismuto-tiol tiveram atividade potente contra o isolado de QC suscetível de *N. gonorrhoeae*, os 3 isolados resistentes à ciprofloxacina, e o único isolado não suscetível a ceftriaxona. Atividade similar foi obser-

vada com MB-1-B3 (valores de MIC de 0,06 a 0,12 µg/ml) e MB-6 (valores de MIC de 0,06 a 0,25 µg/ml) e esta atividade foi levemente superior àquela observada para MB-2B (valores de MIC de 0,12 a 0,5 µg/ml).

[00626] Contra os anaeróbios avaliados (Tabela 94) que consistiram nos isolados de QC *Bacteroides fragilis* e *Clostridium difficile* suscetíveis e *C. difficile* com vários ribotipos clinicamente importantes incluindo 027 (cepa hipervirulenta), MB-1-B3 (valores de MIC de 0,25 a 2 µg/ml) e MB-6 (valores de MIC de 1 a 4 µg/ml) tiveram atividade similar e esta atividade foi típica e levemente superior àquela observada com MB-2B (valores de MIC de 2 a 16 µg/ml). A resistência a comparadores clindamicina, metronidazol e fidaxomicina pareceram não ter impacto da atividade dos agentes de teste de bismuto-tiol.

[00627] Finalmente, contra isolados resistentes a azol de *Candida spp.* clinicamente prevalentes (Tabela 95) incluindo *C. parapsilosis*, *C. albicans*, *C. glabrata*, e *C. tropicalis*, os agentes de teste de bismuto-tiol foram ativos. Uma tendência em direção a valores de MIC superiores para os agentes de teste foi observada com *C. albicans* e *C. tropicalis* em relação a *C. parapsilosis* e *C. glabrata*. Todos os 3 agentes de teste de bismuto-tiol tiveram atividade similar contra levedura, com valores de MIC de 0,25 a 0,5 µg/ml a 24 h contra *C. parapsilosis* e *C. glabrata*, 1 a 4 µg/ml contra *C. albicans*, e 1 a 16 µg/ml contra *C. tropicalis*.

[00628] Em suma, a atividade de espectro amplo dos agentes de teste de bismuto-tiol avaliados neste estudo foi clara e a atividade observada contra isolados de QC suscetíveis foi mantida contra isolados resistente a fármaco independentemente do organismo ou fenótipo de resistência avaliado. Os agentes de teste de bismuto-tiol foram os mais ativos contra MRSA, *N. gonorrhoeae*, e estreptococos beta-hemolíticos com base em valores de MIC, mas também foram alta-

mente ativos contra aeróbios Gram-negativos, *S. pneumoniae*, *C. difficile*, e levedura. Em geral, agentes de teste MB-1-B3 e MB-6 tiveram atividade similar por MIC e ambos foram mais potentes do que MB-2B, com a exceção de levedura e, a um grau menor, *N. gonorrhoeae* em que todos os 3 compostos tiveram perfis de atividade similar.

TABELA 89. VALORES DE CONCENTRAÇÃO INIBIDORA MÍNIMA (MIC) PARA AGENTES DE TESTE DE BIS-MUTO-TIOL MICROBIANO E COMPARADORES CONTRA ENTEROBACTERIAEAE

Isolado	Tipo	MIC (µg/ml)							
		MB-1-B3	MB-2B	MB-6	Levofloxacina	Ciprofloxacina	Meropenem	Ceftazidima	Gentamicina
E. coli MMX 102 (ATCC 25922)	QC	0,5	2	0,5	0,015 (0,008 a 0,06) ¹	0,008 (0,004 a 0,015)	0,03 (0,008 a 0,06)	0,12 (0,06 a 0,5)	1 (0,25 a 1)
E. coli MMX 8423	ESBL Lev ^R CAZ ^R Gm ^R	1	2	1	16	32	0,03	32	64
E. coli MMX 8424	ESBL CAZ ^R	0,5	4	0,5	0,06	0,015	0,03	16	0,25
E. coli MMX 8425	ESBL Lev ^R CAZ ^R Gm ^R	1	2	1	16	>64	0,015	16	>64
E. coli MMX 5980 (ATCC BAA-2469)	NDM-1 Lev ^R MEM ^R CAZ ^R Gm ^R	1	2	1	16	>64	32	>32	>64
K. pneumoniae MMX 4683	KPC-2 Lev ^R MEM ^R CAZ ^R	1	8	1	>64	>64	32	>32	1
K. pneumoniae MMX 4622	KPC-2 MEM ^R CAZ ^R	2	16	1	1	0,03	>64	>32	0,25
K. pneumoniae MMX 4623	KPC-2 MEM ^R CAZ ^R Gm ^R	2	32	0,5	1	2	>64	>32	64
K. pneumoniae MMX 4694	KPC-3 Lev ^R MEM ^R CAZ ^R	2	8	1	64	>64	32	>32	8

Isolado	Tipo	MIC (µg/ml)							
		MB-1-B3	MB-2B	MB-6	Levofloxacina	Ciprofloxacina	Meropenem	Ceftazidima	Gentamicina
K. pneumoniae MMX 4653	KPC-3 Lev ^R MEM ^R CAZ ^R	4	16	2	64	>64	>64	>32	1
K. pneumoniae MMX 4684	ESBL MEM ^R	4	32	2	0,03	0,5	8	8	0,25
K. pneumoniae MMX 4685	ESBL Lev ^R MEM ^R CAZ ^R	2	8	1	32	64	4	>32	1
K. pneumoniae MMX 5979	NDM-1 Lev ^R MEM ^R CAZ ^R Gm ^R	2	16	1	>64	>64	>64	>32	>64
E. cloacae MMX 5981 (ATCC BAA-2468)	NDM-1 Lev ^R MEM ^R CAZ ^R Gm ^R	4	32	2	64	>64	>64	>32	>64

QC = controle de qualidade; ESBL = beta-lactamase de espectro estendido; KPC = *K. pneumoniae carbapenemase*;

NDM = New Delhi metalo-beta-lactamase;

Lev^R = resistente à levofloxacina; MEM^R = resistente a meropenem; CAZ^R = resistente à ceftazidima; Gm^R = resistente à gentamicina

¹ Faixas de QC de CLSI mostradas em parênteses quando aplicável

TABELA 90. VALORES DE CONCENTRAÇÃO INIBIDORA MÍNIMA (MIC) PARA AGENTES DE TESTE DE BIS-MUTO-TIOL MICROBIANO E COMPARADORES CONTRA P. AERUGINOSA E A. BAUMANNII

Isolado	Tipo	MIC (µg/ml)							
		MB-1-B3	MB-2B	MB-6	Levofloxacina	Ciprofloxacina	Meropenem	Ceftazidima	Gentamicina
P. aeruginosa MMX 103 (ATCC 27853)	QC	1	8	1	1 (0,5 a 4)	0,5 (0,25 a 1)	0,5 (0,25 a 1)	2 (1 a 4)	1 (0,5 a 2)
P. aeruginosa MMX 4697	VIM-2 Lev ^R Cip ^R MEM ^R CAZ ^R	1	16	2	32	32	8	32	4
P. aeruginosa MMX 4654	IMP-7 Lev ^R Cip ^R MEM ^R CAZ ^R	2	8	2	64	32	>64	>32	>64
P. aeruginosa MMX 2562	MDR Lev ^R Cip ^R MEM ^R CAZ ^R	1	4	2	64	64	32	>32	8
P. aeruginosa MMX 1381	MDR Lev ^R Cip ^R MEM ^R CAZ ^R	1	2	1	64	32	16	32	8
P. aeruginosa MMX 3991	MDR Lev ^R Cip ^R MEM ^R CAZ ^R	1	8	2	64	32	16	16	4
A. baumannii MMX 4651 (NCTC 13304)	MDR; OXA-27 Lev ^R Cip ^R MEM ^R CAZ ^R Gm ^I	0,5	16	0,5	8	32	64	>32	8
A. baumannii MMX 2592	MDR Lev ^R Cip ^R MEM ^R CAZ ^R Gm ^R	0,5	16	0,5	64	>64	64	32	>64
A. baumannii MMX 2593	MDR Lev ^R Cip ^R MEM ^R CAZ ^R Gm ^R	1	16	0,5	32	>64	64	32	>64
A. baumannii MMX 3372	MDR Cip ^R MEM ^I CAZ ^I	1	16	1	1	4	4	16	0,5
A. baumannii MMX 3373	Sensível	1	16	0,5	0,12	0,5	0,5	4	0,12

QC = controle de qualidade; VIM/IMP = tipo de metalo-beta lactamase; OXA = beta-lactamase de espectro estendido

de tipo D; MDR = multirresistente (com base na resistência a pelo menos 3 classes diferentes de antibiótico); Lev^R = resistente à levofloxacina; CIP^R = resistente à ciprofloxacina; MEM^I = resistência intermediária a meropenem; MEM^R = resistente a meropenem; CAZ^R = resistente à ceftazidima; CAZ^I = resistência intermediária à ceftazidima; Gm^R = resistente à gentamicina; Gm^I = resistência intermediária à gentamicina.

¹ Faixas de QC de CLSI mostradas em parênteses quando aplicável

TABELA 91. VALORES DE CONCENTRAÇÃO INIBIDORA MÍNIMA (MIC) PARA AGENTES DE TESTE DE BISMUTO-TIOL DE MICROBION E COMPARADORES CONTRA S. AUREUS E ENTEROCOCCUS SPP.

Isolado	Tipo	MIC (µg/ml)											
		MB-1-B3	MB-2B	MB-6	Levofloxacina	Ciprofloxacina	Gentamicina	Vancomicina	Meropenem	Ceftazidima	Clindamicina	Eritromicina	Oxacilina
S. aureus MMX 101 (ATCC 29213)	QC; MSSA	≤0,06	0,5	≤0,06	0,12 (0,06 a 0,5) ¹	0,5 (0,12 a 0,5)	0,12 (0,12 a 1)	1 (0,5 a 2)	0,06 (0,03 a 0,12)	8 (4 a 16)	0,12 (0,06 a 0,25)	0,5 (0,25 a 1)	0,25 (0,12 a 0,25)
S. aureus MMX 9203	MRSA ² Lev ^R Cip ^R Ery ^R Ox ^R	≤0,06	0,25	≤0,06	4	16	0,12	2	4	>32	0,12	>64	64
S. aureus MMX 9204	MRSA Lev ^R Cip ^R Ery ^R Ox ^R	≤0,06	≤0,06	≤0,06	4	16	0,25	1	4	>32	0,12	>64	64
S. aureus MMX 9205	MRSA Lev ^R Cip ^R CC ^R Ery ^R Ox ^R	≤0,06	≤0,06	≤0,06	>64	>64	0,25	2	64	>32	>32	>64	>64

Isolado	Tipo	MIC (µg/ml)											
		MB-1-B3	MB-2B	MB-6	Levofloxacina	Ciprofloxacina	Gentamicina	Vancomicina	Meropenem	Ceftazidima	Clindamicina	Eritromicina	Oxacilina
S. aureus MMX 5373	MRSA Lev ^R Cip ^R CC ^R Ery ^R Ox ^R	≤0,06	≤0,06	≤0,06	32	>64	0,25	2	32	>32	>32	>64	>64
S. aureus MMX 6311	MRSA Lev ^R Cip ^R CC ^R Ery ^R Ox ^R	≤0,06	≤0,06	≤0,06	32	>64	0,25	0,25	8	>32	>32	>64	32
E. faecalis MMX 8960	VRE Lev ^R Cip ^R Ery ^R	0,5	2	0,5	32	64	>64	>64	8	>32	>32	>64	>64
E. faecalis MMX 8961	VRE Lev ^R Cip ^R Ery ^R	0,25	2	0,25	64	64	8	>64	8	>32	>32	>64	64
E. faecalis MMX 8962	VRE Lev ^R Cip ^R Ery ^R	0,5	2	0,25	64	64	>64	>64	2	>32	>32	>64	16
E. faecium MMX 752	VRE vanA Lev ^R Cip ^R Ery ^R	2	4	1	>64	>64	>64	>64	>64	>32	>32	>64	>64
E. faecium MMX 485	VRE vanA Lev ^R Cip ^R Ery ^R	1	2	0,5	>64	>64	>64	>64	>64	>32	>32	>64	>64

QC = controle de qualidade; MSSA = suscetível à meticilina *S. aureus*; MRSA = resistente à meticilina *S. aureus*; VRE = enterococos resistentes à vancomicina; vanA = VRE de tipo vanA (com base em fenótipo resistente à vancomicina e

teicoplanina); Lev^R = resistente à levofloxacina; CIP^R = resistente à ciprofloxacina; CC^R = resistente à clindamicina; Ery^R = resistente à eritromicina; Ox^R = resistente à oxacilina

¹ Faixas de QC de CLSI mostradas em parênteses quando aplicável

² MRSA não tem pontos de interrupção para ceftazidima e meropenem – resistência é presumida.

TABELA 92. VALORES DE CONCENTRAÇÃO INIBIDORA MÍNIMA (MIC) PARA AGENTES DE TESTE DE BIS-MUTO-TIOL DE MICROBION E COMPARADORES CONTRA STREPTOCOCCUS SPP.

Isolado	Tipo	MIC (µg/ml)								Penicilina		
		MB-1-B3	MB-2B	MB-6	Levofloxacin	Ciprofloxacin	Meropenem	Vancomicina	Trimeth/Sulfa		Clindamicina	Eritromicina
S. pneumoniae MMX 6837 (ATCC 49619)	QC	0,5	8	0,5	0,5 (0,5 a 2) ¹	0,5	0,06 (0,06 a 0,25)	0,25 (0,12 a 0,5)	0,25/4,8 (0,12/2,4 a 1/19)	0,06(0,03 a 0,12)	0,03 (0,03 a 0,12)	0,25 (0,25 a 1)
S. pneumoniae MMX 880	Lev ^R SXT ^R CC ^R Ery ^R Pen ^R	1	8	0,5	8	32	0,5	0,5	4/76	>8	>8	2
S. pneumoniae MMX 937	Mem ^R SXT ^R CC ^R Ery ^R Pen ^R	1	1	8	1	1	1	0,5	16/304	>8	>8	4
S. pneumoniae MMX 3959	CC ^R Ery ^R	1	8	1	1	4	0,03	0,5	2/38	>8	>8	0,12
S. pneumoniae MMX	Mem ^R SXT ^R	1	8	0,5	1	2	1	0,25	16/304	>8	>8	4

Isolado	Tipo	MIC (µg/ml)										
		MB-1-B3	MB-2B	MB-6	Levofloxacina	Ciprofloxacina	Meropenem	Vancomicina	Trimeth/Sulfa	Clindamicina	Eritromicina	Penicilina
5440	CC ^R Ery ^R Pen ^R											
S. pneumoniae MMX 5445	Mem ^R SXT ^R CC ^R Ery ^R Pen ^R	0,5	8	0,5	1	2	1	0,25	8/152	>8	>8	4
S. pneumoniae MMX 8133	Mem ^R SXT ^R CC ^R Ery ^R Pen ^R	0,25	8	0,5	1	1	1	0,25	8/152	>8	>8	4
S. pyogenes MMX 3068	Ery ^R	0,12	2	0,12	0,5	0,5	≤0,008	0,5	0,12/2,4	0,06	>8	≤0,008
S. pyogenes MMX 3820	ERY ^R CLI ^R	0,25	1	0,5	0,25	0,12	≤0,008	0,5	0,12/2,4	1	>8	≤0,008
S. pyogenes MMX 3919	ERY ^R	0,03	0,25	0,03	0,12	0,25	≤0,008	0,5	0,06/1,2	0,12	>8	≤0,008
S. pyogenes MMX 3929	ERY ^R CC ^R	0,25	1	0,5	0,5	0,5	≤0,008	0,5	0,25/4,8	>8	>8	≤0,008
S. pyogenes MMX 5091	ERY ^R CC ^R	0,5	1	1	0,25	0,25	≤0,008	0,5	0,06/1,2	>8	>8	≤0,008
S. agalactiae MMX 3741	ERY ^R CC ^R	0,5	4	0,25	0,5	0,5	0,03	0,5	0,12/2,4	>8	8	0,03
S. agalactiae MMX	ERY ^R CC ^R	0,25	4	0,25	1	1	0,06	0,5	0,12/2,4	>8	>8	0,06

Isolado	Tipo	MIC (µg/ml)										
		MB-1-B3	MB-2B	MB-6	Levofloxacina	Ciprofloxacina	Meropenem	Vancomicina	Trimeth/Sulfa	Clindamicina	Eritromicina	Penicilina
3743												
S. agalactiae MMX 4077	ERY ^R CC ^R	0,5	4	0,25	0,5	1	0,06	0,5	0,12/2,4	>8	>8	0,06
S. agalactiae MMX 4079	ERY ^R CC ^R Pen ^R MEM ^R	1	8	0,5	1	1	8	2	0,12/2,4	>8	>8	2
S. agalactiae MMX 4086	ERY ^R CC ^R	0,25	2	0,25	0,5	0,5	0,06	1	0,12/2,4	>8	>8	0,06

QC = controle de qualidade; Trimeth = trimetoprim; Sulfa = sulfametoxazol; MDR = multirresistente (com base em resistência a pelo menos 3 classes diferentes de antibiótico);

Ery^R = resistente à eritromicina; CC^R = resistente à clindamicina; SXT^R = resistente a trimetoprim/sulfametoxazol; MEM^R = resistente a meropenem;

Pen^R = Resistente à penicilina

¹ Faixas de QC de CLSI mostradas em parênteses quando aplicável

TABELA 93. VALORES DE CONCENTRAÇÃO INIBIDORA MÍNIMA (MIC) PARA AGENTES DE TESTE DE BIS-MUTO-TIOL DE MICROBION E COMPARADORES CONTRA N. GONORRHOEAE

Isolado	Tipo	MIC (µg/ml)				
		MB-1-B3	MB-2B	MB-6	Ciprofloxacina	Ceftriaxona
<i>N. gonorrhoeae</i> MMX 683 (ATCC 49226)	QC	0,06	0,12	0,06	0,008 (0,001 a 0,008) ¹	0,015 (0,004 a 0,015)
<i>N. gonorrhoeae</i> MMX 6791	CIP ^R	0,12	0,12	0,12	>8	0,06
<i>N. gonorrhoeae</i> MMX 6792	CIP ^R	0,12	0,12	0,12	>8	0,06
<i>N. gonorrhoeae</i> MMX 6793	CIP ^R	0,12	0,5	0,25	>8	0,03
<i>N. gonorrhoeae</i> MMX 6757	CTX NS	0,06	0,5	0,06	0,03	1

QC = controle de qualidade; Cip^R = resistente à ciprofloxacina; CTX NS = não suscetível a ceftriaxona

¹ Faixas de QC de CLSI mostradas em parênteses quando aplicável

TABELA 94. VALORES DE CONCENTRAÇÃO INIBIDORA MÍNIMA (MIC) PARA AGENTES DE TESTE DE BIS-MUTO-TIOL DE MICROBION E COMPARADORES CONTRA ANAERÓBIOS

Isolado	Tipo	MIC (µg/ml)				
		MB-1-B3	MB-2B	MB-6	Clindamicina	Metronidazol
<i>B. fragilis</i> MMX 123 (ATCC 25285)	QC	2	8	1	1 (0,5 a 2) ¹	0,5 (0,25 a 1)
<i>C. difficile</i> MMX 4381 (ATCC 700057)	QC CC ^I	4	8	4	4 (2 a 8)	0,5 (0,12 a 0,5)
<i>C. difficile</i> MMX 5681 (NCTC 13307)	ribotipo 012 CC ^R	4	8	2	>64	0,5
<i>C. difficile</i> MMX 5680 (NCTC 13336)	ribotipo 027 CC ^I MET ^R	1	2	2	4	>64
<i>C. difficile</i> MMX 8272	ribotipo 255 CC ^I	4	8	2	4	0,5
<i>C. difficile</i> MMX 8279	ribotipo 005 CC ^R	4	16	2	>64	0,5
<i>C. difficile</i> MMX 8281	ribotipo 010 CC ^R	2	8	2	>64	0,5

QC = controle de qualidade; CC^I = resistência intermediária à clindamicina; CC^R = resistente à clindamicina; MET^R = resistente a metronidazol

¹ Faixas de QC de CLSI mostradas em parênteses quando aplicável

TABELA 95. VALORES DE CONCENTRAÇÃO INIBIDORA MÍNIMA (MIC) PARA AGENTES DE TESTE DE BIS-MUTO-TIOL DE MICROBION E COMPARADORES CONTRA ESPÉCIE CANDIDA

Isolado	Tipo	MIC ¹ (µg/ml)				
		MB-1-B3	MB-2B	MB-6	Fluconazol	Antofoterina B
<i>C. parapsilosis</i> MMX 2323 (ATCC 22019)	QC	0,5, 1	0,5, 1	0,5, 1	2, 2 (0,5 a 4, 1 a 4) ²	0,5, 1 (0,25 a 2, 0,5 a 4)
<i>C. parapsilosis</i> MMX 7370	FLU ^R	0,5, 0,5	0,5, 0,5	0,25, 0,5	32, 32	0,5, 1
<i>C. parapsilosis</i> MMX 7555	FLU ^R	0,5, 1	0,25, 1	0,25, 0,5	32, 64	0,5, 0,5
<i>C. albicans</i> MMX 7039	Sensível	4, 16	2, 2	2, 2	0,5, 0,5	0,5, 0,5
<i>C. albicans</i> MMX 7055	Sensível	2, 16	1, 4	2, 2	0,25, 0,5	0,25, 0,5
<i>C. glabrata</i> MMX 7086	FLU ^R	0,5, 1	0,5, 1	0,5, 1	32, 64	0,5, 1
<i>C. glabrata</i> MMX 7318	FLU ^R	0,5, 1	0,25, 1	0,25, 0,5	>64, >64	0,5, 1
<i>C. tropicalis</i> MMX 7247	FLU ^R	4, 16	2, 4	4, 4	64, >64	0,5, 1
<i>C. tropicalis</i> MMX 7248	FLU ^R	16, 32	4, 4	4, 8	32, >64	0,5, 1
<i>C. tropicalis</i> MMX 7360	FLU ^R	2, 16	1, 2	2, 2	64, >64	0,5, 0,5

QC = controle de qualidade; FLU^R = resistente a fluconazol

¹ MIC relatada após a incubação em 24 e 48 h

² Faixas de QC de CLSI mostradas em parênteses quando aplicável

REFERÊNCIAS

- [00629] 1.) Centro de Controle e Prevenção de Doenças. Antibiotic resistance threats in the United States, 2013. Disponível em <http://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/ar-threats-2013-508.pdf>. Acessado em 13/6/2016.
- [00630] 2.) Boucher HW, Talbot GH, Bradley JS, Edwards JE, Gilbert D, Rice LB, Scheld M, Spellberg B, Bartlett J. Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. Clin Infect Dis 2009; 48: 1 a 12.
- [00631] 3.) Rice LB. Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: no ESKAPE. J Infect Dis 2008; 197: 1.079 a 1.081.
- [00632] 4.) Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Padrão Aprovado—Décima Edição. Clinical and Laboratory Standards Institute documento nº M07-A10. CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pensilvânia 19087-1898 EUA, 2015.
- [00633] 5.) CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Vigésimo Sexto Suplemento Informativo. CLSI documento M100-S26. CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pensilvânia 19087 EUA, 2016.
- [00634] 6.) CLSI. Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria; Padrão Aprovado—Oitava Edição. CLSI documento M11-A8. CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pensilvânia 19087-1898 EUA, 2012.
- [00635] 7.) CLSI. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Padrão Aprovado—Terceira Edição. CLSI documento M27-A3. CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pensilvânia 19087-1898 EUA, 2008.
- [00636] 8.) CLSI. Reference Method for Broth Dilution Antifungal

Susceptibility Testing of Yeasts; Quarto Suplemento Informativo. CLSI documento M27-S4. CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pensilvânia 19087-1898 EUA, 2012.

EXEMPLO 12: TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE DE TRÊS BISMUTO-TIÓIS CONTRA *S. AUREUS* INTERMEDIÁRIO DE VANCOMICINA E BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS QUE PRODUZEM β -LACTAMASE

INTRODUÇÃO

[00637] A atividade *in vitro* de BisEDT e dois agentes investigativos de bismuto-tiol adicionais (MB-2B e MB-6) foi determinada para isolados de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* caracterizada por β -lactamases de espectro estendido (ESBL) e/ou resistência a carbapenem. Além disto, *Staphylococcus aureus* intermediário de vancomicina (VISA) foi avaliado. A maior parte dos isolados testados no estudo atual foram multirresistentes (MDR) conforme definido por resistência a pelo menos três classes de antibiótico diferentes. A susceptibilidade aos compostos investigativos e comparadores relevantes foi determinada por microdiluição de caldo conduzida de acordo com diretrizes do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI; 2,3).

MATERIAIS E MÉTODOS

[00638] *Compostos de Teste*: Os agentes de teste BisEDT (MB-1-B3; nº de lote ED268-1-11-01), MB-2B, e MB-6 foram armazenados à temperatura ambiente, no escuro, até serem ensaiados. O solvente e o diluente para os agentes de teste foi DMSO (Sigma; St. Louis, MO; nº de lote SHBB9319V) e a concentração de estoque preparada foi 6,464 µg/ml (101X a concentração de teste final).

[00639] Os fármacos comparadores foram fornecidos e mostrados na Tabela 96 abaixo:

TABELA 96: FÁRMACOS COMPARADORES

Agentes de Teste	Fornecedor	Número de Catálogo	Número de Lote	Solvente/ Diluente
BisEDT	Microbion	-	ED268-1-11-01	DMSO/DMSO
MB-2B	Microbion	-	TA-8-167-01	DMSO/DMSO
MB-6	Microbion	-	5-21-14	DMSO/DMSO
Amicacina	Sigma	A2324-5G	058K0803	H ₂ O/H ₂ O
Ceftazidima	Sigma	C3809-1G	076M4770V	H ₂ O/H ₂ O
Clavulanato	Sigma	33454-100MG	STBH5214	Tampão Phos. pH 6,0
Clindamicina	Sigma	C5269-100MG	021M1533	H ₂ O/H ₂ O
Daptomicina	Cubist	-	MCB2009	H ₂ O/H ₂ O
Levofloxacina	Sigma	28266-1G-F	BCBF7004V	H ₂ O+NaOH/H ₂ O
Linezolida	Selleck Chemicals	S1408	S140802	H ₂ O/H ₂ O
Meropenem	USP	1392454	J0K434	H ₂ O/H ₂ O
Vancomicina	Sigma	V2002-1G	080M1341V	H ₂ O/H ₂ O

[00640] Os compostos de teste foram avaliados em uma faixa de concentração de 0,06 a 64 µg/ml. Para isolados de teste Gram-negativos, amicacina e ceftazidima (sozinhos e com clavulanato em uma concentração fixa de 4 µg/ml) foram avaliadas por uma faixa de concentração de 0,06 a 64 µg/ml; meropenem e levofloxacina foram avaliados por uma faixa de concentração de 0,008 a 8 µg/ml. Para o teste de *S. aureus*, clindamicina, daptomicina, levofloxacina e vancomicina foram avaliadas em uma faixa de concentração de 0,008 a 8 µg/ml; linezolida foi testada de 0,03 a 32 µg/ml.

[00641] *Organismos*: Os organismos de teste conforme mostrado nas Tabelas 97 a 101 consistiram em isolados clínicos do repositório

Micromyx (MMX) e cepas de referência do American Type Culture Collection (ATCC; Manassas, VA), National Collection of Type Cultures (NCTC; Public Health England, Salisbury, UK), da Network on Antimicrobial Resistance em *Staphylococcus aureus* (NARSA; BEI Resources, Manassas, VA), e do Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC; Atlanta, GA). Os organismos de teste foram mantidos congelados a -80 °C. Antes do teste, os isolados foram cultivados em Ágar de Soja Tríptica com sangue de carneiro 5% (BAP; Becton Dickson [BD]/BBL; Sparks, MD; nº de lotes 9080650 e 9108563) a 35 °C. Os organismos de controle de qualidade (QC) de ATCC (Tabela 102) foram incluídos durante o teste de acordo com diretrizes de CLSI (3). Detalhes adicionais sobre a caracterização genética dos isolados, quando disponível, podem ser encontrados na Tabela 103.

[00642] *Meio*: caldo Mueller Hinton ajustado por cátion (CAMHB; BD; nº de lote 8190586) foi usado como o meio para teste (2, 3). Para testar daptomicina, cálcio foi suplementado com Ca^{2+} 25 mg/ml, resultando em uma concentração final de Ca^{2+} 50 mg/ml (2, 3).

[00643] *Procedimento de Ensaio de MIC*: valores de MIC foram determinados com o uso de um procedimento de microdiluição de caldo descrito por CLSI (2, 3). Manipuladores de líquidos automatizados (Multidrop 384, Labsystems, Helsinki, Finlândia; Biomek 2000 e Biomek FX, Beckman Coulter, Fullerton CA) foram usados para conduzir diluições em série e transferências de líquido.

[00644] Para preparar as placas mãe de fármaco, que forneceriam as diluições de fármaco em série para as placas filhas replicadas, os poços das colunas 2 a 12 de placas de microdiluição de 96 poços padrão (Costar 3795) foram carregados com 150 µl do diluente apropriado para cada linha de fármaco. Os artigos de teste e compostos (300 µl em 101X a concentração mais alta a ser testada) foram dispensados nos poços apropriados na coluna 1. O Biomek 2000 foi, então, usado

para produzir diluições em série de 2 vezes nas placas mãe da coluna 1 à coluna 11. Os poços da coluna 12 não continham fármaco e serviram como os poços de controle de proliferação de organismo para o ensaio.

[00645] As placas filhas foram carregadas com 190 µl por poço de RPMI com o uso do Multidrop 384. Os painéis de teste foram preparados no instrumento Biomek FX que transferiu 2 µL de solução de fármaco de cada poço de uma placa mãe para o poço correspondente de cada placa filha em uma etapa única.

[00646] Um inóculo padronizado de cada organismo de teste foi preparado por métodos de CLSI para se igualar a um padrão McFarland 0,5, seguido por uma diluição de 1:20. As placas foram, então, inoculadas com 10 µl do inóculo diluído com o uso do Biomek 2000 de concentração de fármaco baixa a alta resultando em uma concentração final de aproximadamente 5×10^5 CFU/ml.

[00647] As placas foram empilhadas em 3 a 4, cobertas com uma tampa na placa superior, colocadas em sacolas plásticas, e incubadas a 35 °C por 16 a 20 h (vancomicina foi lida por *S. aureus* após 24 h de tempo de incubação). A MIC foi registrada como a concentração mais baixa de fármaco que inibiu proliferação visível do organismo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

[00648] Conforme mostrado na Tabela 102, os resultados para BisEDT e comparadores estiveram dentro de faixas de QC estabelecidas por CLSI contra os isolados de QC de ATCC relevantes, validando, desse modo, o teste de susceptibilidade conduzido durante o estudo.

[00649] A atividade de BisEDT, MB-2B, e MB-6, contra os bacilos Gram-negativos resistentes é mostrada pelas espécies nas Tabelas 97 a 100. BisEDT manteve atividade potente com valores de MIC de 0,5 a 2 µg/ml através de isolados com a exceção de um isolado de *P. aeruginosa* (CDC 241) que teve uma MIC de 4 µg/ml (Tabela 99) e di-

versos isolados de *K. pneumoniae* com valores de MIC de 4 a 8 µg/ml (Tabela 98). A atividade de BisEDT não foi impactada por produção de β-lactamase ou resistência a aminoglicosídeos (MIC de amicacina ≥ 64 µg/ml), fluoroquinolonas (MIC de levofloxacina ≥ 2, 4, e 8 ≥ 64 para Enterobacteriaceae, *P. aeruginosa*, e *A. baumannii*, respectivamente).

[00650] Em geral, MB-6 teve valores de MIC que foram idênticos ou estiveram dentro de 2 vezes daqueles observados com BisEDT; em que exceções incluíram *K. pneumoniae* selecionados, em que valores de MIC de MB-6 foram inferiores àqueles de BisEDT. A atividade de BisEDT e MB-6 foi superior àquela de MB-2B, particularmente para *P. aeruginosa* e *A. baumannii*. Os valores de MIC observados com BisEDT, MB-2B, e MB-6 contra bacilos Gram-negativos foram comparáveis com aqueles observados em estudos anteriores (1, 4).

[00651] A atividade de BisEDT, MB-2B, e MB-6 contra VISA é mostrada na Tabela 101. BisEDT teve valores de MIC potentes de ≤ 0,06 a 0,25 µg/ml contra estes isolados. Como com bacilos Gram-negativos, a atividade de BisEDT foi comparável com aquela observada com MB-6 e foi superior àquela observada com MB-2B. Em destaque, dois dos isolados VISA (NRS 13 e 27) de NARSA tiveram valores de MIC de vancomicina de 2 µg/ml, o que indicou que, durante o teste neste estudo, os mesmos foram testados como suscetíveis à vancomicina. Os outros dois isolados com valores de MIC de vancomicina na faixa suscetível (NRS 2 e 24) são VISA heterogêneo (hVISA) para o qual os valores de MIC de vancomicina são conhecidos como variáveis. A resistência à levofloxacina e clindamicina (valores de MIC ≥ 4 µg/ml) foi observada com todos os isolados, exceto por NRS 13 e não impactou a atividade de BisEDT. Dois dos isolados também foram não suscetíveis à daptomicina (NRS 13 e 22); todos foram suscetíveis à linezolida (valores de MIC ≤ 4 µg/ml). A atividade observada com BisEDT neste estudo foi comparável àquela observada anteriormente (1, 4).

[00652] Em suma, BisEDT mostrou atividade potente contra bacilos Gram-negativos resistentes à β -lactama geneticamente caracterizados, cuja maioria foi MDR, e isolados de referência de VISA. A atividade de BisEDT não foi impactada pela resistência a β -lactamas ou qualquer outra classe avaliada neste estudo. Finalmente, a atividade de BisEDT e MB-6 foi comparável contra as bactérias avaliadas e excedeu aquela observada com MB-2B.

TABELA 97. ATIVIDADE DE BISEDT, MB-2B, MB-6 E COMPARADORES CONTRA *ESCHERICHIA COLI*

Isolado	Tipo de β -lactamase	MIC ($\mu\text{g/ml}$)							
		BisEDT	MB-2B	MB-6	CAZ	CAZ/CLAV	MEM	LVX	AMK
ATCC 35218	ESBL	1	2	1	0,12	$\leq 0,06/4$	$\leq 0,008$	$\leq 0,008$	1
MMX 5755	ESBL	1	4	2	>64	1/4	0,015	8	16
MMX 5756	ESBL	1	2	1	>64	0,5/4	$\leq 0,008$	4	64
MMX 5758	ESBL	1	4	1	16	0,25/4	$\leq 0,008$	8	1
CDC 451	KPC	1	2	1	64	16/4	1	>8	4
MMX 5745	KPC	1	4	2	32	16/4	2	8	0,5
CDC 114	ESBL/KPC	2	2	2	>64	64/4	2	4	1
ATCC BAA-2471	NDM	1	2	2	>64	>64/4	>8	>8	64
CDC 435	NDM	1	2	1	>64	>64/4	>8	>8	>64
CDC 503	ESBL/NDM	1	2	2	>64	>64/4	8	>8	>64
CDC 118	ESBL/NDM	1	4	1	>64	>64/4	0,06	8	>64

ATCC = American Type Culture Collection, MMX = Micromyx, CDC = Centro de Controle e Prevenção de Doenças,
 ESBL = β -lactamase de espectro estendido, KPC = *K. pneumoniae* carbapenemase, NDM = New Delhi metalo- β -lactamase,
 CAZ = ceftazidima, CLAV = clavulanato, MEM = meropenem, LVX = levofloxacina, AMK = amicacina

TABELA 98. ATIVIDADE DE BI-EDT, MB-2B, MB-6 E COMPARADORES CONTRA *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*

Isolado	Tipo de β -lactamase	MIC ($\mu\text{g/ml}$)							
		Bi-sEDT	MB-2B	MB-6	CAZ	CAZ/CLAV	MEM	LVX	AMK
MMX 9029	ESBL	4	2	2	4	0,12/4	0,015	0,12	0,5
CDC 112	KPC	2	4	2	>64	>64/4	>8	4	16
ATCC BAA-1705	ESBL/KPC	2	4	1	>64	>64/4	8	>8	16
CDC 113	ESBL/KPC	8	32	1	>64	>64/4	>8	4	16
CDC 115	ESBL/KPC	8	16	2	>64	>64/4	>8	>8	0,5
CDC 120	ESBL/KPC	2	4	2	>64	64/4	>8	>8	16
CDC 126	ESBL/KPC	8	32	2	4	8	4	0,015	2
CDC 129	ESBL/KPC	2	4	4	>64	>64/4	8	>8	32
CDC 135	ESBL/VIM	4	8	4	>64	>64/4	1	>8	16
CDC 138	ESBL/NDM	4	16	2	>64	>64/4	>8	>8	>64
CDC 158	ESBL/NDM/OXA	2	4	2	>64	>64/4	>8	4	2

ATCC = American Type Culture Collection, MMX = Micromyx, CDC = Centro de Controle e Prevenção de Doenças,

ESBL = β -lactamase de espectro estendido, KPC = *K. pneumoniae* carbapenemase, NDM = New Delhi metalo- β -lactamase,

VIM = metalo- β -lactamase, OXA = carbapenemases de classe D, CAZ = ceftazidima, CLAV = clavulanato, MEM = meropenem,

LVX = levofloxacina, AMK = ampicilina

TABELA 99. ATIVIDADE DE BISED, MB-2B, MB-6 E COMPARADORES CONTRA PSEUDOMONAS AERUGINOSA

Isolado	Tipo de β -lactamase	MIC ($\mu\text{g/ml}$)							
		BisEDT	MB-2B	MB-6	CAZ	CAZ/CLAV	MEM	LVX	AMK
CDC 356	KPC	1	4	1	64	64/4	>8	0,12	2
CDC 439	IMP	2	4	1	>64	>64/4	>8	8	>64
CDC 444	VIM	1	4	1	32	32/4	>8	8	>64
CDC 457	VIM	1	32	2	>64	64/4	>8	>8	2
CDC 231	KPC/OXA	2	16	2	>64	>64/4	>8	>8	8
CDC 230	VIM/OXA	0,5	4	2	64	32/4	>8	8	>64
CDC 241	IMP/OXA	4	32	8	>64	>64/4	>8	8	32
CDC 246	NDM/OXA	2	8	2	>64	>64/4	>8	>8	>64
CDC 250	NDM/OXA	2	8	2	>64	>64/4	>8	>8	>64
CDC 516	KPC/AmpC	1	4	1	64	64/4	>8	0,25	2
CDC 518	KPC/AmpC	1	4	1	32	32/4	>8	>8	16

CDC = Centro de Controle e Prevenção de Doenças, KPC = *K. pneumoniae* carbapenemase, NDM = New Delhi metalo- β -lactamase, IMP = metalo- β -lactamase, VIM = metalo- β -lactamase, OXA = carbapenemases de classe D, AmpC = cefalosporinase de classe C, CAZ = ceftazidima, CLAV = clavulanato, MEM = meropenem, LVX = levofloxacina, AMK = amicacina

TABELA 100. ATIVIDADE DE BISED, MB-2B, MB-6 E COMPARADORES CONTRA ACINETOBACTER BAUMANNII

Isolado	Tipo de β -lactamase	MIC ($\mu\text{g/ml}$)							
		BisEDT	MB-2B	MB-6	CAZ	CAZ/CLAV	MEM	LVX	AMK
NCTC 13304	OXA	0,5	>16	0,5	>64	>64/4	>8	1	0,5
CDC 307	OXA	1	32	0,5	64	64/4	8	8	>64
CDC 311	OXA	1	32	0,5	>64	>64/4	>8	2	>64
CDC 312	OXA	1	32	0,5	>64	>64/4	4	2	1
CDC 273	ESBL/OXA	1	32	0,5	64	64/4	>8	>8	>64

Isolado	Tipo de β -	MIC ($\mu\text{g/ml}$)							
		1	32	0,5	>64	>64/4	>8	8	16
CDC 274	ESBL/OXA	1	32	0,5	>64	>64/4	>8	8	16
CDC 275	ESBL/OXA	0,5	32	0,5	>64	>64/4	>8	4	>64
CDC 277	ESBL/OXA	1	>16	1	>64	>64/4	>8	8	16
CDC 284	ESBL/OXA	1	>16	1	64	16/4	>8	8	32
CDC 308	ESBL/OXA	1	32	0,5	64	64/4	8	4	>64
CDC 313	ESBL/OXA	1	32	0,5	>64	>64/4	>8	2	4

NCTC = National Collection of Type Cultures, CDC = Centro de Controle e Prevenção de Doenças, ESBL = β -lactamase de espectro estendido,

OXA = carbapenemases de classe D, CAZ = ceftazidima, CLAV = clavanato, MEM = meropenem, LVX = levofloxacina, AMK = amicacina

TABELA 101. ATIVIDADE DE BISEDT, MB-2B, MB-6 E COMPARADORES CONTRA STAPHYLOCOCCUS AUREUS INTERMEDIÁRIO DE VANCOMICINA

Isolado	MIC ($\mu\text{g/ml}$)							
	BisEDT	MB-2B	MB-6	VAN	DAP	CLI	LVX	LZD
NRS 1 (hVISA)	0,12	1	0,12	4	1	>8	4	1
NRS 2	$\leq 0,06$	0,5	$\leq 0,06$	0,5	0,25	>8	4	4
NRS 3	0,25	2	0,25	8	1	>8	>8	1
NRS 22	0,25	2	0,25	4	2	>8	8	1
NRS 4	0,25	1	0,25	4	0,5	>8	4	1
NRS 13	0,12	1	0,12	2	2	0,06	0,12	2
NRS 18	0,25	1	0,25	4	0,5	>8	4	1
NRS 24 (hVISA)	0,25	1	1	2	0,5	>8	>8	2
NRS 27	0,25	1	0,25	2	0,25	>8	8	2

NRS = Rede em Resistência Antimicrobiana em *Staphylococcus aureus*, MMX = Micromyx,

VISA = *S. aureus* intermediária de vancomicina, hVISA = *S. Aureus* intermediário de vancomicina heterogêneo, VAN = vancomicina, DAP = daptomicina, CLI = clindamicina, LVX = levofloxacina, LZD = linezolida

TABELA 102. ATIVIDADE DE BIS-EDT, MB-2B, MB-6 E COMPARADORES CONTRA ORGANISMOS DE QC DE ATCC RELEVANTES

Organismo	Isolado	MIC (µg/ml)									
		BisEDT	MB-2B	MB-6	CAZ	CAZ + CLAV	MEM	LVX	AMK		
E. coli	ATCC 25922	0,5 (0,5 a 4) ¹	2	1	0,25 (0,06 a 0,5)	0,25/4	≤0,008 (0,008 a 0,06)	≤0,008 (0,008 a 0,06)	1		
	ATCC 35218	1	2	1	0,12	≤0,06/4	≤0,008 (0,008 a 0,06)	≤0,008	1		
K. pneumoniae	ATCC BAA-1705	2	4	1	>64	>64/4	8 (8 a 64)	>8	16		
P. aeruginosa	ATCC 27853	1 (0,5 a 4)	2	1	2 (1 a 4)	2/4	0,25 (0,12 a 1)	0,5 (0,5 a 4)	2 (1 a 4)		
Organismo	Isolado	MIC (µg/ml)									
		BisEDT	MB-2B	MB-6	VAN	DAP	CLI	LVX	LZD		
S. aureus	ATCC 29213	0,12 (0,12 a 1)	1	0,12	0,5 (0,5 a 2)	0,5 (0,12 a 1)	0,25 (0,06 a 0,25)	0,06 (0,06 a 0,5)	4 (1 a 4)		

ATCC = American Type Culture Collection, CAZ = ceftazidima, CLAV = clavulanato, MEM = meropenem, LVX = levofloxacina, AMK = ampicilina, VAN = vancomicina, DAP = daptomicina, CLI = clindamicina, LVX = levofloxacina, LZD = linezolida Faixas de QC em parênteses

TABELA 103. DADOS DE CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DISPONÍVEIS EM ISOLADOS DE TESTE

Organismo	Isolado	Informações de Caracterização Genética
<i>E. coli</i>	ATCC 35218	TEM-1
	BAA-2471	NDM-1
	CDC 435	NDM
	CDC 451	KPC
	MMX 5745	KPC, TEM, DFR
	MMX 5755	SHV, TEM, OXA-1, AAD, ANT, SUL1, SUL2, GYR
	MMX 5756	SHV, TEM, OXA-9, AAD, SUL2, GYR
	MMX 5758	SHV, TEM, CTX-M-1, GYR
	CDC 503	CTX-M-15, NDM-1, OXA-181
	CDC 114	aadB, cmlA1, dfrA5, KPC-3, strA, strB, sul1, sul2, TEM-1B
	CDC 118	aac(3)-IIa, catA1, CMY-6, dfrA29, NDM-1, OmpF, OXA-2, rmtC, strA, strB, sul1, TEM-1A
<i>K. pneumoniae</i>	BAA-1705	KPC-2, TEM, SHV
	MMX 9029	CTX-M1, SHV, TEM, AAC, SUL2
	CDC 112	aac(6'), aph(3'), aph(4), catA1, cmlA1, dfrA12, KPC-3, mph(A), oqxA, oqxB, sul1, sul3
	CDC 113	aac(6')-Ib, aph(3')-Ia, aph(4)-Ia, catA1, cmlA1, dfrA12, KPC-3, mph(A), OmpK35, OmpK36, oqxA, oqxB, SHV-11, sul1, sul3
	CDC 115	aph(3')-Ia, aph(4)-Ia, catA1, cmlA1, dfrA12, KPC-3, mph(A), OmpK35, oqxA, oqxB, sul1, sul3, TEM-1A
	CDC 120	aac(6')-33, aac(6')-Ib, aadA2, aadB, aph(3')-Ia,

Organismo	Isolado	Informações de Caracterização Genética
		dfrA12, KPC-2, mph(A), OmpK35, oqxA, oqxA, oqxB, sul1, sul2, TEM-1D
	CDC 126	aac(6')lb-cr, catB3, dfrA1, fosA, KPC-2, OmpK36, oqxA, oqxA, OXA-1, sul1, TEM-1B
	CDC 129	aac(6')-lb, aadA2, aph(3')-la, catA1, dfrA12, KPC-3, mph(A), OmpK35, oqxA, oqxA, oqxB, sul1, TEM-1A
	CDC 135	aac(3)-IIa, aac(6')-lb, aph(3')-XV, catB2, dfrA14, OmpK35, oqxA, oqxA, OXA-9, SHV-12, sul1, TEM-1A, tet(D), VIM-1
	CDC 138	aadA2, ARR-3, CTX-M-15, dfrA12, dfrA14, mph(A), NDM-7, oqxA, oqxA, SHV-11, strA, strB, sul1, sul2, TEM-1B
	CDC 158	aac(3)-IId, aac(6')lb-cr, CTX-M-15, dfrA14, dfrA30, fosA, NDM-1, oqxA, oqxA, oqxB, OXA-1, strA, strB, sul2, TEM-1B, tet(B)
<i>P. aeruginosa</i>	CDC 439	IMP
	CDC 444	VIM
	CDC 457	VIM
	CDC 356	KPC
	CDC 230	aac(3)-Id, aadA2, cmlA1, dfrB5, OXA-4, OXA-50, PAO, tet(G), VIM-2
	CDC 231	aac(6')-IIc, KPC-5, OXA-2, OXA-50, PAO
	CDC 241	aac(6')-IIc, aadA7, catB7, IMP-1, OXA-101, OXA-50, OXA-9, PAO, sul1
	CDC 246	aadB, NDM-1, OXA-10, OXA-50, PAO, rmtD2, tet(G), VEB-1

Organismo	Isolado	Informações de Caracterização Genética
	CDC 250	aadB, NDM-1, OXA-10, OXA-50, PAO, rmtD2, tet(G), VEB-1
	CDC 516	PDC-101; KPC-2
	CDC 518	PDC-103; KPC-2
<i>A.baumannii</i>	NCTC 13304	OXA-27
	CDC 273	aac(3)-IIa, ADC-25, aph(3')-Ic, aph(3')-VIa, OXA-23, OXA-66, strA, strB, sul2
	CDC 274	aac(3)-Ia, ADC-25, aph(3')-Ic, OXA-66, OXA-72, strA, strB, sul1, sul2, TEM-1D
	CDC 275	ADC-25, aph(3')-Ic, armA, mph(E), msr(E), OXA-23, OXA-66, strA, strB, sul2, TEM-1D
	CDC 277	aac(3)-IIa, OXA-24, OXA-65, strA, strB, sul2, TEM-1B
	CDC 284	aac(3)-IIa, OXA-24, OXA-65, strA, strB, sul2, TEM-1B
	CDC 307	ADC-25, aph(3')-Ic, armA, catB8, mph(E), msr(E), OXA-23, OXA-66, strA, strB, sul1, sul2
	CDC 308	ADC-25, armA, catB8, mph(E), msr(E), OXA-71, strA, strB, sul1, TEM-1D
	CDC 311	ADC-25, aph(3')-Ic, armA, catB8, mph(E), msr(E), OXA-23, OXA-82, strA, strB, sul1
	CDC 312	aph(3')-Ic, catA1, OXA-69, sul2, tet(B)
	CDC 313	aac(3)-Ia, aph(3')-Ic, catA1, OXA-23, OXA-69, TEM-1D, tet(A)

REFERÊNCIAS

- [00653] 1.) Beckman E, Wolfe C, Pillar C. *In vitro* Activity of Bismuth Thiols and Comparators Against Drug Resistant Gram-positive and -negative Bacteria and Yeast. Relatório Final 24-08-2016- Microbion 22. Micromyx, Kalamazoo, MI. 2016.
- [00654] 2.) Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; 11^a edição* Padrão CLSI M07. CLSI, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pensilvânia 19087 EUA, 2018.
- [00655] 3.) CLSI. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; 29^a ed.* CLSI suplemento M100. CLSI, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pensilvânia 19087 EUA, 2019.
- [00656] 4.) Schaadt RD, Peterson M, Sweeney D. *In vitro* Activity of Bismuth-1,2-ethanedithiol (BisEDT) Against Multiple Clinical Isolates of Gram-positive and -negative Bacteria. Relatório Final 08-08-2008- Microbion 2. Micromyx, Kalamazoo, MI. 2008.

EXEMPLO 13: TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE DE TRÊS COMPOSTOS DE TESTE CONTRA LEVEDURA (*CANDIDA* SPP.) E MOFO (*ASPERGILLUS* SPP.)

INTRODUÇÃO

[00657] A atividade *in vitro* de BisEDT e dois agentes investigativos de bismuto-tiol adicionais (MB-2B e MB-6) foi determinada para *Candida* spp. (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, e *C. auris*) e *Aspergillus* spp. (*A. niger*, *A. terreus*, *A. fumigatus* e *A. flavus*). Comparadores incluíram anfotericina B, fluconazol, voriconazol, caspofungina e micafungina. A susceptibilidade foi determinada por microdiluição de caldo conduzida de acordo com diretrizes do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI; 2,3).

MATERIAL E MÉTODOS

[00658] *Compostos de Teste:* Os agentes de teste BisEDT (MB-1-

B3; nº de lote ED268-1-11-01), MB-2B, e MB-6 foram transportados e armazenados à temperatura ambiente, no escuro, até serem ensaiados. O solvente e o diluente para os agentes de teste foi DMSO (Sigma; St. Louis, MO; nº de lote SHBB9319V) e a concentração de estoque preparada foi 6,464 µg/ml (101X a concentração de teste final para levedura e fungos). Fármacos comparadores são mostrados na Tabela 104 abaixo:

TABELA 104: FÁRMACOS COMPARADORES

Fármaco Comparador	Fornecedor	Nº de Lote	Solvente/Diluente	Concentração de Estoque de Trabalho (µg/ml)
Anfotericina B	Sigma	086M4012V	DMSO	6.464
Fluconazol	USP	H11308	DMSO	6.464
Caspofungina	Sigma	086M4750V	DMSO	808
Micafungina	Astellas	023070	DMSO	808
Voriconazol	USP	R032E0	DMSO	808

[00659] Os compostos de teste de Microbion, anfotericina B, e fluconazol foram avaliados por uma faixa de concentração de 0,06 a 64 µg/ml para levedura e mofo. Caspofungina, micafungina, e voriconazol foram testados de 0,008 a 8 µg/ml.

[00660] *Organismos:* Os organismos de teste consistiram em isolados clínicos do repositório Micromyx (MMX) e cepas de referência do American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA). Os organismos de teste foram mantidos congelados a -80 °C. Antes do teste, levedura foi subcultivada em Ágar Dextrose Sabouraud (Becton, Dickinson and Company; Sparks, MD; nº de lote 9032625, 9074672) a 35 °C. Os mofos foram obtidos de estoques fúngicos numerados anteriormente preparados em Micromyx e armazenados em uma solução salina de Tween 0,1%, a 4 °C, até o uso. *C. krusei* ATCC 6258, *C. parapsilosis* ATCC 22019, *A. fumigatus* ATCC MYA-3626, e *A. flavus* ATCC 204304 foram incluídos com propósitos de controle de qualidade (4, 5).

[00661] *Meio*: O meio empregado para o teste dos isolados de levedura e mofo foi RPMI 1640 de Hyclone Laboratories (Logan, UT; nº de lote AC10257966A) tamponado com MOPS de EMD Millipore (Burlington, MA; nº de lote 3173588) (2, 3).

[00662] *Procedimentos de Ensaio de MIC*: valores de MIC foram determinados com o uso de um procedimento de microdiluição de caldo descrito por CLSI (2, 3). Manipuladores de líquidos automatizados (Multidrop 384, Labsystems, Helsinki, Finlândia; Biomek 2000 e Biomek FX, Beckman Coulter, Fullerton CA) foram usados para conduzir diluições em série e transferências de líquido.

[00663] Para preparar as placas mãe de fármaco, que forneceriam as diluições de fármaco em série para as placas filhas replicadas, os poços das colunas 2 a 12 de placas de microdiluição de 96 poços padrão (Costar 3795) foram carregados com 150 µl de DMSO para cada linha de fármaco. Os artigos de teste e os compostos comparadores (300 µl em 101X a concentração mais alta a ser testada) foram dispensados nos poços apropriados na coluna 1. O Biomek 2000 foi, então, usado para produzir diluições em série de 2 vezes nas placas mãe da coluna 1 até a coluna 11. Os poços da coluna 12 não continham fármaco e serviram como os poços de controle de proliferação de organismo para o ensaio.

[00664] As placas filhas foram carregadas com 190 µl por poço de RPMI com o uso do Multidrop 384. As placas filhas foram preparadas no instrumento Biomek FX que transferiu 2 µl de solução de fármaco de cada poço de uma placa mãe para o poço correspondente de cada placa filha em uma única etapa.

[00665] Um inóculo padronizado de cada organismo foi preparado por métodos de CLSI (2, 3). Para a levedura, as colônias foram coletadas da placa de estrias e uma suspensão foi preparada em solução salina para se igualar a um padrão McFarland 0,5. Esta suspensão foi

diluída 1:100 em RPMI resultando em uma concentração final de aproximadamente $0,5$ a $2,5 \times 10^3$ CFU/ml no ensaio. Para os mofos, com base na contagem de esporo determinada (CFU/ml) de uma suspensão de esporo de cada isolado de *Aspergillus* spp., a suspensão foi diluída em RPMI de modo que uma concentração final de aproximadamente $0,2 - 2,5 \times 10^4$ CFU/ml fosse alcançada no ensaio. O inóculo para cada organismo foi dispensado em reservatórios esterilizados divididos por comprimento (Beckman Coulter), e o Biomek 2000 foi usado para inocular as placas. As placas filhas foram colocadas na superfície de trabalho Biomek 2000 invertidas de modo que a inoculação tenha ocorrido de concentração de fármaco baixa a alta. O Biomek 2000 distribuiu 10 µl de inóculo padronizado em cada poço. DMSO esteve presente em uma concentração final de 1% nos poços de teste.

[00666] As placas foram empilhadas em quatro, cobertas com uma tampa na placa superior, colocada em bolsas de plástico, e incubadas a 35 °C. Os isolados de *Candida* spp. e *Aspergillus* foram lidos após uma incubação de 24 h e novamente em 48 h.

[00667] As microplacas foram visualizadas do fundo com o uso de um visualizador de placa. Para cada placa mãe, uma placa de controle de solubilidade não inoculada foi observada para evidência de precipitação de fármaco. Para levedura, a MIC₀ foi relatada como a concentração mais baixa de fármaco que inibiu completamente a proliferação visível do organismo para artigos de teste de Microbion, anfotericina B, e voriconazol; a concentração mais baixa que mostrou 50% de inibição em relação ao controle de proliferação foi relatada como a MIC₂ para todos os artigos de teste de Microbion, micafungina, caspofungina e fluconazol. Para mofos, valores de MIC foram relatados como a concentração mais baixa na qual a proliferação visível foi inibida, e concentrações eficazes mínimas (MECs) foram relatadas para caspofungina, micafungina e os agentes de teste de Microbion como a concen-

tração mais baixa em que a proliferação deslocou para uma forma hifal pequena, redonda, compacta no fundo do poço em comparação com a proliferação hifal vista ao longo do meio no poço de controle de proliferação. MECs foram apenas relatadas quando observadas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

[00668] Conforme mostrado na Tabela 110, os resultados para BisEDT e comparadores estiveram dentro de faixas de QC estabelecidas por CLSI contra os isolados de QC de ATCC relevantes com a exceção de anfotericina B em 48 h contra *C. krusei* ATCC 6258. Neste caso, anfotericina B esteve dentro da faixa QC em 24 h para o mesmo isolado e esteve dentro da faixa de QC em 48 h para *C. parapsilosis* ATCC 22019, *A. flavus* ATCC 204304, e *A. fumigatus* MYA-3626. Estes resultados validam o teste de susceptibilidade conduzido durante o estudo.

[00669] A atividade de BisEDT, MB-2B, e MB-6, contra levedura é mostrada por espécie nas Tabelas 105 a 108. BisEDT manteve atividade potente com 50% de inibição (valores de MIC₂) observada de 0,25 a 1 µg/ml através de espécies e 100% de inibição (valores de MIC₀) observada de 0,5 a 2 µg/ml para todas as espécies, exceto *C. albicans*, em que valores de MIC₀ foram 1 a 8 µg/ml. A atividade de BisEDT não foi impactada por resistência a equinocandina ou agentes antifúngicos de azol e foi notavelmente mantida contra *C. auris* para o qual a multirresistência e a resistência a azol é particularmente um problema (6). A atividade de MB-2B e MB-6 foi similar àquela de BisEDT, com valores de MIC idênticos ou dentro de 2 vezes aqueles de BisEDT. Os valores de MIC observados com BisEDT, MB-2B, e MB-6 contra levedura foram comparáveis com aqueles observados em um estudo anterior (1).

[00670] A atividade de BisEDT, MB-2B, e MB-6 contra *Aspergillus* spp. é mostrada na Tabela 109. Em geral, BisEDT resultou em inibição

completa em 24 h com valores de MIC₀ de 2 a 8 µg/ml para a maioria dos isolados. Entretanto, nenhuma inibição completa foi observada com *A. flavus* MMX 7935 (MIC₀ de >64 µg/ml), e uma MIC₀ de 0,5 µg/ml foi observada contra *A. terreus* MMX 8229. Após 48 h de incubação, a inibição completa por BisEDT foi menos comumente observado através dos isolados testados, mas em casos e que os valores de MIC₀ não foram evidentes, os valores de MEC foram evidentes e estes valores foram tipicamente consistentes com os valores de MIC₀ relatados em 24 h. Como com levedura, a atividade de BisEDT foi comparável com aquela observada com MB-2B e MB-6. A atividade observada entre os comparadores contra o *Aspergillus* spp. foi tipicamente mais potente do que BisEDT, MB-2B, e MB-6 com a exceção de fluconazol que, conforme esperado, foi inativo.

[00671] Em suma, BisEDT mostrou atividade potente tanto contra *Candida* spp., incluindo o *C. auris* notoriamente difícil de tratar, e *Aspergillus* spp. A atividade de BisEDT contra levedura não foi impactada por resistência a azol ou equinocandina. Finalmente, a atividade de BisEDT, MB-2B, e MB-6 foi comparável contra a levedura e mofo avaliados.

TABELA 105. ATIVIDADE DE BISEDIT, MB-2B, MB-6 E COMPARADORES CONTRA CANDIDA ALBICANS

Nº de Isolado		Tipo		Agente de teste e atividade (µg/ml) em 24 h											
		BisEDT		MB-2B		MB-6		AMP B	FLU	VORI	CASP	MICA			
		MIC ₂	MIC ₀	MIC ₂	MIC ₀	MIC ₂	MIC ₀	MIC ₀	MIC ₂	MIC ₂	MIC ₂	MIC ₂			
ATCC 90028	Suscetível	0,5	4	0,5	2	0,5	2	0,25	0,25	≤0,008	0,06	0,03			
ATCC 204276	MICA-R	0,5	1	0,5	1	1 ^a	1	0,25	0,25	≤0,008	0,25	4			
ATCC MYA-2732	FLU-R, VORI-I	1	2	1	2	1	2	0,25	16	0,5	0,06	0,03			
MMX 7067	FLU-R, VORI-R	1	2	0,5	1	0,5	1	0,25	>64	>8	0,06	0,03			
MMX 7424	CASP-R, MICA-R	1	4	1	2	1	2	0,25	0,5	≤0,008	8	4			
MMX 7053	Suscetível	0,5	1	0,5	1	0,5	1	0,12	0,12	≤0,008	0,06	0,06			
MMX 7445	FLU-R, VORI-R	1	8	1	2	1	2	0,12	>64	>8	0,06 ^a	0,03			
MMX 7430	Suscetível	1	8	0,5	1	0,25	0,5	0,25	0,5	≤0,008	0,06	0,03			
MMX 7437	FLU-I	1	8	1	2	1	2	0,25	4	0,12	0,06	0,03			
MMX 7403	Suscetível	0,5	2	0,5	2	0,25	2	0,25	1	≤0,008	0,06	0,03			

MIC₂ = 50% de inibição, MIC₀ = inibição completa, AMP B = anfotericina B, FLU = fluconazol, VORI = voriconazol,

CASP = caspofungina, MICA =

micalfungina, I = intermediário, R = resistente

^a proliferação insuficiente em 24 h para determinar ponto final inibidor de 50%, resultado após 48 h de incubação relatada

*não há pontos de interrupção de CLSI de AMP B para levedura (4)

TABELA 106. ATIVIDADE DE BISEDIT, MB-2B, MB-6 E COMPARADORES CONTRA CANDIDA GLABRATA

Nº de Isolado	Tipo	Agente de teste e atividade (µg/ml)									
		BisEDT			MB-2B		MB-6		AMP B	FLU	VORI
		MIC ₂	MIC ₀	MIC ₂	MIC ₂	MIC ₀	MIC ₂	MIC ₀	MIC ₀	MIC ₂	MIC ₂
ATCC 90030	Suscetível	0,5	1	0,5	1	1	0,5	1	0,25	8	0,12
ATCC MYA-2950	Suscetível	0,5	1	0,5	1	1	0,5	1	0,12	8	0,12
MMX 7103	CASP-R, MICA-R	0,5	1	0,5	1	1	0,5	1	0,25	4	0,12
MMX 7307	CASP-R, MICA-R, FLU-R	0,5	1	0,5	1	1	0,5	1	0,25	>64	4
MMX 7285	CASP-R, MICA-R	0,25	0,5	0,25	0,5	0,5	0,25	0,5	0,25	32	1
MMX 7093	FLU-R	0,5	1	0,5	1	1	1	2	0,25	64	2
MMX 7101	FLU-R	0,5	1	0,5	1	1	0,5	1	0,25	64	2
MMX 7087	Suscetível	0,5	1	0,5	1	1	0,5	1	0,12	1	0,03
MMX 7549	Suscetível	0,5 ^a	0,5	0,5	1	1	0,5	1	0,25	4	0,06
MMX 7111	Suscetível	0,5	1	0,5	1	1	0,5	1	0,25	2	0,06

MIC₂ = 50% de inibição, MIC₀ = inibição completa, AMP B = anfotericina B, FLU = fluconazol, VORI = voriconazol, CASP = caspofungina, MICA =

micalfungina, I = intermediário, R = resistente

*não há pontos de interrupção de CLSI de AMP B para levedura e não há pontos de interrupção de VORI para *C. glabrata* (4)

TABELA 107. ATIVIDADE DE BISETD, MB-2B, MB-6 E COMPARADORES CONTRA CANDIDA KRUSEI

Nº de Isolado	Tipo	Agente de teste e atividade (µg/ml)										
		BiSETD		MB-2B		MB-6		AMP B	FLU	VORI	CASP	MICA
		MIC ₂	MIC ₀	MIC ₂	MIC ₀	MIC ₂	MIC ₀					
ATCC 14243	Suscetível	0,5	1	1	2	0,5	1	0,25	16	0,06	0,012	0,25
ATCC 6258	MICA-I	0,5	1	1	2	0,5	1	0,5	16	0,12	0,25	0,5
MMX 7125	Suscetível	0,5	1	1	2	0,5	1	0,5	32	0,25	0,25	0,25
MMX 7128	Suscetível	0,5	1	1	2	1	2	0,5	16	0,12	0,25	0,25
MMX 7141	Suscetível	0,5	1	1	2	1	2	0,25	16	0,12	0,25	0,25
MMX 7153	MICA-R	0,5	1	1	2	0,5	1	0,5	32	0,25	0,25	1
MMX 7155	Suscetível	0,5	1	1	2	0,5	1	0,25	32	0,25	0,25	0,25
MMX 7563	Suscetível	0,5	1	1	2	0,5	1	0,5	32	0,25	0,12	0,25
ATCC 96685	Suscetível	0,25	0,5	0,25	0,5	0,25	0,5	0,5	32	0,5	0,12	0,25
MMX 9878	MICA-I, VORI-I	0,5	1	0,5	1	0,5	1	0,5	64	1	0,25	0,5

MIC₂ = 50% de inibição, MIC₀ = inibição completa, AMP B = anfotericina B, FLU = fluconazol, VORI = voriconazol,

CASP = caspofungina, MICA =

micafungina, I = intermediário, R = resistente

*não há pontos de interrupção de CLSI de AMP B para levedura e não há pontos de interrupção de FLU para *C. krusei* (4)

TABELA 108. ATIVIDADE DE BISEDIT, MB-2B, MB-6 E COMPARADORES CONTRA CANDIDA AURIS

Nº de Isolado	Tipo	Agente de teste e atividade (µg/ml)											
		BisEDT		MB-2B		MB-6		AMP B		FLU	VORI	CASP	MICA
		MIC ₂	MIC ₀	MIC ₂	MIC ₀	MIC ₂	MIC ₀	MIC ₀	MIC ₀				
MMX 9862	Suscetível	0,5	2	0,5	1	0,5	1	0,25	1	2	0,03	0,12	0,12
MMX 9863	FLU-R, VORI-R ^c	1 ^a	1	1 ^a	1	1	1	0,12	2	>64	>8	0,12 ^b	0,5
MMX 9864	FLU-R, VORI-R	0,5	1	1 ^a	1	1 ^a	1	0,25	1	>64	2	0,25 ^b	0,5
MMX 9865	FLU-R, VORI-R	1 ^a	1	1 ^a	1	1	1	0,25	2	>64	8	0,25 ^b	0,25
MMX 9866	FLU-R, VORI-R	1	2	1 ^a	1	1	1	0,5	2	>64	8	0,12 ^b	0,5
MMX 9867	FLU-R, VORI-R	1	2	1	2	1	1	0,5	2	>64	8	0,12	0,5
MMX 9868	FLU-R, VORI-R	1 ^b	1 ^a	NA	1	1	4	0,25	4	>64	>8	0,25	0,25
MMX 9869	FLU-R, VORI-R	1 ^b	2	1	2	1	4	1	4	>64	2	0,25	0,25
MMX 9870	FLU-R, VORI-R	1	2	1	2	1	2	1	2	>64	4	0,25	0,5
MMX 9871	Suscetível	1 ^a	1	1 ^a	1	1	2	1	2	>64	1	0,25 ^b	0,5

MIC₂ = 50% de inibição, MIC₀ = inibição completa, AMP B = anfotericina B, FLU = fluconazol, VORI = voriconazol,

CASP = caspofungina, MICA =

micafungina, Azol-R = resistente a azol, ND = não determinado (nenhuma MIC₂ foi evidente)

^a proliferação insuficiente em 24 h para determinar ponto final inibidor de 50%, resultado após 48 h de incubação relacionada

^b efeito eagle observado (ponto final de MIC₂ claro, mas a proliferação repetida em concentrações de teste mais altas potencialmente devido à resistência induzível ou precipitação de composto in vitro)

^c com base nos pontos de interrupção publicados por Lockhart *et al.*, 2017 (6); pontos de interrupção de CLSI não foram estabelecidos para *C. auris*

TABELA 109. ATIVIDADE DE BISEDIT, MB-2B, MB-6 E COMPARADORES CONTRA ASPERGILLUS SPP.

Organismo	Nº de Isolado	Agente de teste e atividade (µg/ml)								
		BisEDT	MB-2B	MB-6	AMP B	FLU	VORI	CASP	MICA	
		MIC ₀ 24/48 h	MIC ₀ 24/48 h	MIC ₀ 24/48 h	MIC ₀	MIC ₂	MIC ₀	MEC	MEC	
<i>A. fumigatus</i>	ATCC MYA-3626	4/8	4/8	2/4	1	>64	0,5	0,06	0,03	
	ATCC 204305	8/8 ^a	4/8 ^a	8/4 ^a	1	>64	0,5	0,25	0,25	
	MMX 5934	4/8 ^a	8/8 ^a	2/4 ^a	1	>64	0,25	0,12	0,06	
	MMX 5938	-/2 ^b	-/2 ^b	-/1 ^b	1	>64	0,25	0,12 ^b	≤0,008 ^b	
	MMX 5939	4/8 ^a	4/8 ^a	2/4 ^a	1	>64	2	0,12	0,06	

Organismo	Nº de Isolado	Agente de teste e atividade (µg/ml)							
A. flavus	ATCC 204304	4/8 ^a	4/4 ^a	4/4 ^a	1	>64	2	0,06	0,12
	ATCC 22546	2/4	1/2	1/2	1	>64	1	0,06	≤0,008
	MMX 7935	>64/8 ^a	32/4 ^a	8/8	1	>64	0,5	0,03	≤0,008
A. niger	ATCC 29508	-/2 ^b	-/2 ^b	-/2 ^b	0,25	>64	0,5	0,06 ^b	≤0,008 ^b
A. terreus	MMX 8229	0,5/1	0,5/1	0,25/1	0,25	>64	0,25	0,12 ^b	≤0,008 ^b

MIC₀ = inibição completa, MEC = concentração eficaz mínima, AMP B = anfotericina B, FLU = fluconazol, VORI = voriconazol, CASP =

caspofungina, MICA = micafungina

^a resultado mostrado em 48 h é a MEC, inibição completa (MIC₀) não observada neste ponto no tempo

^b resultado relatado para apenas 48 h, proliferação insuficiente para 24 h de leitura

* não há pontos de interrupção de CLSI para *Aspergillus* spp. (5)

TABELA 110. ATIVIDADE DE BIS-EDT, MB-2B, MB-6 E COMPARADORES CONTRA ORGANISMOS DE QC DE ATCC RELEVANTES

Organismo	Agente de Teste	Faixa de QC 24 h	Faixa de QC 48 h	MIC 24 h	MIC 48 h
<i>E. coli</i> ATCC 25922	BisEDT	0,5 a 4	-	0,5 ^a	-
	MB-2B	-	-	2 ^a	-
	MB-6	-	-	0,5 ^a	-
	Anfotericina B	-	-	>64	-
	Fluconazol	-	-	>64	-
	Voriconazol	-	-	>64	-
	Caspofungina	-	-	>64	-
	Micafungina	-	-	>64	-
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	BisEDT	0,12 a 1	-	0,5 ^a	-
	MB-2B	-	-	1 ^a	-
	MB-6	-	-	1 ^a	-
	Anfotericina B	-	-	>64	-
	Fluconazol	-	-	>64	-
	Voriconazol	-	-	>64	-
	Caspofungina	-	-	>64	-
	Micafungina	-	-	>64	-
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	BisEDT	-	-	0,5/1 ^b	1/2 ^b
	MB-2B	-	-	1/2 ^b	1/2 ^b
	MB-6	-	-	1/2 ^b	1/4 ^b
	Anfotericina B	0,25 a 2	0,5 a 4	0,5	0,5
	Fluconazol	0,5 a 4	1 a 4	1	2
	Voriconazol	0,015 a 0,12	0,03 a 0,25	0,12	0,12
	Caspofungina	0,25 a 1	0,5 a 4	0,25	0,5
	Micafungina	0,5 a 2	0,5 a 4	0,5	2
<i>C. krusei</i>	BisEDT	-	-	0,5/1 ^b	1/2 ^b

Organismo	Agente de Teste	Faixa de QC 24 h	Faixa de QC 48 h	MIC 24 h	MIC 48 h
ATCC 6258	MB-2B	-	-	1/2 ^b	1/4 ^b
	MB-6	-	-	0,5/1 ^b	1/4 ^b
	Anfotericina B	0,5 a 2	1 a 4	0,5	0,5
	Fluconazol	8 a 64	16 a 128	16	32
	Voriconazol	0,06 a 0,5	0,12 a 1	0,12	0,5
	Caspofungina	0,12 a 1	0,25 a 2	0,25	0,25
	Micafungina	0,12 a 0,5	0,12 a 0,5	0,5	0,5
A. <i>flavus</i> ATCC 204304	BisEDT	-	-	4	8 ^c
	MB-2B	-	-	4	8 ^c
	MB-6	-	-	4	4 ^c
	Anfotericina B	-	0,5 a 4	0,5	1
	Fluconazol	-	-	>64	>64
	Voriconazol	-	0,5 a 4	0,12	2
	Caspofungina	-	-	0,12 (MEC)	0,06 (MEC)
	Micafungina	-	-	0,06 (MEC)	0,008 (MEC)
A. <i>fumigatus</i> ATCC MYA- 3626	BisEDT	-	-	4	8
	MB-2B	-	-	4	8
	MB-6	-	-	2	4
	Anfotericina B	-	0,5 a 4	0,5	1
	Fluconazol	-	-	>64	>64
	Voriconazol	-	0,25 a 1	0,25	0,5
	Caspofungina	-	-	0,06 (MEC)	0,06 (MEC)
	Micafungina	-	-	0,03 (MEC)	0,008 (MEC)

REFERÊNCIAS:

- [00672] 1.) Beckman E, Wolfe C, Pillar C. *In vitro* Activity of Bismuth Thiols and Comparators Against Drug Resistant Gram-positive and -negative Bacteria and Yeast. Relatório Final 24-08-2016- Microbion 22. Micromyx, Kalamazoo, MI. 2016.
- [00673] 2.) Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts*. 4ª edição CLSI padrão M27. CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pensilvânia 19087-1898 EUA, 2017.
- [00674] 3.) CLSI. *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi; Padrão Aprovado*. 3ª edição CLSI padrão M38. CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pensilvânia 19087-1898 EUA, 2017.
- [00675] 4.) CLSI. *Performance Standards for Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts*. 1ª edição CLSI suplemento M60. CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pensilvânia 19087-1898 EUA, 2017.
- [00676] 5.) CLSI. *Performance Standards for Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi; Padrão Aprovado*. 1ª edição CLSI suplemento M61. CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pensilvânia 19087-1898 EUA, 2017.
- [00677] 6.) Lockhart SR, Etienne KA, Vallabhaneni S, Farooqi J, Chowdhary A, Govender N, *et al.* Simultaneous Emergence of Multi-drug-Resistant *Candida auris* on 3 Continents Confirmed by Whole-Genome Sequencing and Epidemiological Analyses. Clin Infect Dis 2017;64:134 a 140.

EXEMPLO 14: ESTUDOS NAS CONDIÇÕES DE PROCESSAMENTO EM DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO DE PARTÍCULA DE BISED T

[00678] Foi observado que o controle cuidadoso da temperatura de reação e a taxa de adição de 1,2-etanoditiol teve impacto pronunciado na distribuição de tamanho de partícula de BisEDT. As sínteses repre-

sentativas são mostradas abaixo para BisEDT sintetizado a 20 °C com uma adição de 1,25 horas de 1,2-etano por meio de bomba de seringa e BisEDt sintetizado a 15 °C com uma adição de 1 hora de 1,2-etano por meio de bomba de seringa. A Tabela 111 abaixo mostra que as condições de temperatura têm uma função crítica na distribuição de tamanho de partícula, com temperaturas de processamento na faixa de 20 a 30 °C que fornecem distribuição de tamanho de partícula de BisEDT que é tanto pequeno quanto uniforme em tamanho de partícula (como um D90 abaixo de 2 microns).

[00679] **Síntese representativa de BisEDT a 20 °C com adição de 1,25 horas de tiol por meio de bomba de seringa, e tecido de polipropileno para filtração** A síntese de BisEDT foi realizada em escala de 10 g. Um reator revestido de 1 l foi carregado com água USP (480 ml, 48 vol), seguido por HNO₃ 70% (34 ml, 3,4 vol). Uma solução de subnitrato de bismuto (10 g, 6,84 mmols) em água (43 ml, 4,3 vol) e HNO₃ 70% (14 ml, 1,4 vol) foi adicionada a 20 °C. A mistura de reação foi resfriada a 15 °C para adição de etanol 95%. O etanol 95% (180 ml, 18 vol) foi, então, lentamente adicionado. (A adição de etanol é exotérmica, a temperatura alcançou 22 °C). A temperatura foi, então, ajustada de volta para 20 °C. Isto foi seguido por adição por gotejamento de 1,2-etanoditiol (4,3 ml, 7,5 mmols em etanol 95% em 94 ml, 9,4 vol) por um período de 1,25 horas com a temperatura de lote a 20 °C durante o qual o mesmo se tornou uma suspensão amarela. A reação foi agitada a 20 °C de um dia para o outro. A mistura de reação foi filtrada através de tecido de polipropileno e lavada com etanol 95% (45 ml, 4,5 vol). O bolo úmido foi carregado novamente para o reator e convertido em pasta fluida em etanol 95% (380 ml, 38 vol) por duas horas a 20 °C. A suspensão foi, então, filtrada (mesmo tecido) e lavada com etanol 95% (30 ml, 3 vol). O bolo úmido foi novamente convertido em pasta fluida em EtOH 95% (170 ml, 17 vol) a 20 °C, filtrado (mes-

mo pano), e lavado com etanol 95% (30 ml, 3 vol). O bolo úmido foi, então, convertido em pasta fluida em acetona (170 ml, 17 vol) a 20 °C de um dia para o outro, seguido por filtração (mesmo tecido) e lavagem de acetona (20 ml, 2 vol). O tratamento com acetona (170 ml, 17 vol) foi repetido nos sólidos e agitado por 2 horas. A suspensão foi filtrada (mesmo tecido) e lavada com acetona (30 ml, 3 vol) e secada a 45 °C e secada a 45 °C (18 horas) para fornecer sólido amarelo canário (10,81 g, 91,0%).

[00680] **Síntese representativa de BisEDT a 15 °C com 1 hora de adição de tiol por meio de bomba de seringa, e tecido de polipropileno para filtração:** A síntese de BisEDT foi realizada em uma escala de 10 g, o perfil de temperatura foi estudado com registrador de dados. Etano ditiol foi adicionado a 15 °C por 1 hora por meio de bomba de seringa e a filtração foi realizada com o uso de tecido de filtro de PP. Um reator revestido de 1 l foi carregado com água USP (480 ml, 48 vol) e resfriado a 15 °C, seguido por HNO₃ 70% (34 ml, 3,4 vol). Uma solução de subnitrato de bismuto (10 g, 6,84 mmols) em água (43 ml, 4,3 vol) e HNO₃ 70% (14 ml, 1,4 vol) foi adicionada na mesma temperatura. O etanol 95% (180 ml, 18 vol) foi, então, lentamente adicionado. (A adição de etanol é exotérmica, a temperatura alcançou 22,5 °C). Permitiu-se, então, que o mesmo se resfriasse a 15 °C. Isto foi seguido por adição por gotejamento de 1,2-etanoditiol (4,3 ml, 7,5 mmols em etanol 95% em 94 ml, 9,4 vol) por uma hora com a temperatura de lote a 15 °C. Permitiu-se que a reação fosse agitada a 15 °C de um dia para o outro. A mistura de reação foi filtrada através de tecido de polipropileno e lavada com etanol 95% (45 ml, 4,5 vol). O bolo úmido foi carregado novamente para o reator e convertido em pasta fluida em etanol 95% (380 ml, 38 vol) por duas horas a 20 °C. A suspensão foi, então, filtrada (mesmo tecido) e lavada com etanol 95% (30 ml, 3 vol). O bolo úmido foi novamente convertido em pasta fluida

em EtOH 95% (170 ml, 17 vol) a 20 °C, filtrado (mesmo pano), e lavado com etanol 95% (30 ml, 3 vol). O bolo úmido foi, então, convertido em pasta fluida em acetona (170 ml, 17 vol) a 20 °C de um dia para o outro, seguido por filtração (mesmo tecido) e lavagem de acetona (20 ml, 2 vol). O tratamento com acetona (170 ml, 17 vol) foi repetido nos sólidos e agitado por 2 horas. A suspensão foi filtrada (mesmo tecido) e lavada com acetona (30 ml, 3 vol) e secada a 45 °C (18 horas) para fornecer sólido amarelo canário (10,43 g, 87,8%).

TABELA 111: DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO DE PARTÍCULA DE AMOSTRAS DE BISEDT

Amostra	D(10) μm	D(50) μm	D(90) μm	D[4,3] μm	Condições
1	0,80	2,4	5,9	2,9	Condições de Síntese de Dalton
2	0,58	1,7	3,9	2,0	Condições de Síntese de Dalton
3	0,59	1,9	4,5	2,3	30 °C, 5 h de adição de 1,2-etanoditiol por meio de funil de adição
4	0,44	1,48	3,1	1,7	30 °C, 4 horas de adição de 1,2-etanoditiol por meio de bomba de seringa
5	0,33	0,72	1,6	0,86	20 °C, 1 h de adição de 1,2-etanoditiol por meio de funil de adição
6	0,34	0,87	1,8	0,98	20 °C, 4 h de adição de 1,2-etanoditiol por meio de funil de adição
7	0,39	1,3	1,6	1,4	20 °C, 1 hora de adição de 1,2-etanoditiol por meio de bomba de seringa. Amostra convertida em pasta fluida em EtOH. Filtração de tecido
8	0,36	1,0	1,8	1,0	20 °C, 1 hora de adição de 1,2-etanoditiol por meio de bomba de seringa. Amostra convertida

Amostra	D(10) μm	D(50) μm	D(90) μm	D[4,3] μm	Condições
					em pasta fluida em MeOH. Filtração de tecido
9	0,67	1,0	1,9	1,1	20 °C, 1 hora de adição de 1,2-etanoditiol por meio de bomba de seringa. Amostra convertida em pasta fluida em MeOH Abs.. Filtração de tecido
10	0,36	0,88	1,7	0,97	20 °C, 1 hora de adição de 1,2-etanoditiol por meio de bomba de seringa. Amostra convertida em pasta fluida em IPA. Filtração de tecido
11	0,38	1,2	2,4	1,4	15 °C, 1,5 hora de adição de 1,2-etanoditiol por meio de bomba de seringa. Filtração de tecido
12	0,37	1,2	2,4	1,3	20 °C, 1,25 horas de adição de 1,2-etano por meio de bomba de seringa
13	0,36	0,98	2,1	1,2	10 °C, 1 h de adição de 1,2-etanoditiol por meio de bomba de seringa
14	0,36	1,0	2,1	1,2	10 °C, 1 hora de adição de 1,2-etanoditiol por meio de bomba de seringa. Filtração de tecido
15	0,32	0,72	1,6	0,86	10 °C, 4 horas de adição de 1,2-etanoditiol por meio de bomba de seringa. Filtração de tecido.

INCORPORAÇÃO POR REFERÊNCIA

[00681] Todas as publicações e patentes mencionadas no presente documento são incorporadas ao presente documento a título de referência, como se cada publicação individual ou patente fosse específica e individualmente indicada para ser incorporada a título de referência.

No caso de conflito, o presente pedido, incluindo quaisquer definições no presente documento, prevalecerá.

EQUIVALENTES

[00682] Embora modalidades específicas da presente invenção tenham sido discutidas, o relatório descritivo acima é ilustrativo e não restritivo. Muitas variações da invenção se tornarão evidentes para aqueles versados na técnica mediante revisão deste relatório descritivo e as reivindicações abaixo. O escopo completo da invenção deve ser determinado a título de referência às reivindicações, juntamente com seu escopo completo de equivalentes, e o relatório descritivo, juntamente com tais variações.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para tratar, gerir ou atenuar a gravidade de sintomas de fibrose cística (CF) e infecções em um indivíduo, caracterizado pelo fato de que compreende administrar ao indivíduo uma composição de bismuto-tiol (BT) que compreende pelo menos um composto de BT

2. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o indivíduo tem pelo menos uma infecção pulmonar.

3. Método, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que o indivíduo tem pelo menos duas infecções pulmonares e as infecções são ou simultâneas ou estão em ordem sucessiva.

4. Método, de acordo com a reivindicação 2 ou 3, caracterizado pelo fato de que a infecção pulmonar é em um pulmão.

5. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 2 a 4, caracterizado pelo fato de que a infecção pulmonar ocorre em ambos os pulmões.

6. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 2 a 5, caracterizado pelo fato de que a infecção pulmonar ocorre em um ou mais dentre os três lóbulos do pulmão direito.

7. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 2 a 6, caracterizado pelo fato de que a infecção pulmonar é em um ou ambos os lóbulos do pulmão esquerdo.

8. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 2 a 7, caracterizado pelo fato de que a infecção pulmonar é infecção por bronquiectasia, pneumonia, febre do vale, aspergilose broncopulmonar alérgica (ABPA), pneumonia associada à ventilação mecânica, pneumonia adquirida em hospital, pneumonia adquirida na comunidade, traqueobronquite associada à ventilação mecânica, infecção do trato respiratório inferior, Mycobacteria não tuberculosa, antraz, legionelose, coqueluche, bronquite, bronquiolite, infecção associada à

DPOC e pós-transplante pulmonar.

9. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 2 a 8, caracterizado pelo fato de que a infecção pulmonar contém um ou mais patógenos bacterianos e/ou fúngicos.

10. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 2 a 9, caracterizado pelo fato de que a infecção pulmonar é uma infecção pulmonar relacionada à CF.

11. Método, de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que compreende o tratamento da infecção pulmonar relacionada à CF.

12. Método, de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que compreende gerir a infecção pulmonar relacionada à CF.

13. Método, de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que compreende atenuar a gravidade da infecção pulmonar relacionada à CF.

14. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 2 a 13, caracterizado pelo fato de que a infecção pulmonar está localizada na mucosa pulmonar, nos brônquios, nos alvéolos, nos macrófagos e/ou nos bronquíolos, ou sobre os mesmos.

15. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 2 a 13, caracterizado pelo fato de que a infecção pulmonar está localizada na superfície de ou dentro de um biofilme bacteriano, bactérias agregadas, um biofilme fúngico, um biofilme multiespécies ou multifilo combinado composto por ambos bactérias e fungos, ou fungos agregados.

16. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 2 a 13, caracterizado pelo fato de que a infecção pulmonar está localizada no esputo.

17. Método, de acordo com qualquer uma das reivindica-

ções 9 a 16, caracterizado pelo fato de que o patógeno bacteriano compreende uma ou mais bactérias gram-positivas e/ou bactérias gram-negativas.

18. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 9 a 17, caracterizado pelo fato de que o patógeno bacteriano compreende um ou mais dentre um biofilme bacteriano e/ou bactérias planctônicas.

19. Método, de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo fato de que compreende pelo menos um dentre: (i) reduzir o biofilme bacteriano, (ii) impedir o crescimento do biofilme bacteriano, (iii) prevenir a formação inicial do biofilme bacteriano, e/ou (iv) prevenir a reforma do biofilme bacteriano.

20. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 9 a 16, caracterizado pelo fato de que o patógeno fúngico compreende fungos planctônicos e/ou fungos de biofilme.

21. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 9 a 20, caracterizado pelo fato de que a composição de BT trata, gere ou atenua a gravidade da infecção pulmonar por meio de um ou ambos os seguintes:

- prevenir a infecção por patógeno bacteriano ou patógeno fúngico; e
- reduzir o patógeno bacteriano ou fúngico; e/ou
- reduzir a viscosidade do esputo.

22. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 9 a 20, caracterizado pelo fato de que a composição de BT trata, gere ou atenua a gravidade da infecção pulmonar por um ou mais dentre:

- prevenir a elaboração ou secreção de exotoxinas contra patógeno bacteriano ou fúngico;
- inibir a viabilidade celular ou crescimento celular de célu-

las planctônicas do patógeno bacteriano ou fúngico;

- inibir a formação de biofilme pelo patógeno bacteriano ou fúngico;

- inibir a invasividade do biofilme em tecidos pulmonares;

- inibir a patogenicidade de biofilme em tecidos pulmonares;

e

- inibir a viabilidade de biofilme ou crescimento de biofilme de células de formação de biofilme do patógeno bacteriano ou fúngico.

23. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 9 a 22, caracterizado pelo fato de que um ou mais patógenos são selecionados dentre *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus lugdunensis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus milleri/anginosus*, *Streptococcus pyogenes*, *Mycobacterium non tuberculosis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Burkholderia spp.*, *Achromobacter xylosoxidans*, *Pandoraea sputorum*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Alcaligenes xylosoxidans*, *Haemophilus pittmaniae*, *Serratia marcescens*, *Candida albicans*, *Candida albicans resistente a fármacos*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida guilliermondii*, *Candida auris*, *Candida tropicalis*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Morganella morganii*, *Inquilinus limosus*, *Ralstonia mannitolilytica*, *Pandoraea apista*, *Pandoraea pnomenusa*, *Pandoraea sputorum*, *Bdellovibrio bacteriovorus*, *Bordetella bronchiseptica*, *Vampirovibrio chlorellavorus*, *Acrinobacter baumannii*, *Cupriavidus metallidurans*, *Cupriavidus pauculus*, *Cupriavidus respiraculi*, *Delftia acidivorans*, *Exophiala dermatitidis*, *Herbaspirillum frisingense*, *Herbaspirillum seropedicae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pandoraea norimbergensis*, *Pandoraea pulmonicola*, *Pseudomonas mendocina*, *Pseudomonas pseudoalcaligenes*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas stutzeri*, *Ralstonia insidiosa*, *Ralstonia pickettii*, *Neisseria gonorrhoeae*, *E. coli* NDM-1 po-

sitiva, *Enterobacter cloaca*, *E. faecium* resistente à vancomicina, *E. faecalis* resistente à vancomicina, *E. faecium*, *E. faecalis*, *S. agalactiae* resistente à clindamicina, *S. agalactiae*, *Bacteroides fragilis*, *Clostridium difficile*, *Streptococcus pneumonia*, *Moraxella catarrhalis*, *Haemophilus haemolyticus*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Chlamydophila pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Atopobium*, *Sphingomonas*, *Saccharibacteria*, *Leptotrichia*, *Capnocytophaga*, *Oribacterium*, *Aquabacterium*, *Lachnoanaerobaculum*, *Campylobacter*, *Acinetobacter*, *Agrobacterium*; *Bordetella*; *Brevundimonas*; *Chryseobacterium*; *Delftia*; *Enterobacter*; *Klebsiella*; *Pandoraea*; *Pseudomonas*; *Ralstonia* e *Prevotella*.

24. Método, de acordo com a reivindicação 23, caracterizado pelo fato de que a micobactéria não tuberculosa é selecionada dentre *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium gordonae*, *Mycobacterium kansasii*, complexo *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium marinum*, *Mycobacterium terrae* e *Mycobacterium chelonii*.

25. Método, de acordo com a reivindicação 23, caracterizado pelo fato de que *Burkholderia spp.* é selecionada dentre *Burkholderia cepacia*, complexo *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia multivorans*, *Burkholderia cenocepacia*, *Burkholderia stabilis*, *Burkholderia vietnamiensis*, *Burkholderia dolosa*, *Burkholderia ambifaria*, *Burkholderia anthina*, *Burkholderia pyrrocinia*, *Burkholderia gladioli*, *Burkholderia uboensis*, *Burkholderia arboris*, *Burkholderia latens*, *Burkholderia lata*, *Burkholderia metallica*, *Burkholderia seminalis*, *Burkholderia contaminans* e *Burkholderia diffusa*.

26. Método, de acordo com a reivindicação 23, caracterizado pelo fato de que um ou mais patógenos são selecionados dentre *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas aeruginosa* resistente a um único fármaco, *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente a fármaco,

Staphylococcus aureus, *Staphylococcus aureus* resistente a um único fármaco, *Staphylococcus aureus* multirresistente a fármacos, *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina, *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium avium*, *Haemophilus influenzae*, *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia multivorans*, *Burkholderia cenocepacia*, *Burkholderia dolosa*, *Achromobacter xylosoxidans*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Staphylococcus epidermidis* e *Burkholderia vietnamiensis*.

27. Método, de acordo com a reivindicação 23, caracterizado pelo fato de que um ou mais patógenos são selecionados dentre *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*.

28. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 18, 19 e 22, caracterizado pelo fato de que um ou mais patógenos são selecionados dentre biofilmes de *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cenocepacia*, complexo de *Burkholderia cepacia*, *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium avium*, *Achromobacter spp.*, *Staphylococcus epidermidis*, *Stenotrophomonas maltophilia* e *Staphylococcus aureus*.

29. Método, de acordo com a reivindicação 27, caracterizado pelo fato de que *Pseudomonas aeruginosa* e/ou *Staphylococcus aureus* são multirresistentes a fármaco.

30. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 9 a 29, caracterizado pelo fato de que um ou mais patógenos exibem resistência ou são refratários a um antibiótico selecionado dentre amicacina, aztreonam, meticilina, vancomicina, nafcilina, gentamicina, ampicilina, cloranfenicol, doxiciclina, colistina, delamanid, preto-manida, clofazimina, bedaquilina e tobramicina.

31. Método, de acordo com a reivindicação 30, caracterizado pelo fato de que o antibiótico é amicacina ou tobramicina.

32. Método, de acordo com a reivindicação 30, caracteriza-

do pelo fato de que o patógeno bacteriano é *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina.

33. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 32, caracterizado pelo fato de que compreende adicionalmente coadministrar ao indivíduo um antibiótico selecionado dentre amicacina, tobramicina, gentamicina, piperacilina, mezlocilina, ticarcilina, imipenem, ciprofloxacina, ceftazidima, aztreonam, ticarcilina-clavulato, dicloxacilina, amoxicilina, trimetoprim-sulfametoxazol, cefalexina, piperacilina-tazobactam, linezolida, daptomicina, vancomicina, metronidazol, clindamicina, colistina, tetraciclina, levofloxacina, amoxicilina e ácido clavulânico (Augmentin®), cloxacilina, dicloxacilina, cefdinir, cefprozil, cefaclor, cefuroxima, eritromicina/sulfisoxazol, eritromicina, claritromicina, azitromicina, doxiciclina, minociclina, tigeciclina, imipenem, meropenem, colistimetato/colistina®, meticilina, oxacilina, nafcilina, carbenicilina, azlocilina, piperacilina e tazobactam (Zosyn®), cefepima, etambutol, rifampicina e meropenem.

34. Método, de acordo com a reivindicação 33, caracterizado pelo fato de que o antibiótico é selecionado dentre meropenem, ceftazidima, tobramicina, amicacina, aztreonam, ciprofloxacina, colistina e levofloxacina.

35. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 9 a 22, caracterizado pelo fato de que fungo patogênico é *Candida albicans*, *Candida albicans* resistente a fármaco, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida guilliermondii*, *Candida auris*, *Candida tropicalis*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus fumigatus* e/ou *Aspergillus flavus*.

36. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 35, caracterizado pelo fato de que compreende administrar a composição de BT por meio de inalação, por via oral ou nasal, com o uso de um dispositivo de aerossol.

37. Método, de acordo com a reivindicação 36, caracterizado pelo fato de que o dispositivo de aerossol é um nebulizador.

38. Método, de acordo com a reivindicação 36 ou 37, caracterizado pelo fato de que a composição de BT está na forma de uma solução aquosa, suspensão aquosa ou pó seco.

39. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 38, caracterizado pelo fato de que a composição de BT é administrada por via tópica ao tecido pulmonar.

40. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 39, caracterizado pelo fato de que

a composição de BT é administrada com uma dosagem de aproximadamente 0,25 mg/ml a aproximadamente 15 mg/ml, de aproximadamente 0,4 mg/ml a aproximadamente 15 mg/ml, de aproximadamente 0,6 mg/ml a aproximadamente 15 mg/ml, de aproximadamente 0,6 mg/ml a aproximadamente 100 mg/ml, de aproximadamente 5 mg/ml a aproximadamente 100 mg/ml, de aproximadamente 10 mg/ml a aproximadamente 100 mg/ml, de aproximadamente 25 mg/ml a aproximadamente 100 mg/ml, de aproximadamente 50 mg/ml a aproximadamente 100 mg/ml, de aproximadamente 0,8 mg/ml a aproximadamente 15 mg/ml, de aproximadamente 1 mg/ml a aproximadamente 10 mg/ml, de 2,5 mg/ml a aproximadamente 10 mg/ml, de aproximadamente 4 mg/ml a aproximadamente 10 mg/ml, de aproximadamente 5 mg/ml a aproximadamente 10 mg/ml, de aproximadamente 6 mg/ml a aproximadamente 10 mg/ml, 0,6 mg/ml a aproximadamente 6 mg/ml, de aproximadamente 4 mg/ml a aproximadamente 15 mg/ml, de aproximadamente 6 mg/ml a aproximadamente 15 mg/ml, de aproximadamente 50 µg/ml a aproximadamente 750 µg/ml, de aproximadamente 75 µg/ml a aproximadamente 500 µg/ml, de aproximadamente 100 µg/ml a aproximadamente 250 µg/ml, de aproximadamente 100 µg/ml a aproximadamente 150 µg/ml ou de aproximadamente 75 µg/ml a

aproximadamente 150 µg/ml; e/ou

a quantidade total da composição de BT administrada aos pulmões é de aproximadamente 0,25 mg a aproximadamente 15 mg, de aproximadamente 0,4 mg a aproximadamente 15 mg, de aproximadamente 0,6 mg a aproximadamente 15 mg, de aproximadamente 0,8 mg a aproximadamente 15 mg, de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 10 mg, de 2,5 mg a aproximadamente 10 mg, de aproximadamente 4 mg a aproximadamente 10 mg, de aproximadamente 5 mg a aproximadamente 10 mg, de aproximadamente 6 mg a aproximadamente 10 mg, 0,6 mg a aproximadamente 6 mg, de aproximadamente 4 mg a aproximadamente 15 mg, de aproximadamente 6 mg a aproximadamente 15 mg, de aproximadamente 50 µg a aproximadamente 750 µg, de aproximadamente 75 µg a aproximadamente 500 µg, de aproximadamente 100 µg a aproximadamente 250 µg, de aproximadamente 100 µg a aproximadamente 150 µg ou de aproximadamente 75 µg a aproximadamente 150 µg.

41. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 40, caracterizado pelo fato de que a composição de BT é administrada como uma dosagem de aproximadamente 0,6 mg/ml a aproximadamente 6 mg/ml.

42. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 41, caracterizado pelo fato de que a composição de BT é administrada três vezes ao dia, duas vezes ao dia, uma vez ao dia, a cada dois dias, uma vez a cada três dias, uma vez por semana, uma vez a cada duas semanas, uma vez por mês ou uma vez a cada dois meses.

43. Método, de acordo com a reivindicação 42, caracterizado pelo fato de que a composição de BT é administrada uma vez por semana.

44. Método, de acordo com qualquer uma das reivindica-

ções 1 a 43, caracterizado pelo fato de que um ou mais dentre os seguintes sintomas de fibrose cística têm a gravidade atenuada no indivíduo: tosse, respiração ofegante, falta de ar, bronquiectasia, pólipos nasais, hemoptise, insuficiência respiratória e exacerbação pulmonar.

45. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 44, caracterizado pelo fato de que a composição de bismuto-tiol compreende uma pluralidade de micropartículas que compreendem um composto de bismuto-tiol (BT), em que substancialmente todas as ditas micropartículas têm um diâmetro volumétrico médio de aproximadamente 0,4 μm a aproximadamente 5 μm , e em que o composto de BT compreende bismuto ou um sal de bismuto e um composto que contém tiol.

46. Método, de acordo com a reivindicação 45, caracterizado pelo fato de que pelo menos 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 90% ou 95% das micropartículas têm um diâmetro volumétrico médio de aproximadamente 0,4 μm a aproximadamente 3 μm , ou de aproximadamente 0,5 μm a aproximadamente 2 μm , ou de aproximadamente 0,7 μm a aproximadamente 2 μm , ou de aproximadamente 0,8 μm a aproximadamente 1,8 μm , ou de aproximadamente 0,8 μm a aproximadamente 1,6 μm , ou de aproximadamente 0,9 μm a aproximadamente 1,4 μm , ou de aproximadamente 1,0 μm a aproximadamente 2,0 μm , ou de aproximadamente 1,0 μm a aproximadamente 1,8 μm .

47. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 45 e 46, caracterizado pelo fato de que o sal de bismuto é nitrato de bismuto, subnitrato de bismuto ou cloreto de bismuto.

48. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 45 e 46, caracterizado pelo fato de que o composto que contém tiol compreende um ou mais agentes selecionados dentre 1,2-etanoditiol, 2,3-dimercaptopropanol, piritiona, ditioeritritol, 3,4 dimercaptotolueno, 2,3-butanoditiol, 1,3-propanoditiol, 2-hidroxiopropanotiol, 1-

mercapto-2-propanol, ditioeritritol, ditiotretol, cisteamina e ácido alfa-lipoico.

49. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 45 a 48, caracterizado pelo fato de que a composição de BT compreende um ou mais compostos de BT selecionados dentre BisBAL, BisEDT, Bis-dimercaprol, BisDTT, Bis-2-mercaptoetanol, BisDTE, Bis-Pyr, Bis-Ery, Bis-Tol, Bis-BDT, Bis-PDT, Bis-Pyr/Bal, Bis-Pyr/BDT, BisPyr/EDT, Bis-Pyr/PDT, Bis-Pyr/Tol, Bis-Pyr/Ery, bismuto-1-mercapto-2-propanol, BisEDT/CSTMN (1:1), BisPYR/CSTMN (1:1), BisBAL/CSTMN (1:1), BisTOL/CSTMN (1:1) e Bis-EDT/2-hidróxi-1-propanotiol.

50. Método, de acordo com a reivindicação 49, caracterizado pelo fato de que o composto de BT é selecionado dentre um ou mais de Bis-EDT, Bis-Bal, Bis-Pyr, Bis-Ery, Bis-Tol, Bis-BDT ou Bis-EDT / 2- hidróxi-1-propano tiol.

51. Método, de acordo com a reivindicação 50, caracterizado pelo fato de que o composto de BT é BisEDT.

52. Método, de acordo com a reivindicação 50, caracterizado pelo fato de que o composto de BT é BisBDT ou BisBAL.

53. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 52, caracterizado pelo fato de que a quantidade total da composição de BT administrada à região profunda do pulmão é de aproximadamente 0,25 mg a aproximadamente 15 mg, de aproximadamente 0,4 mg a aproximadamente 15 mg, de aproximadamente 0,6 mg a aproximadamente 15 mg, de aproximadamente 0,8 mg a aproximadamente 15 mg, de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 10 mg, de 2,5 mg a aproximadamente 10 mg, de aproximadamente 4 mg a aproximadamente 10 mg, de aproximadamente 5 mg a aproximadamente 10 mg, de aproximadamente 6 mg a aproximadamente 10 mg, 0,6 mg a aproximadamente 6 mg, de aproximadamente 4 mg a apro-

ximadamente 15 mg, de aproximadamente 6 mg a aproximadamente 15 mg, de aproximadamente 50 µg a aproximadamente 750 µg, de aproximadamente 75 µg a aproximadamente 500 µg, de aproximadamente 100 µg a aproximadamente 250 µg, de aproximadamente 100 µg a aproximadamente 150 µg, ou de aproximadamente 75 µg a aproximadamente 150 µg.

54. Método, de acordo com a reivindicação 53, caracterizado pelo fato de que a região profunda do pulmão são os alvéolos pulmonares profundos.

55. Aerossol caracterizado pelo fato de que compreende uma pluralidade de gotículas líquidas dispersas em um gás, sendo que as referidas gotículas líquidas compreendem uma composição de BT que compreende pelo menos um composto de BT suspenso na mesma, em que o composto de BT compreende bismuto e/ou um sal de bismuto e um composto que contém tiol; e

em que pelo menos 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 90% ou 95% das gotículas líquidas têm um diâmetro aerodinâmico mediano de massa (MMAD) de aproximadamente 0,4 µm a aproximadamente 5 µm.

56. Aerossol, de acordo com a reivindicação 55, caracterizado pelo fato de que as gotículas líquidas têm um MMAD de aproximadamente 0,4 µm a aproximadamente 7 µm, ou de aproximadamente 0,5 µm a aproximadamente 5 µm, ou de aproximadamente 0,7 µm a aproximadamente 4 µm, ou de aproximadamente 0,7 µm a aproximadamente 3,5 µm, ou de aproximadamente 0,8 µm a aproximadamente 3,5 µm, ou de aproximadamente 0,9 µm a aproximadamente 3,5 µm, ou de aproximadamente 0,9 µm a aproximadamente 3 µm, ou de aproximadamente 0,8 µm a aproximadamente 1,8 µm, ou de aproximadamente 0,8 µm a aproximadamente 1,6 µm, ou de aproximadamente 0,9 µm a aproximadamente 1,4 µm, ou de aproximadamente 1,0 µm a

aproximadamente 2,0 μm , ou de aproximadamente 1,0 μm a aproximadamente 1,8 μm .

57. Aerossol, de acordo com a reivindicação 56, caracterizado pelo fato de que as gotículas líquidas têm um MMAD de aproximadamente 0,8 μm a aproximadamente 1,6 μm , ou de aproximadamente 0,9 μm a aproximadamente 3,5 μm , ou de aproximadamente 0,9 μm a aproximadamente 3 μm , ou de aproximadamente 0,9 μm a aproximadamente 1,4 μm , ou de aproximadamente 1,0 μm a aproximadamente 2,0 μm , ou de aproximadamente 1,0 μm a aproximadamente 1,8 μm .

58. Aerossol, de acordo com qualquer uma das reivindicações 55 a 57, caracterizado pelo fato de que a pluralidade de gotículas líquidas tem um D90 inferior a aproximadamente 5 μm .

59. Aerossol, de acordo com a reivindicação 58, caracterizado pelo fato de que a pluralidade de gotículas líquidas tem um D90 inferior a aproximadamente 3 μm .

60. Aerossol, de acordo com qualquer uma das reivindicações 55 a 59, caracterizado pelo fato de que a pluralidade de gotículas líquidas é dispersa em uma fase de gás contínua.

61. Aerossol, de acordo com qualquer uma das reivindicações 55 a 60, caracterizado pelo fato de que o composto de BT compreende bismuto e/ou um sal de bismuto associado de maneira covalente e/ou em um complexo de coordenação com um ou mais compostos que contêm tiol.

62. Aerossol, de acordo com qualquer uma das reivindicações 55 a 61, caracterizado pelo fato de que o sal de bismuto é nitrato de bismuto, subnitrato de bismuto ou cloreto de bismuto.

63. Aerossol, de acordo com qualquer uma das reivindicações 55 a 62, caracterizado pelo fato de que o composto que contém tiol compreende um ou mais agentes selecionados dentre 1,2-etano

ditio, 2,3-dimercaptopropanol, piritona, ditioeritritol, 3,4 dimercaptotolueno, 2,3- butanoditio, 1,3-propanoditio, 2-hidroxipropanotio, 1-mercapto-2-propanol, ditioeritritol, ditiotreitio, cisteamina e ácido alfa-lipoico.

64. Aerossol, de acordo com qualquer uma das reivindicações 55 a 63, caracterizado pelo fato de que a composição de BT compreende um ou mais compostos de BT selecionados dentre Bis-BAL, BisEDT, Bis-dimercaprol, BisDTT, Bis-2-mercaptoetanol, Bis-DTE, Bis-Pyr, Bis-Ery, Bis-Tol, Bis-BDT, Bis-PDT, Bis-Pyr/Bal, Bis-Pyr/BDT, BisPyr/EDT, Bis-Pyr/PDT, Bis-Pyr/Tol, Bis-Pyr/Ery, bismuto-1-mercapto-2-propanol, BisEDT/CSTMN (1:1), BisPYR/CSTMN (1:1), BisBAL/CSTMN (1:1), BisTOL/CSTMN (1:1) e Bis-EDT/2-hidróxi-1-propanotio.

65. Aerossol, de acordo com a reivindicação 64, caracterizado pelo fato de que o composto de BT é selecionado dentre um ou mais de Bis-EDT, Bis-Bal, Bis-Pyr, Bis-Ery, Bis-Tol, Bis-BDT ou Bis-EDT/2-hidróxi-1-propanotio.

66. Aerossol, de acordo com a reivindicação 65, caracterizado pelo fato de que o composto de BT é BisEDT.

67. Aerossol, de acordo com a reivindicação 55, caracterizado pelo fato de que o diâmetro aerodinâmico mediano de massa (MMAD) é determinado pelo tempo de voo do laser e/ou do impactador em cascata.

68. Aerossol, de acordo com qualquer uma das reivindicações 55 a 67, caracterizado pelo fato de que o composto de BT está suspenso na gotícula de líquido.

69. Aerossol, de acordo com a reivindicação 68, caracterizado pelo fato de que o composto de BT é BisEDT.

70. Aerossol, de acordo com qualquer uma das reivindicações 55 a 69, caracterizado pelo fato de que as gotículas compreen-

dem adicionalmente Tween 80 (por exemplo, de aproximadamente 0,05% a aproximadamente 1%) e opcionalmente

um tampão (por exemplo, fosfato de sódio ou citrato de sódio) a um pH de aproximadamente 7,4; e/ou

cloreto de sódio.

71. Aerossol, de acordo com qualquer uma das reivindicações 55 a 70, caracterizado pelo fato de que, caso depositados na região profunda do pulmão, os compostos de BT têm uma meia-vida média de pelo menos 2 dias.

72. Aerossol, de acordo com a reivindicação 71, caracterizado pelo fato de que, caso depositados na região profunda do pulmão, os compostos de BT têm uma meia-vida média de pelo menos 4 dias.

73. Método para tratar, gerir ou atenuar a gravidade dos sintomas de fibrose cística (CF) e infecções em um indivíduo, caracterizado pelo fato de que compreende administrar ao indivíduo uma composição de bismuto-tiol (BT) que compreende pelo menos um composto de BT, em que a composição é uma suspensão de micropartículas que têm um diâmetro volumétrico médio (VMD) de aproximadamente 0,4 μm a aproximadamente 5 μm e/ou um diâmetro aerodinâmico mediano de massa (MMAD) de aproximadamente 0,4 μm a aproximadamente 5 μm .

74. Método, de acordo com a reivindicação 73, caracterizado pelo fato de que o composto de BT é BisEDT.

75. Método, de acordo com a reivindicação 74, caracterizado pelo fato de que a composição de BT compreende BisEDT a uma concentração superior a aproximadamente 0,1 mg/ml, Tween 80® a aproximadamente 0,05% a aproximadamente 1,0%, cloreto de sódio a aproximadamente 0,05 a 40 mM e, opcionalmente, fosfato de sódio a aproximadamente 2 a 20 mM a aproximadamente pH 7,4.

76. Método, de acordo com a reivindicação 75, caracterizado pelo fato de que a composição de BT compreende BisEDT a uma concentração superior a aproximadamente 0,25 mg/ml, Tween 80® aproximadamente 0,5%, cloreto de sódio a aproximadamente 10 mM e fosfato de sódio a aproximadamente 10 mM a aproximadamente pH 7,4.

77. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 73 a 76, caracterizado pelo fato de que quando a composição de BT é submetida à aerossolização, em que as gotículas líquidas submetidas à aerossolização têm um MMAD de aproximadamente 0,4 μm a aproximadamente 5 μm .

78. Método, de acordo com a reivindicação 77, caracterizado pelo fato de que pelo menos 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 90% ou 95% das gotículas líquidas têm um MMAD de aproximadamente 0,4 μm a aproximadamente 7 μm , ou de aproximadamente 0,5 μm a aproximadamente 5 μm , ou de aproximadamente 0,7 μm a aproximadamente 4 μm , ou de aproximadamente 0,7 μm a aproximadamente 3,5 μm , ou de aproximadamente 0,8 μm a aproximadamente 3,5 μm , ou de aproximadamente 0,9 μm a aproximadamente 3,5 μm , ou de aproximadamente 0,9 μm a aproximadamente 3 μm , ou de aproximadamente 0,8 μm a aproximadamente 1,8 μm , ou de aproximadamente 0,8 μm a aproximadamente 1,6 μm , ou de aproximadamente 0,9 μm a aproximadamente 1,4 μm , ou de aproximadamente 1,0 μm a aproximadamente 2,0 μm , ou de aproximadamente 1,0 μm a aproximadamente 1,8 μm .

79. Método, de acordo com a reivindicação 78, caracterizado pelo fato de que as gotículas líquidas têm um MMAD de aproximadamente 0,8 μm a aproximadamente 1,6 μm , ou de aproximadamente 0,9 μm a aproximadamente 3,5 μm , ou de aproximadamente 0,9 μm a

aproximadamente 3 μm , ou de aproximadamente 0,9 μm a aproximadamente 1,4 μm , ou de aproximadamente 1,0 μm a aproximadamente 2,0 μm , ou de aproximadamente 1,0 μm a aproximadamente 1,8 μm .

80. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 77 a 79, caracterizado pelo fato de que a pluralidade de gotículas líquidas tem um D90 inferior a aproximadamente 3 μm .

81. Método, de acordo com a reivindicação 80, caracterizado pelo fato de que a pluralidade de gotículas líquidas tem um D90 inferior a aproximadamente 2 μm .

82. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 77 a 81, caracterizado pelo fato de que a pluralidade de gotículas líquidas é dispersa em uma fase gasosa contínua.

83. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 77 a 82, caracterizado pelo fato de que o composto de BT compreende bismuto e/ou um sal de bismuto associado de maneira covalente e/ou em um complexo de coordenação com um ou mais compostos que contêm tiol.

84. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 77 a 83, caracterizado pelo fato de que o sal de bismuto é nitrato de bismuto, subnitrato de bismuto ou cloreto de bismuto.

85. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 77 a 84, caracterizado pelo fato de que o composto que contém tiol compreende um ou mais agentes selecionados dentre 1,2-etanoditiol, 2,3-dimercaptopropanol, piritiona, ditioeritritol, 3,4 dimercaptotolueno, 2,3-butanoditiol, 1,3-propanoditiol, 2-hidroxipropanotiol, 1-mercapto-2-propanol, ditioeritritol, ditiotreitol, cisteamina e ácido alfa-lipoico.

86. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 77 a 85, caracterizado pelo fato de que a composição de BT compreende um ou mais compostos de BT selecionados dentre Bis-

BAL, BisEDT, Bis-dimercaprol, BisDTT, Bis-2-mercaptoetanol, Bis-DTE, Bis-Pyr, Bis-Ery, Bis-Tol, Bis-BDT, Bis-PDT, Bis-Pyr/Bal, Bis-Pyr/BDT, BisPyr/EDT, Bis-Pyr/PDT, Bis-Pyr/Tol, Bis-Pyr/Ery, bismuto-1-mercapto-2-propanol, BisEDT/CSTMN (1:1), BisPYR/CSTMN (1:1), BisBAL/CSTMN (1:1), BisTOL/CSTMN (1:1) e Bis-EDT/2-hidróxi-1-propanotiol.

87. Método, de acordo com a reivindicação 86, caracterizado pelo fato de que o composto de BT é selecionado dentre um ou mais de Bis-EDT, Bis-Bal, Bis-Pyr, Bis-Ery, Bis-Tol, Bis-BDT ou Bis-EDT/2- hidróxi-1-propano tiol.

88. Método, de acordo com a reivindicação 87, caracterizado pelo fato de que o composto de BT é BisEDT.

89. Método, de acordo com a reivindicação 87, caracterizado pelo fato de que o composto de BT é BisBDT ou BisBAL.

90. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 77 a 89, caracterizado pelo fato de que a quantidade total da composição de BT administrada à região profunda do pulmão é de aproximadamente 0,25 mg a aproximadamente 15 mg, de aproximadamente 0,4 mg a aproximadamente 15 mg, de aproximadamente 0,6 mg a aproximadamente 15 mg, de aproximadamente 0,8 mg a aproximadamente 15 mg, de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 10 mg, de 2,5 mg a aproximadamente 10 mg, de aproximadamente 4 mg a aproximadamente 10 mg, de aproximadamente 5 mg a aproximadamente 10 mg, de aproximadamente 6 mg a aproximadamente 10 mg, 0,6 mg a aproximadamente 6 mg, de aproximadamente 4 mg a aproximadamente 15 mg, de aproximadamente 6 mg a aproximadamente 15 mg, de aproximadamente 50 µg a aproximadamente 750 µg, de aproximadamente 75 µg a aproximadamente 500 µg, de aproximadamente 100 µg a aproximadamente 250 µg, de aproximadamente 100 µg a aproximadamente 150 µg, ou de aproximadamente 75 µg a apro-

ximadamente 150 µg.

91. Método, de acordo com a reivindicação 90, caracterizado pelo fato de que a região profunda do pulmão são os alvéolos pulmonares profundos.

92. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 77 a 91, caracterizado pelo fato de que a quantidade total da composição de BT que compreende BisEDT administrado aos alvéolos pulmonares profundos é de aproximadamente 0,6 mg a aproximadamente 6 mg.

93. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 77 a 92, caracterizado pelo fato de que a composição é submetida à aerossolização por meio de um nebulizador.

94. Método, de acordo com a reivindicação 93, caracterizado pelo fato de que o nebulizador é um nebulizador de jato.

95. Método, de acordo com a reivindicação 94, caracterizado pelo fato de que o nebulizador de jato é um nebulizador de jato Pari LC Plus ou nebulizador de jato Pari LC SPRINT.

96. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 93 a 95, caracterizado pelo fato de que o nebulizador tem uma pressão de entrada de aproximadamente 0,07 a aproximadamente 0,28 MPa (aproximadamente 10 a aproximadamente 40 psig).

97. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 93 a 96, caracterizado pelo fato de que o fluxo de entrada é de aproximadamente 3 l/min a aproximadamente 8 l/min.

98. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 93 a 97, caracterizado pelo fato de que o fluxo de ar de exaustão é de aproximadamente 3 l/min a aproximadamente 8 l/min.

99. Método para tratar, gerir ou atenuar a gravidade dos sintomas e infecções associados a uma ou mais doenças pulmonares ou infecções em um indivíduo, caracterizado pelo fato de que compre-

ende administrar ao indivíduo uma composição de bismuto-tiol (BT) que compreende pelo menos um composto de BT.

100. Método, de acordo com a reivindicação 99, caracterizado pelo fato de que uma ou mais doenças pulmonares ou infecções não são o resultado de fibrose cística ou não estão associadas à mesma.

101. Método, de acordo com a reivindicação 99 ou 100, caracterizado pelo fato de que o indivíduo tem pelo menos uma infecção pulmonar e, caso tenha duas ou mais infecções pulmonares, as infecções são ou simultâneas ou estão em ordem sucessiva.

102. Método, de acordo com a reivindicação 100 ou 101, caracterizado pelo fato de que a infecção pulmonar é em um pulmão.

103. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 100 a 102, caracterizado pelo fato de que a infecção pulmonar ocorre em ambos os pulmões.

104. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 100 a 103, caracterizado pelo fato de que a infecção pulmonar está em um ou mais dentre os três lóbulos do pulmão direito.

105. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 100 a 104, caracterizado pelo fato de que a infecção pulmonar ocorre em um ou em ambos os lóbulos do pulmão esquerdo.

106. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 100 a 105, caracterizado pelo fato de que a infecção pulmonar é infecção por bronquiectasia, pneumonia, febre do vale, aspergilose broncopulmonar alérgica (ABPA), pneumonia associada à ventilação mecânica, pneumonia adquirida em hospital, pneumonia adquirida na comunidade, traqueobronquite associada à ventilação mecânica, infecção do trato respiratório inferior, Mycobacteria não tuberculosas, antraz, legionelose, coqueluche, bronquite, bronquiolite, infecção associada à DPOC e pós-transplante pulmonar.

107. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 100 a 106, caracterizado pelo fato de que a infecção pulmonar contém um ou mais patógenos bacterianos ou fúngicos.

108. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 101 a 107, caracterizado pelo fato de que a infecção pulmonar é uma infecção pulmonar relacionada à CF.

109. Método, de acordo com a reivindicação 108, caracterizado pelo fato de que compreende o tratamento da infecção pulmonar relacionada à CF.

110. Método, de acordo com a reivindicação 108, caracterizado pelo fato de que compreende gerir a infecção pulmonar relacionada à CF.

111. Método, de acordo com a reivindicação 108, caracterizado pelo fato de que compreende atenuar a gravidade da infecção pulmonar relacionada à CF.

112. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 100 a 111, caracterizado pelo fato de que a infecção pulmonar está localizada na mucosa pulmonar, nos brônquios e/ou nos bronquíolos ou sobre os mesmos.

113. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 100 a 111, caracterizado pelo fato de que a infecção pulmonar está localizada na superfície ou dentro de um biofilme bacteriano, bactérias agregadas, um biofilme fúngico ou fungos agregados.

114. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 100 a 111, caracterizado pelo fato de que a infecção pulmonar está localizada no esputo.

115. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 107 a 114, caracterizado pelo fato de que o patógeno bacteriano compreende uma ou mais bactérias gram-positivas e bactérias gram-negativas.

116. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 107 a 115, caracterizado pelo fato de que o patógeno bacteriano compreende um ou mais dentre um biofilme bacteriano e bactérias planctônicas.

117. Método, de acordo com a reivindicação 116, caracterizado pelo fato de que o método compreende pelo menos um dentre: (i) reduzir o biofilme bacteriano, (ii) impedir o crescimento do biofilme bacteriano e (iii) prevenir a reformação do biofilme bacteriano.

118. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 107 a 114, caracterizado pelo fato de que o patógeno fúngico compreende fungos planctônicos e/ou fungos de biofilme.

119. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 107 a 118, caracterizado pelo fato de que a composição de BT trata, gere ou atenua a gravidade da infecção pulmonar por um ou ambos:

- prevenção da infecção por patógeno bacteriano ou fúngico; e
- redução do patógeno bacteriano ou fúngico; e/ou
- redução da viscosidade do esputo.

120. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 107 a 118, caracterizado pelo fato de que a composição de BT trata, gere ou atenua a gravidade da infecção pulmonar por um ou mais dos seguintes:

- prevenção da elaboração de secreção de exotoxinas contra patógeno bacteriano ou fúngico;
- inibição de viabilidade celular ou proliferação celular de células planctônicas do patógeno bacteriano ou fúngico;
- inibição de formação de biofilme pelo patógeno bacteriano ou fúngico; e
- inibição da viabilidade de biofilme ou crescimento de bio-

filme de células de formação de biofilme do patógeno bacteriano ou fúngico.

121. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 107 a 120, caracterizado pelo fato de que o um ou mais patógenos são selecionados dentre *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus lugdunensis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus milleri/anginosus*, *Streptococcus pyogenes*, *Mycobacterium non-tuberculosis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Burkholderia* spp., *Achromobacter xylosoxidans*, *Pandoraea sputorum*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Alcaligenes xylosoxidans*, *Haemophilus pittmaniae*, *Serratia marcescens*, *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida guilliermondii*, *Morganella morganii*, *Inquilinus limosus*, *Ralstonia mannitolilytica*, *Pandoraea apista*, *Pandoraea pnomenusa*, *Pandoraea sputorum*, *Bdellovibrio bacteriovorus*, *Bordetella bronchiseptica*, *Vampirovibrio chlorellavorus*, *Actinobacter baumannii*, *Cupriavidus metallidurans*, *Cupriavidus pauculus*, *Cupriavidus respiraculi*, *Delftia acidivorans*, *Exophiala dermatitidis*, *Herbaspirillum frisingense*, *Herbaspirillum seropedicae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pandoraea norimbergensis*, *Pandoraea pulmonicola*, *Pseudomonas mendocina*, *Pseudomonas pseudoalcaligenes*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas stutzeri*, *Ralstonia insidiosa*, *Ralstonia pickettii*, *Neisseria gonorrhoeae*, *E. coli* NDM-1 positiva, *Enterobacter cloacae*, *E. faecium* resistente à Vancomicina, *E. faecalis* resistente à Vancomicina, *E. faecium*, *E. faecalis*, *S. agalactiae* resistente à clindamicina, *S. agalactiae*, *Bacteroides fragilis*, *Clostridium difficile*, *Streptococcus pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis*, *Haemophilus haemolyticus*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Chlamydia pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Atopobium*, *Sphingomonas*, *Saccharibacteria*, *Leptotrichia*, *Capnocytophaga*, *Oribacterium*, *Aquabacterium*, *Lachnoanaerobaculum*, *Campylobacter*, *Acinetobacter*; *Agrobacterium*;

Bordetella; Brevundimonas; Chryseobacterium; Delftia; Enterobacter; Klebsiella; Pandoraea; Pseudomonas; Ralstonia e Prevotella.

122. Método, de acordo com a reivindicação 121, caracterizado pelo fato de que a micobactéria de não tuberculose é selecionada dentre *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium goodii*, *Mycobacterium kansasii*, complexo *Mycobacterium avium* *Mycobacterium marinum*, *Mycobacterium terrae* e *Mycobacterium chelonae*.

123. Método, de acordo com a reivindicação 121, caracterizado pelo fato de que a *Burkholderia* spp. é selecionada dentre *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia multivorans*, *Burkholderia cenocepacia*, *Burkholderia stabilis*, *Burkholderia vietnamiensis*, *Burkholderia dolosa*, *Burkholderia ambifaria*, *Burkholderia anthina*, *Burkholderia pyrrocinia*, *Burkholderia gladioli*, *Burkholderia ubonensis*, *Burkholderia arboris*, *Burkholderia latens*, *Burkholderia lata*, *Burkholderia metallica*, *Burkholderia seminalis*, *Burkholderia contaminans*, e *Burkholderia diffusa*.

124. Método, de acordo com a reivindicação 121, caracterizado pelo fato de que um ou mais patógenos são selecionados dentre *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a fármaco único, *Pseudomonas aeruginosa* resistente a múltiplos fármacos, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* resistente a múltiplos fármacos, *Staphylococcus aureus* resistentes a múltiplos fármacos, *Staphylococcus aureus* resistente metilicina, *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium avium*, *Haemophilus influenzae*, *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia multivorans*, *Burkholderia cenocepacia*, *Burkholderia dolosa*, *Achromobacter xylosoxidans*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Staphylococcus epidermidis*, e *Burkholderia vietnamiensis*.

125. Método, de acordo com a reivindicação 121, caracterizado pelo fato de que um ou mais patógenos são selecionados dentre

Haemophilus influenzae, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*.

126. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 117, 118 ou 120, caracterizado pelo fato de que um ou mais patógenos são selecionados dentre biofilmes de *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cenocepacia*, complexo *Burkholderia cepacia*, *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium avium*, *Achromobacter* spp., *Staphylococcus epidermidis*, *Stenotrophomonas maltophilia* e *Staphylococcus aureus*.

127. Método, de acordo com a reivindicação 125, caracterizado pelo fato de que *Pseudomonas aeruginosa* e/ou *Staphylococcus aureus* são resistentes a múltiplos fármacos.

128. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 107 a 127, caracterizado pelo fato de que um ou mais patógenos exibem resistência ou são refratários a um antibiótico selecionado dentre amicacina, aztreonam, metilicina, vancomicina, nafcilina, gentamicina, ampicilina, cloranfenicol, doxiciclina e tobramicina.

129. Método, de acordo com a reivindicação 128, caracterizado pelo fato de que o antibiótico é amicacina ou tobramicina.

130. Método, de acordo com a reivindicação 128, caracterizado pelo fato de que o patógeno bacteriano é *Staphylococcus aureus* resistente à metilicina.

131. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 99 a 130, caracterizado pelo fato de que compreende ainda co-administrar ou administrar em conjunto ao indivíduo um antibiótico selecionado dentre amicacina, tobramicina, gentamicina, piperacilina, mezlocilina, ticarcilina, imipenem, ciprofloxacina, ceftazidima, aztreonam, ceftazidima, aztreonam, ticarcilina-clavulanato, dicloxacilina, amoxicilina, o trimetoprim-sulfametoxazol, cefalexina, piperacilina-tazobactam, linezolida, daptomicina, vancomicina, metronidazol, clin-

damicina, colistina, tetraciclina, levofloxacina, amoxicilina e ácido clavulânico (Augmentin®), cloxacilina, dicloxacilina, cefdinir, cefprozil, cefaclor, cefuroxima, eritromicina/sulfisoxazol, eritromicina, claritromicina, azitromicina, doxiciclina, minociclina, tigeciclina, imipenem, meropenem, colistimetato/colistina®, meticilina, oxacilina, nafcilina, carbenicilina, azlocilina, piperacilina e tazobactam (Zosyn®), cefepima, etambutol, rifampicina, e meropenem.

132. Método, de acordo com a reivindicação 131, caracterizado pelo fato de que o antibiótico é selecionado dentre meropenem, ceftazidima, tobramicina, amicacina, aztreonam, ciprofloxacina, colistina e levofloxacina.

133. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 107 a 120, caracterizado pelo fato de que o fungo patogénico é *Candida albicans*, *Candida albicans* resistentes a fármacos, *Cândida glabrata*, *Cândida krusei*, *Cândida guilliermondii*, *Candida auris*, *Candida tropicalis*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus fumigatus*, e/ou *Aspergillus flavus*.

134. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 99 a 133, caracterizado pelo fato de que compreende administrar a composição de BT por inalação, por via oral ou nasal, com o uso de um dispositivo de aerossol.

135. Método, de acordo com a reivindicação 134, caracterizado pelo fato de que o dispositivo de aerossol é um nebulizador.

136. Método, de acordo com a reivindicação 134 ou 135, caracterizado pelo fato de que a composição de BT está na forma de uma solução ou suspensão aquosa.

137. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 99 a 136, caracterizado pelo fato de que a composição de BT é administrada topicamente ao tecido pulmonar.

138. Método, de acordo com qualquer uma das reivindica-

ções 99 a 137, caracterizado pelo fato de que

a composição de BT é administrada como uma dosagem de aproximadamente 0,25 mg/ml a aproximadamente 15 mg/ml, de aproximadamente 0,4 mg/ml a aproximadamente 15 mg/ml, de aproximadamente 0,6 mg/ml a aproximadamente 15 mg/ml, de aproximadamente 0,6 mg/ml a aproximadamente 100 mg/ml, de aproximadamente 5 mg/ml a aproximadamente 100 mg/ml, de aproximadamente 10 mg/ml a aproximadamente 100 mg/ml, de aproximadamente 25 mg/ml a aproximadamente 100 mg/ml, de aproximadamente 50 mg/ml a aproximadamente 100 mg/ml, de aproximadamente 0,8 mg/ml a aproximadamente 15 mg/ml, de aproximadamente 1 mg/ml a aproximadamente 10 mg/ml, de 2,5 mg/ml a aproximadamente 10 mg/ml, de aproximadamente 4 mg/ml a aproximadamente 10 mg/ml, de aproximadamente 5 mg/ml a aproximadamente 10 mg/ml, de aproximadamente 6 mg/ml a aproximadamente 10 mg/ml, 0,6 mg/ml a aproximadamente 6 mg/ml, de aproximadamente 4 mg/ml a aproximadamente 15 mg/ml, de aproximadamente 6 mg/ml a aproximadamente 15 mg/ml, de aproximadamente 50 µg/ml a aproximadamente 750 µg/ml, de aproximadamente 75 µg/ml a aproximadamente 500 µg/ml, de aproximadamente 100 µg/ml a aproximadamente 250 µg/ml, de aproximadamente 100 µg/ml a aproximadamente 150 µg/ml, ou de aproximadamente 75 µg/ml a aproximadamente 150 µg/ml; e/ou

a quantidade total da composição de BT administrada ao pulmões é de aproximadamente 0,25 mg a aproximadamente 15 mg, de aproximadamente 0,4 mg a aproximadamente 15 mg, de aproximadamente 0,6 mg a aproximadamente 15 mg, de aproximadamente 0,8 mg a aproximadamente 15 mg, de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 10 mg, de 2,5 mg a aproximadamente 10 mg, de aproximadamente 4 mg a aproximadamente 10 mg, de aproximadamente 5 mg a aproximadamente 10 mg, de aproximadamente 6 mg a aproxi-

madamente 10 mg, 0,6 mg a aproximadamente 6 mg, de aproximadamente 4 mg a aproximadamente 15 mg, de aproximadamente 6 mg a aproximadamente 15 mg, de aproximadamente 50 µg a aproximadamente 750 µg, de aproximadamente 75 µg a aproximadamente 500 µg, de aproximadamente 100 µg a aproximadamente 250 µg, de aproximadamente 100 µg a aproximadamente 150 µg, ou de aproximadamente 75 µg a aproximadamente 150 µg.

139. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 99 a 138, caracterizado pelo fato de que a composição de BT é administrada com uma dosagem de aproximadamente 0,6 mg/ml a aproximadamente 6 mg/ml.

140. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 99 a 139, caracterizado pelo fato de que a composição de BT é administrada três vezes ao dia, duas vezes ao dia, uma vez ao dia, a cada dois dias, uma vez a cada três dias, uma vez por semana, uma vez a cada duas semanas, uma vez por mês, até uma vez a cada dois meses.

141. Método, de acordo com a reivindicação 140, caracterizado pelo fato de que a composição de BT é administrada uma vez por semana.

142. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 99 a 141, caracterizado pelo fato de que um ou mais dos seguintes sintomas são diminuídos em gravidade no indivíduo: tosse, respiração ofegante, falta de ar, bronquiectasia, pólipos nasais, hemoptise, insuficiência respiratória e exacerbação pulmonar.

143. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 99 a 142, caracterizado pelo fato de que a composição de bismuto-tiol compreende uma pluralidade de micropartículas que compreendem um composto de bismuto-tiol (BT), em que substancialmente todas as ditas micropartículas têm um diâmetro volumétrico médio de

aproximadamente 0,4 μm a aproximadamente 5 μm , e em que o composto de BT compreende bismuto ou um sal de bismuto e um composto que contém tiol.

144. Método, de acordo com a reivindicação 143, caracterizado pelo fato de que pelo menos 60%, 65%, 70 %, 75%, 80%, 90% ou 95% das micropartículas têm um diâmetro volumétrico médio de aproximadamente 0,4 μm a aproximadamente 3 μm , ou de aproximadamente 0,5 μm a aproximadamente 2 μm , ou de aproximadamente 0,7 μm a aproximadamente 2 μm , ou de aproximadamente 0,8 μm a aproximadamente 1,8 μm , ou de aproximadamente 0,8 μm a aproximadamente 1,6 μm , ou de aproximadamente 0,9 μm a aproximadamente 1,4 μm , ou de aproximadamente 1,0 μm a aproximadamente 2,0 μm , ou de aproximadamente 1,0 μm a aproximadamente 1,8 μm .

145. Método, de acordo com a reivindicação 142 ou 143, caracterizado pelo fato de que o sal de bismuto é nitrato de bismuto, subnitrato de bismuto ou cloreto de bismuto.

146. Método, de acordo com a reivindicação 142 ou 143, caracterizado pelo fato de que o composto que contém tiol compreende um ou mais agentes selecionados dentre 1,2-etano ditiol, 2,3-dimercaptopropanol, piritiona, ditioeritritol, 3,4 dimercaptotolueno, 2,3-butanoditiol, 1,3-propaneditiol, 2-hidroxipropanotiol, 1-mercaptopropanol, ditioeritritol, ditiotreitól, cisteamina e ácido alfa-lipoico.

147 Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 143 a 146, caracterizado pelo fato de que a composição de BT compreende um ou mais compostos de BT selecionados dentre Bis-BAL, BisEDT, Bis-dimercaprol, BisDTT, Bis-2-mercaptopropanol, Bis-DTE, Bis-Pyr, Bis-Ery, Bis-Tol, Bis-BDT, Bis-PDT, Bis-Pyr/Bal, Bis-Pyr/BDT, BisPyr/EDT, Bis-Pyr/PDT, Bis-Pyr/Tol, Bis-Pyr/Ery, bismuto-1-mercaptopropanol, BisEDT/CSTMN (1:1), BisPYR/CSTMN (1:1), BisBAL/CSTMN (1:1), BisTOL/CSTMN (1:1) e Bis-EDT/2-hidróxi-1-

propanotiol.

148. Método, de acordo com a reivindicação 147, caracterizado pelo fato de que o composto de BT é selecionado dentre um ou mais de Bis-EDT, Bis-Bal, Bis-Pyr, Bis-Ery, Bis-Tol, Bis-BDT ou Bis-EDT/2- hidróxi-1-propano tiol.

149. Método, de acordo com a reivindicação 148, caracterizado pelo fato de que o composto de BT é BisEDT.

150. Método, de acordo com a reivindicação 148, caracterizado pelo fato de que o composto de BT é BisBDT ou BisBAL.

151. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 99 a 150, caracterizado pelo fato de que a quantidade total da composição de BT administrada à região profunda do pulmão é de aproximadamente 0,25 mg a aproximadamente 15 mg, de aproximadamente 0,4 mg a aproximadamente 15 mg, de aproximadamente 0,6 mg a aproximadamente 15 mg, de aproximadamente 0,8 mg a aproximadamente 15 mg, de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 10 mg, de 2,5 mg a aproximadamente 10 mg, de aproximadamente 4 mg a aproximadamente 10 mg, de aproximadamente 5 mg a aproximadamente 10 mg, de aproximadamente 6 mg a aproximadamente 10 mg, 0,6 mg a aproximadamente 6 mg, de aproximadamente 4 mg a aproximadamente 15 mg, de aproximadamente 6 mg a aproximadamente 15 mg, de aproximadamente 50 µg a aproximadamente 750 µg, de aproximadamente 75 µg a aproximadamente 500 µg, de aproximadamente 100 µg a aproximadamente 250 µg, de aproximadamente 100 µg a aproximadamente 150 µg, ou de aproximadamente 75 µg a aproximadamente 150 µg.

152. Método, de acordo com a reivindicação 151, caracterizado pelo fato de que a região profunda do pulmão são os alvéolos pulmonares profundos.

153. Aerossol, de acordo com qualquer uma das reivindica-

ções 55 a 72, caracterizado pelo fato de que pelo menos 60%, 65%, 70 %, 75%, 80%, 90% ou 95% das micropartículas têm um diâmetro volumétrico médio de aproximadamente 0,6 μm a aproximadamente 2,5 μm .

154. Aerossol, de acordo com a reivindicação 153, caracterizado pelo fato de que substancialmente todas as micropartículas têm um VMD de aproximadamente 0,6 μm a aproximadamente 2,5 μm .

155. Aerossol, de acordo com qualquer uma das reivindicações 55 a 72 ou 153 e 154, caracterizado pelo fato de que pelo menos 70 % das partículas submetidas a aerossolização têm um MMAD de aproximadamente 0,9 μm a aproximadamente 3 μm .

156. Aerossol, de acordo com qualquer uma das reivindicações 55 a 72 ou 153 a 155, caracterizado pelo fato de que a composição é uma suspensão de micropartículas que têm um diâmetro volumétrico médio (VMD) de aproximadamente 0,6 μm a aproximadamente 2,5 μm e/ou um diâmetro aerodinâmico mediano de massa (MMAD) de aproximadamente 0,9 μm a aproximadamente 3 μm .

157. Aerossol, de acordo com qualquer uma das reivindicações 55 a 72 ou 153 a 156, caracterizado pelo fato de que a composição de bismuto-tiol compreende uma pluralidade de micropartículas que compreendem um composto de bismuto-tiol (BT), em que substancialmente todas as referidas micropartículas têm um diâmetro volumétrico médio de aproximadamente 0,4 μm a aproximadamente 5 μm , e em que o composto de BT compreende bismuto ou um sal de bismuto e um composto que contém tiol.

158. Aerossol, de acordo com qualquer uma das reivindicações 55 a 72 ou 153 a 157, caracterizado pelo fato de que após a distribuição da composição em aerossol a um indivíduo, pelo menos 60%, 65%, 70 %, 75%, 80%, 90% ou 95% da dose do composto de BT é depositada no pulmão.

159. Aerossol, de acordo com a reivindicação 158, caracterizado pelo fato de que pelo menos 80% da dose do composto de BT é depositada no pulmão.

160. Aerossol, de acordo com a reivindicação 158, caracterizado pelo fato de que pelo menos 90% da dose do composto de BT é depositada no pulmão.

161. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 54 ou 73 a 152, caracterizado pelo fato de que pelo menos 60%, 65%, 70 %, 75%, 80%, 90% ou 95% das micropartículas têm um diâmetro volumétrico médio de aproximadamente 0,6 μm a aproximadamente 2,5 μm .

162. Método, de acordo com a reivindicação 161, caracterizado pelo fato de que substancialmente todas as micropartículas têm um VMD de aproximadamente 0,6 μm a aproximadamente 2,5 μm .

163. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 54, 73 a 152 ou 161 e 162, caracterizado pelo fato de que pelo menos 70 % das partículas submetidas à aerossolização têm um MMAD de aproximadamente 0,9 μm a aproximadamente 3 μm .

164. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 54, 73 a 152 ou 161 a 163, caracterizado pelo fato de que a composição é uma suspensão de micropartículas que têm um diâmetro volumétrico médio (VMD) de aproximadamente 0,6 μm a aproximadamente 2,5 μm e/ou um diâmetro aerodinâmico mediano de massa (MMAD) de aproximadamente 0,9 μm a aproximadamente 3 μm .

165. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 54, 73 a 152 ou 161 a 164, caracterizado pelo fato de que a composição de bismuto-tiol compreende uma pluralidade de micropartículas que compreendem um composto de bismuto-tiol (BT), em que substancialmente todas as ditas micropartículas têm um diâmetro volumétrico médio de aproximadamente 0,4 μm a aproximadamente 5

um, e em que o composto de BT compreende bismuto ou um sal de bismuto e um composto que contém tiol.

166. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 54, 73 a 152 ou 161 a 165, caracterizado pelo fato de que, caso depositados na região profunda do pulmão, os compostos de BT têm uma meia-vida média de pelo menos 2 dias.

167. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 166, caracterizado pelo fato de que, caso depositados na região profunda do pulmão, os compostos de BT têm uma meia-vida média de pelo menos 4 dias.

168. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 54, 73 a 152 ou 161 a 167, caracterizado pelo fato de que após a distribuição da composição em aerossol a um indivíduo, pelo menos 60%, 65%, 70 %, 75%, 80%, 90% ou 95% da dose do composto de BT é depositada no pulmão.

169. Aerossol, de acordo com a reivindicação 168, caracterizado pelo fato de que pelo menos 80% da dose do composto de BT é depositada no pulmão.

170. Aerossol, de acordo com a reivindicação 168, caracterizado pelo fato de que pelo menos 90% da dose do composto de BT é depositada no pulmão.

171. Método para tratar, gerir ou atenuar a gravidade dos sintomas de fibrose cística (CF) e infecções em um indivíduo, caracterizado pelo fato de que o método compreende administrar ao indivíduo uma composição de bismuto-tiol (BT) que compreende BisEDT suspenso na mesma, em que a administração da composição de BT ocorre por inalação, por via oral ou nasal, com o uso de um dispositivo de aerossol.

172. Método, de acordo com a reivindicação 171, caracterizado pelo fato de que a composição de BT compreende uma plurali-

dade de micropartículas em que pelo menos 70 % das ditas micropartículas têm um diâmetro volumétrico médio (VMD) de aproximadamente 0,6 μm a aproximadamente 2,5 μm .

173. Método, de acordo com a reivindicação 172, caracterizado pelo fato de que pelo menos 80% das referidas micropartículas têm um VMD de aproximadamente 0,6 μm a aproximadamente de 2,5 μm .

174. Método, de acordo com a reivindicação 172, caracterizado pelo fato de que pelo menos 90% das referidas micropartículas têm um VMD de aproximadamente 0,6 μm a aproximadamente 2,5 μm .

175. Método, de acordo com a reivindicação 172, caracterizado pelo fato de que quando a composição de BT é submetida à aerossolização, pelo menos 70 % das gotículas líquidas submetidas à aerossolização têm um diâmetro aerodinâmico médio de massa (MMAD) de aproximadamente de aproximadamente 0,9 μm a aproximadamente 3 μm .

176. Método, de acordo com a reivindicação 173, caracterizado pelo fato de que quando a composição de BT é submetida à aerossolização pelo menos 80% das gotículas líquidas submetida à aerossolização têm um MMAD de aproximadamente de aproximadamente 0,9 μm a aproximadamente 3 μm .

177. Método, de acordo com a reivindicação 174, caracterizado pelo fato de que quando a composição de BT é submetida à aerossolização pelo menos 90% das gotículas líquidas submetidas à aerossolização têm um MMAD de aproximadamente de aproximadamente 0,9 μm a aproximadamente 3 μm .

178. Método, de acordo com a reivindicação 171, caracterizado pelo fato de que a composição de BT compreende BisEDT a uma concentração superior a aproximadamente 0,1 mg/ml, Tween 80® a aproximadamente 0,05% a aproximadamente 1,0%, cloreto de sódio a

aproximadamente 0,05 a 40 mM e, opcionalmente, fosfato de sódio a aproximadamente 2 a 20 mM a aproximadamente pH 7,4.

179. Método, de acordo com a reivindicação 171, caracterizado pelo fato de que, caso depositados na região profunda do pulmão, os compostos BisEDT têm uma meia-vida média de aproximadamente 4 dias.

180. Método, de acordo com a reivindicação 171, caracterizado pelo fato de que o indivíduo tem pelo menos uma infecção pulmonar que contém um ou mais patógenos bacterianos e/ou patógenos fúngicos.

181. Método, de acordo com a reivindicação 180, caracterizado pelo fato de que o método compreende pelo menos um dentre: (i) reduzir um biofilme bacteriano, (ii) impedir o crescimento de um biofilme bacteriano, (iii) prevenir a formação inicial do biofilme bacteriano e/ou (iv) prevenir a reformação do biofilme bacteriano.

182. Método, de acordo com a reivindicação 180, caracterizado pelo fato de que um ou mais patógenos são selecionados dentre *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus lugdunensis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus milleri/anginosus*, *Streptococcus pyogenes*, *Mycobacterium non-tuberculosis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Burkholderia* spp., *Achromobacter xylosoxidans*, *Pandora* spp., *Stenotrophomonas maltophilia*, *Alcaligenes xylosoxidans*, *Haemophilus pittmaniae*, *Serratia marcescens*, *Candida albicans* resistentes a fármacos de *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida guilliermondii*, *Candida auris*, *Candida tropicalis*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Morganella morganii*, *Inquilinus limosus*, *Ralstonia mannitolilytica*, *Pandora* spp., *Pandora* spp., *Pandora* spp., *Bordetella bronchiseptica*, *Vampirovibrio chlorellavorus*, *Actinobacter*

baumanni, Cupriavidus metallidurans, Cupriavidus pauculus, Cupriavidus respiraculi, Delftia acidivorans, Exophiala dermatitidis, Herbaspirillum frisingense, Herbaspirillum seropedicae, Klebsiella pneumoniae, Pandoraea norimbergensis, Pandoraea pulmonicola, Pseudomonas mendocina, Pseudomonas pseudoalcaligenes, Pseudomonas putida, Pseudomonas stutzeri, Ralstonia insidiosa, Ralstonia pickettii, Neisseria gonorrhoeae, E. coli NDM-1 positiva, Enterobacter cloaca, E. faecium resistente à Vancomicina, E. faecalis resistente à Vancomicina, E. faecium, E. faecalis, S. agalactiae resistente à clindamicina, S. agalactiae, Bacteroides fragilis, Clostridium difficile, Streptococcus pneumoniae, Moraxella catarrhalis, Haemophilus haemolyticus, Haemophilus parainfluenzae, Chlamydia pneumoniae, Mycoplasma pneumoniae, Atopobium, Sphingomonas, Saccharibacteria, Leptotrichia, Capnocytophaga, Oribacterium, Aquabacterium, Lachnospirillum, Campylobacter, Acinetobacter; Agrobacterium; Bordetella; Brevundimonas; Chryseobacterium; Delftia; Enterobacter; Klebsiella; Pandoraea; Pseudomonas; Ralstonia e Prevotella.

183. Aerossol, caracterizado pelo fato de que compreende uma pluralidade de gotículas líquidas dispersas em um gás, em que as referidas gotículas líquidas compreendem uma composição de BT que compreende um composto BisEDT suspenso nas mesmas; e

em que pelo menos 70 % das gotículas líquidas têm um MMAD de aproximadamente de aproximadamente 0,9 μm a aproximadamente 3 μm .

184. Aerossol, de acordo com a reivindicação 183, caracterizado pelo fato de que antes de ser submetida à aerossolização, a composição de BT compreende uma pluralidade de micropartículas em que pelo menos 70 % das ditas micropartículas têm um VMD de aproximadamente 0,6 μm a aproximadamente 2,5 μm .

185. Aerossol, de acordo com a reivindicação 183, caracterizado pelo fato de que pelo menos 80% das gotículas líquidas têm um MMAD de aproximadamente de aproximadamente 0,9 μm a aproximadamente 3 μm .

186. Aerossol, de acordo com a reivindicação 183, caracterizado pelo fato de que pelo menos 90% das gotículas líquidas têm um MMAD de aproximadamente de aproximadamente 0,9 μm a aproximadamente 3 μm .

187. Aerossol, de acordo com a reivindicação 185, caracterizado pelo fato de que antes de ser submetida à aerossolização, a composição de BT compreende uma pluralidade de micropartículas em que pelo menos 80% das ditas micropartículas têm um VMD de aproximadamente 0,6 μm a aproximadamente 2,5 μm .

188. Aerossol, de acordo com a reivindicação 186, caracterizado pelo fato de que antes de ser submetida à aerossolização, a composição de BT compreende uma pluralidade de micropartículas em que pelo menos 90% das ditas micropartículas têm um VMD de aproximadamente 0,6 μm a aproximadamente 2,5 μm .

189. Aerossol, de acordo com a reivindicação 183, caracterizado pelo fato de que as gotículas compreendem ainda Tween 80 (por exemplo, de aproximadamente 0,05% a aproximadamente 1%) e opcionalmente um tampão (por exemplo, fosfato de sódio ou citrato de sódio) a um pH de aproximadamente 7,4; e/ou cloreto de sódio.

190. Aerossol, de acordo com a reivindicação 183, caracterizado pelo fato de que, caso depositados na região profunda do pulmão, os compostos BisEDT têm uma meia-vida média de mais de 2 dias.

191. Aerossol, de acordo com a reivindicação 183, caracterizado pelo fato de que, caso depositados na região profunda do pulmão, os compostos BisEDT têm uma meia-vida média de aproxima-

damente 4 dias.

193. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de que compreende a composição de bismuto-tiol (BT) que compreende BisEDT suspenso na mesma, em que a composição de BT compreende uma pluralidade de micropartículas, em que o D90 das ditas micropartículas é inferior ou igual a $1,9\ \mu\text{m}$.

194. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de que compreende a composição de bismuto-tiol (BT) BisEDT suspenso na mesma, sendo que a composição de BT compreende uma pluralidade de micropartículas, em que o D90 das referidas micropartículas é inferior ou igual a aproximadamente $1,6\ \mu\text{m}$.

195. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 193, caracterizada pelo fato de que pelo menos 70 % das ditas micropartículas que têm um diâmetro volumétrico médio de aproximadamente $0,6\ \mu\text{m}$ a aproximadamente $2,5\ \mu\text{m}$.

196. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 193, caracterizada pelo fato de que pelo menos 90% das referidas micropartículas têm um diâmetro volumétrico médio de aproximadamente $0,6\ \mu\text{m}$ a aproximadamente $2,5\ \mu\text{m}$.

197. Método para tratar, gerir ou atenuar a gravidade de sintomas e infecções associados a uma ou mais doenças ou infecções pulmonares em um indivíduo, caracterizado pelo fato de que o método compreende administrar ao indivíduo uma composição de bismuto-tiol (BT) que compreende BisEDT, em que a composição de BT compreende uma pluralidade de micropartículas em que pelo menos 70 % das ditas micropartículas têm um diâmetro volumétrico médio de aproximadamente $0,6\ \mu\text{m}$ a aproximadamente $2,5\ \mu\text{m}$, e em que quando a composição de BT é submetida à aerossolização, pelo menos 70 % das gotículas líquidas submetidas à aerossolização têm um MMAD de aproximadamente de aproximadamente $0,9\ \mu\text{m}$ a aproximadamente 3

µm.

198. Método, de acordo com a reivindicação 197, caracterizado pelo fato de que uma ou mais doenças pulmonares ou infecções não são o resultado de fibrose cística ou não estão associadas à mesma.

199. Método, de acordo com a reivindicação 198, caracterizado pelo fato de que a infecção pulmonar é infecção por bronquiectasia, pneumonia, febre do vale, aspergilose broncopulmonar alérgica (ABPA), pneumonia associada à ventilação mecânica, pneumonia adquirida em hospital, pneumonia adquirida na comunidade, traqueobronquite associada à ventilação mecânica, infecção do trato respiratório inferior, Mycobacteria não tuberculosa, antraz, legionelose, coqueluche, bronquite, bronquiolite, infecção associada à DPOC e pós-transplante pulmonar.

200. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 193, caracterizada pelo fato de que o D50 das referidas micropartículas é menor ou igual a 1,0 µm.

201. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 193, caracterizada pelo fato de que o D10 das referidas micropartículas é menor ou igual a 0,39 µm.

202. Composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 193 a 196 e 200 e 201, caracterizada pelo fato de que a composição farmacêutica compreende o BisEDT a uma concentração maior que aproximadamente 0,1 mg/ml, Tween 80® a aproximadamente 0,05% a aproximadamente 1,0%, cloreto de sódio a aproximadamente 0,05 a 40 mM e, opcionalmente, fosfato de sódio de aproximadamente 2 a 20 mM a aproximadamente pH 7,4.

203 Composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 193 a 196 e 200 a 202, caracterizada pelo fato de que a composição farmacêutica é um aerossol.

204. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 203, caracterizada pelo fato de que o aerossol foi criado por um nebulizador.

205. Método para tratar, gerir e/ou atenuar a gravidade dos sintomas e infecções de fibrose cística (CF) em um indivíduo, caracterizado pelo fato de que o método compreende administrar ao indivíduo uma composição de bismuto-tiol (BT), como definida em qualquer uma das reivindicações 193 a 196 e 200 a 204.

206. Método para tratar, gerir e/ou atenuar a gravidade dos sintomas e infecções associados a uma ou mais doenças pulmonares ou infecções em um indivíduo, caracterizado pelo fato de que o método compreende administrar ao indivíduo uma composição de bismuto-tiol (BT), como definida em qualquer uma das reivindicações 193 a 196 e 200 a 204.

Fig. 1

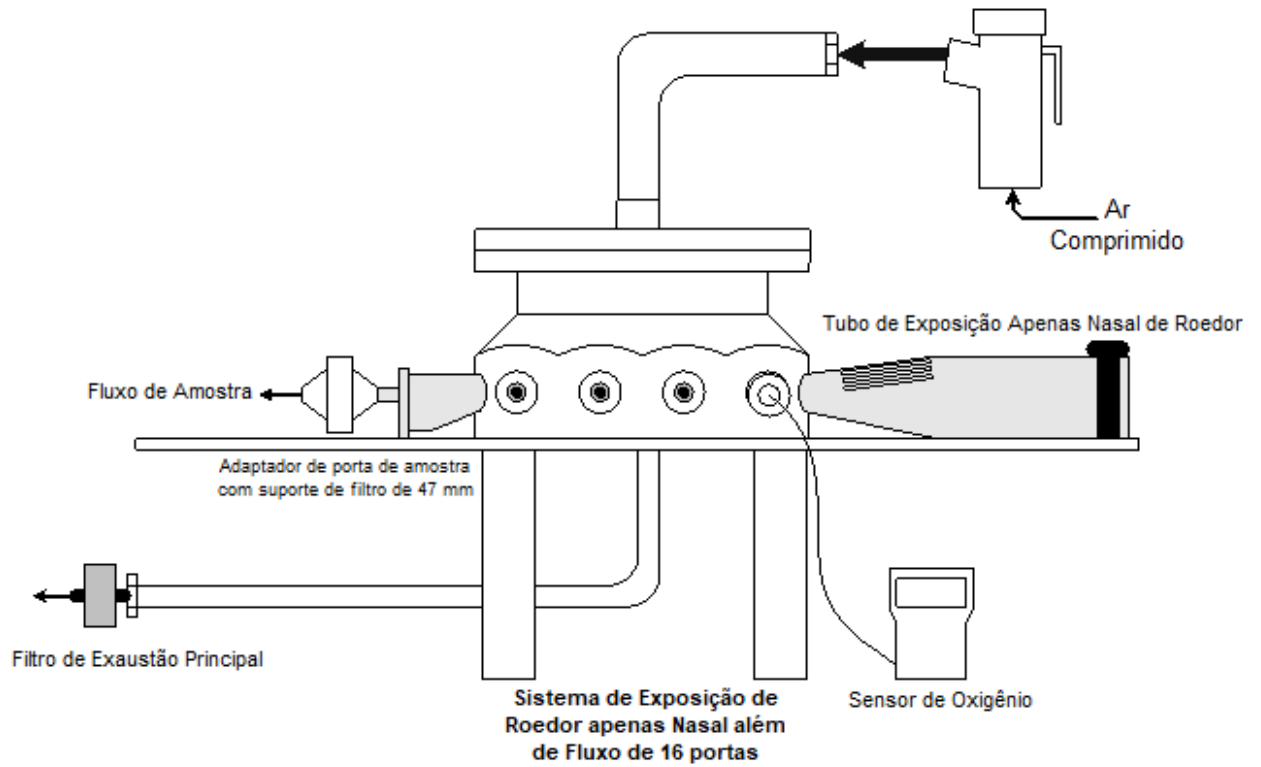


Fig. 2

DISTRIBUIÇÃO DE MASSA DE IMPACTADOR EM CASCATA

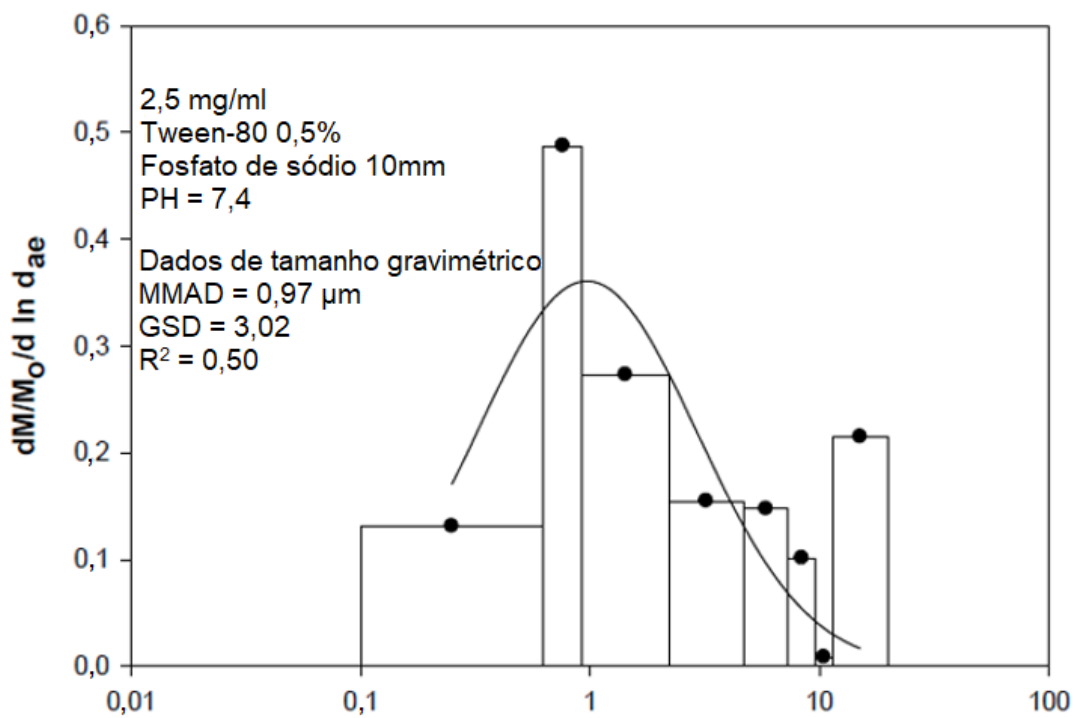


Fig. 3

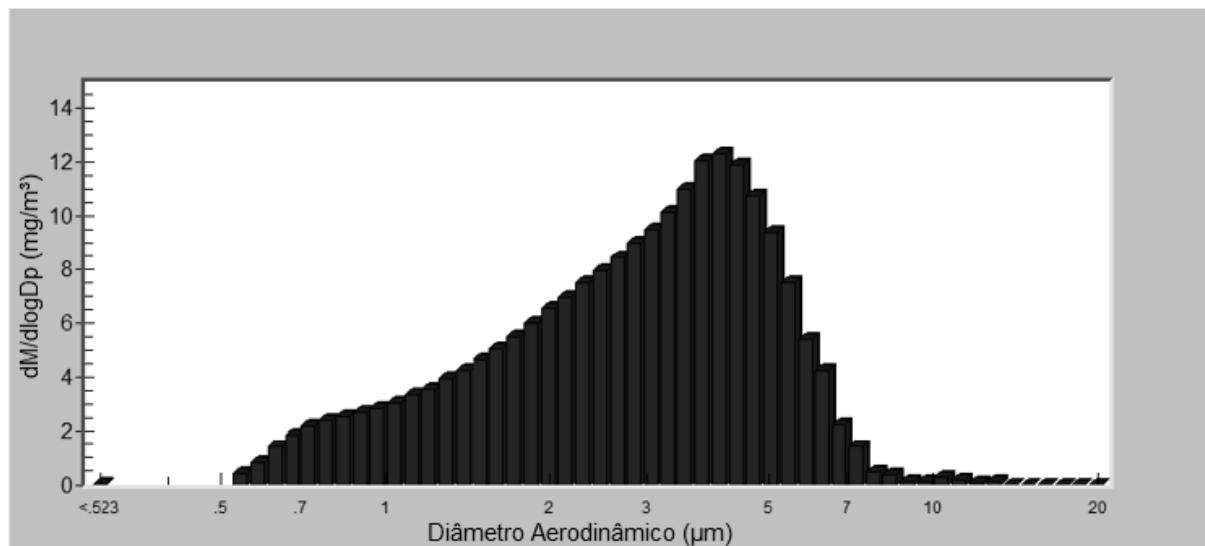


Fig. 4

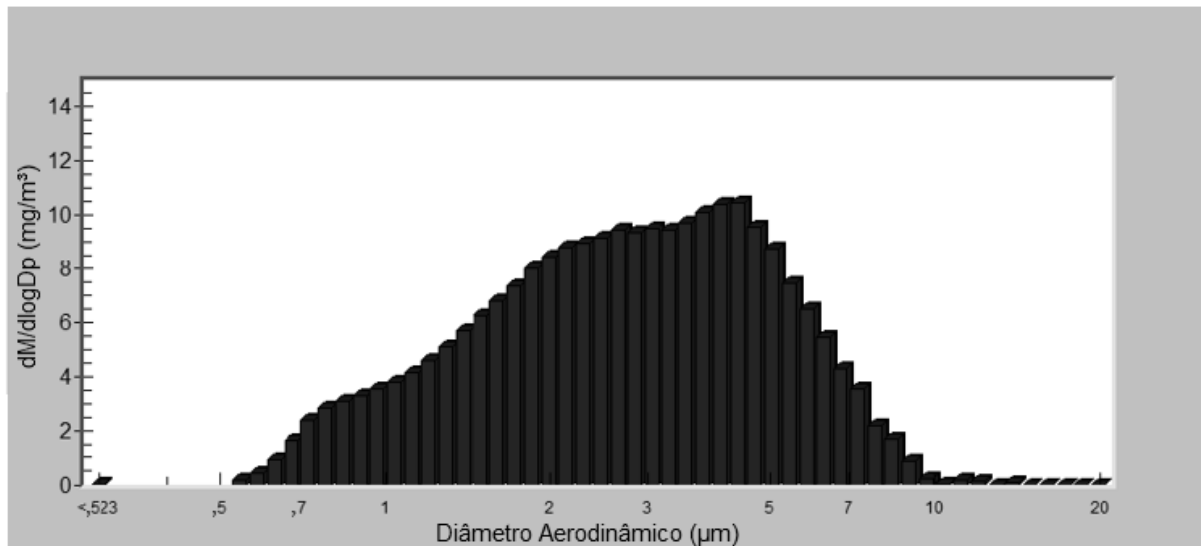


Fig. 5

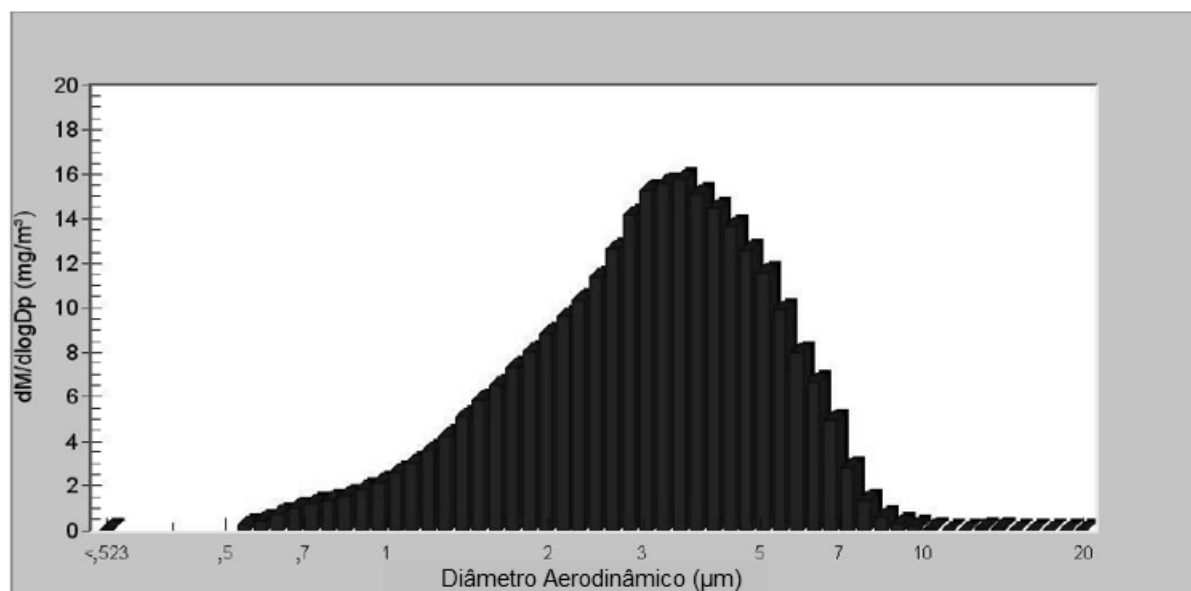


Fig. 6

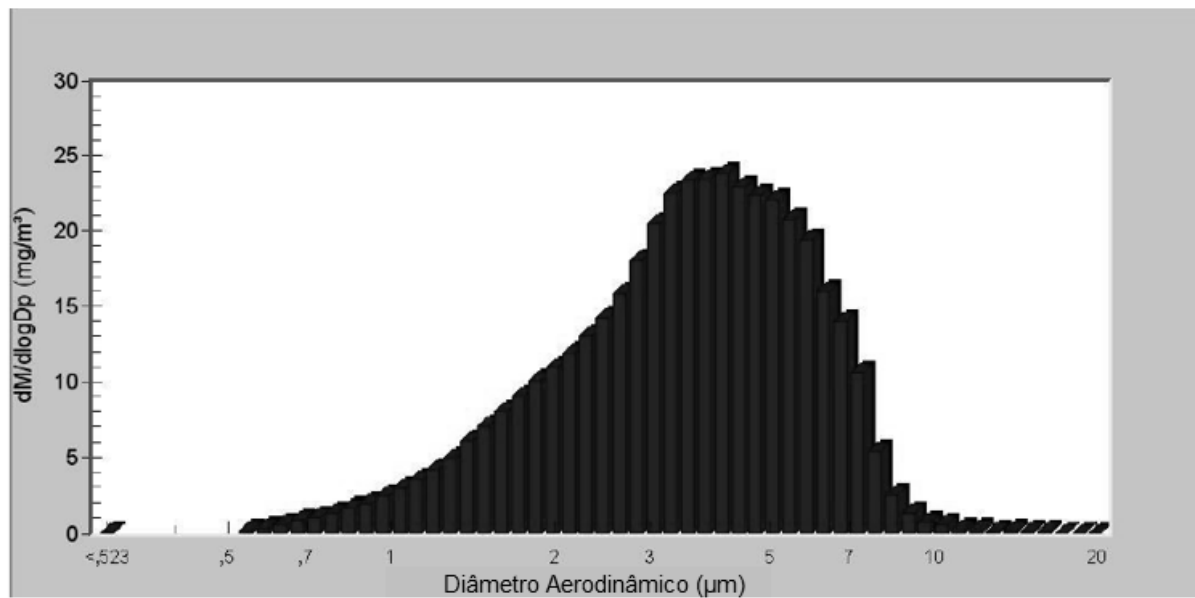


Fig. 7

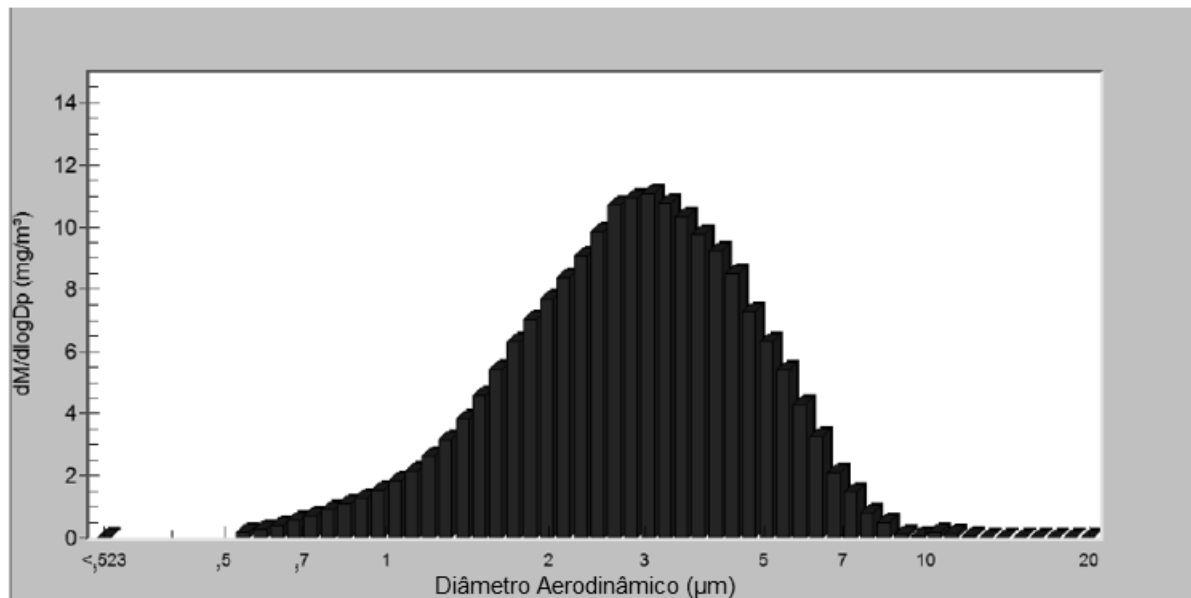


Fig. 8

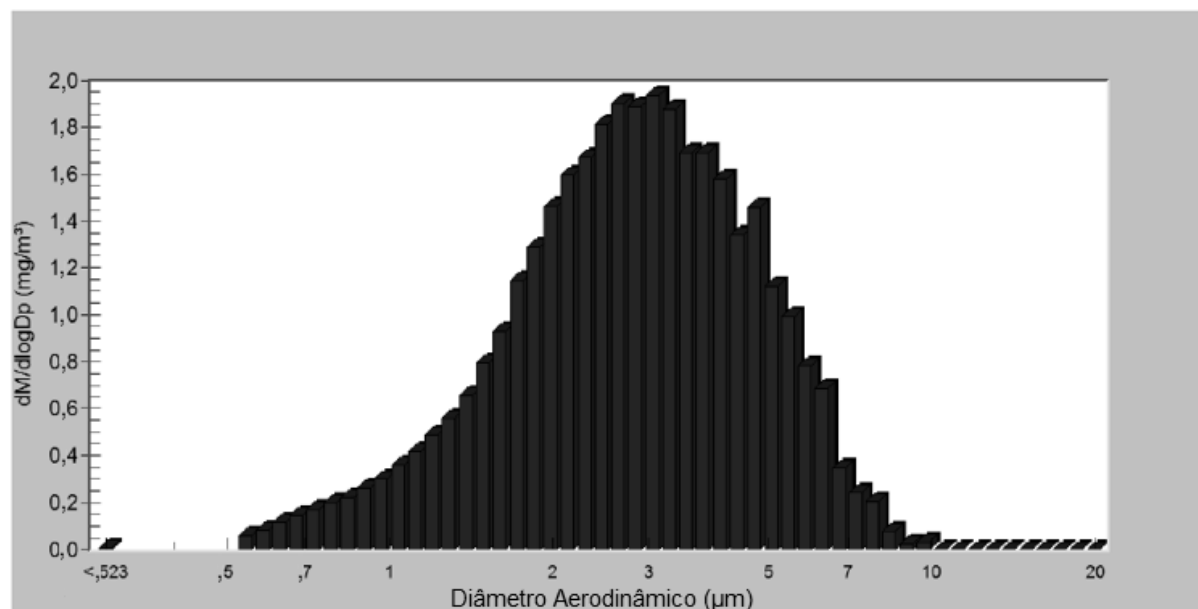


Fig. 9

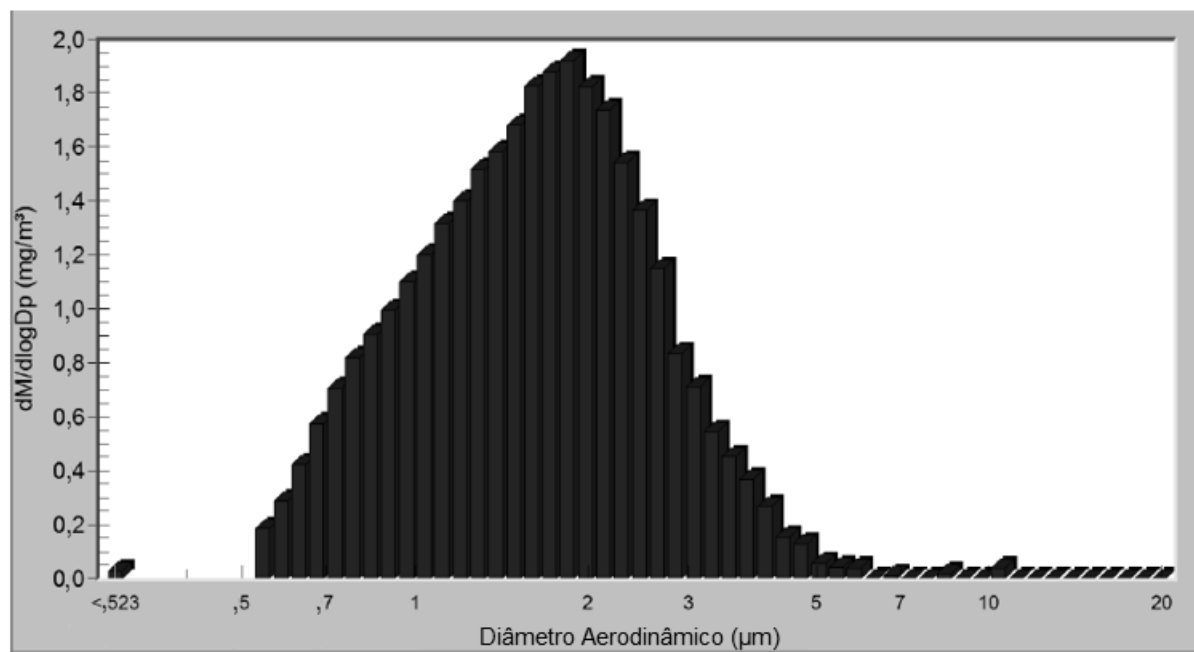


Fig. 10

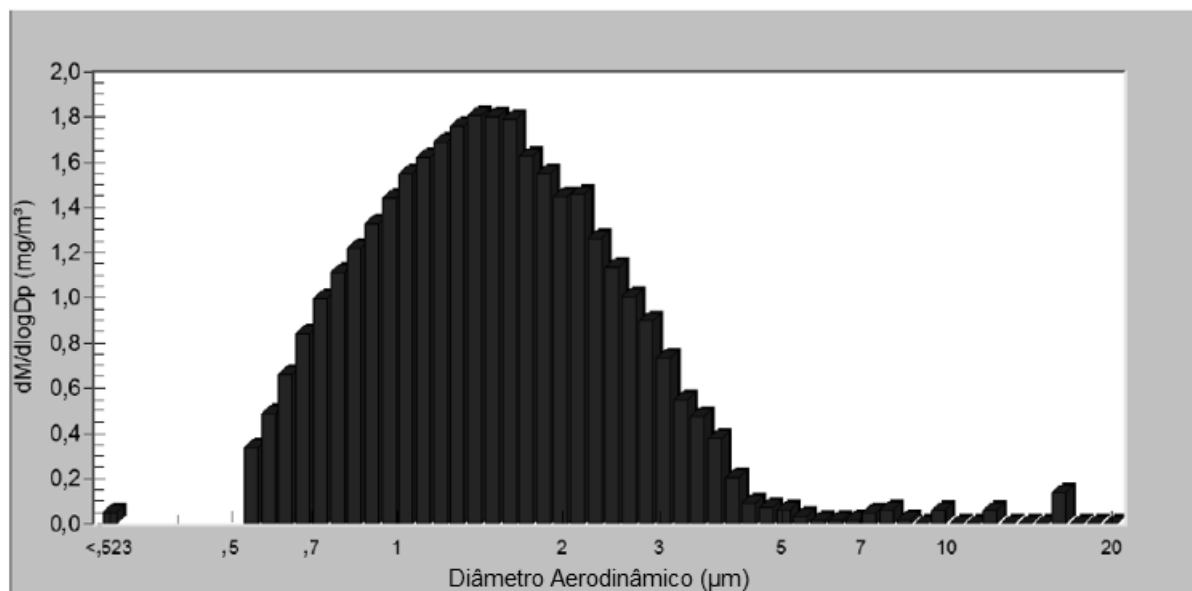


Fig. 11

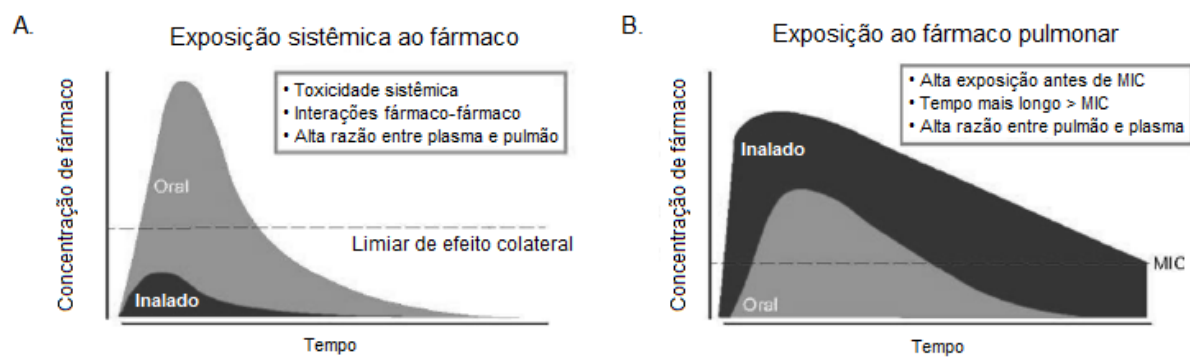


Fig. 12

Bismuto-tiol: MB-1B3 - Candidato a Fármaco de Estágio Clínico Atual

Cepa	2,50	1,25	0,63	0,31	0,16	0,08	0,04	0,02	0,01	0,00	controle +	controle -	MIC (mcg/ml)
AG1 (PA resistente a aminoglicosídeo)	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	0,63
AG14 (PA resistente a aminoglicosídeo)	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	0,31
AU 197 (<i>B. cenocepacia</i>)	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	0,16
AX7 (<i>Achromobacter</i> spp.)	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	0,08
MR14 (PA multirresistente)	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	0,63
SM21 (<i>S. maltophilia</i>)	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	0,31
25922 (<i>E. coli</i> de cepa de controle)	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	1,25
29213 (<i>S. aureus</i> de cepa de controle)	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	0,02

Bismuto-tiol: MB-6 - Candidato a Fármaco de Estágio Pré-clínico Atual

Cepa	2,50	1,25	0,63	0,31	0,16	0,08	0,04	0,02	0,01	0,00	controle +	controle -	MIC (mcg/ml)
AG1 (PA resistente a aminoglicosídeo)	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	0,63
AG14 (PA resistente a aminoglicosídeo)	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	0,63
AU 197 (<i>B. cenocepacia</i>)	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	0,31
AX7 (<i>Achromobacter</i> spp.)	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	0,16
MR14 (PA multirresistente)	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	0,31
SM21 (<i>S. maltophilia</i>)	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	0,08
25922 (<i>E. coli</i> de cepa de controle)	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	0,31
29213 (<i>S. aureus</i> de cepa de controle)	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	0,04

Fig. 13

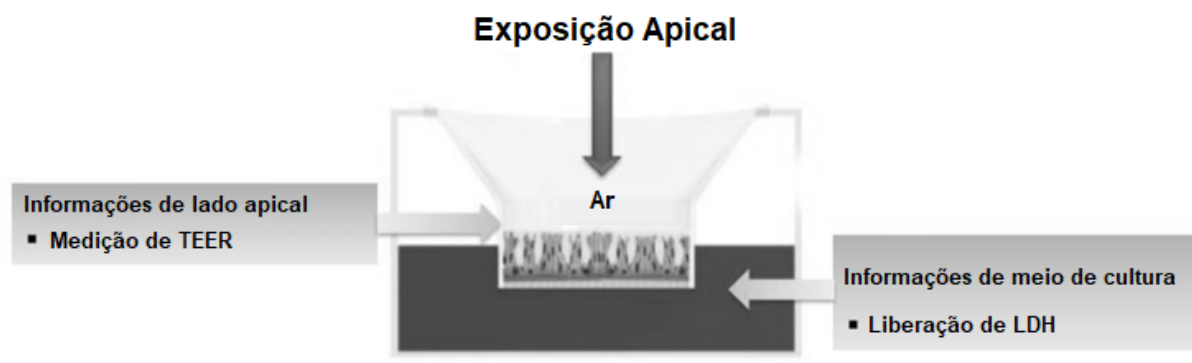


Fig. 14

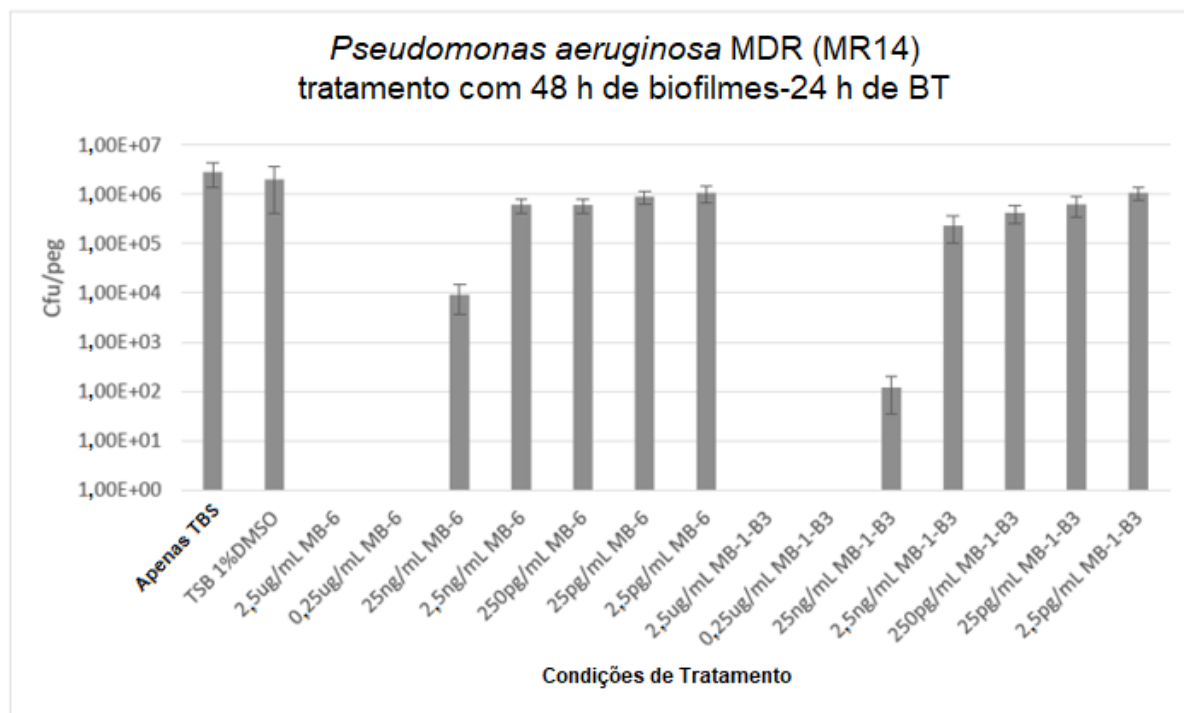


Fig. 15

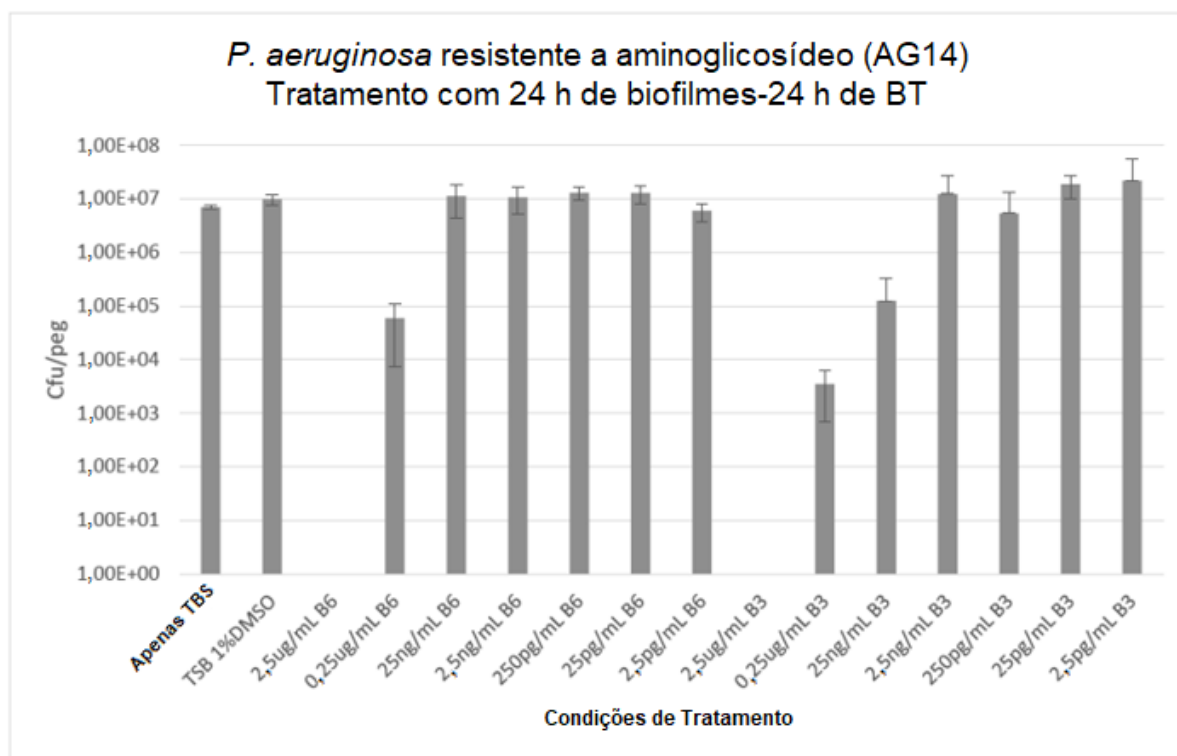


Fig. 16

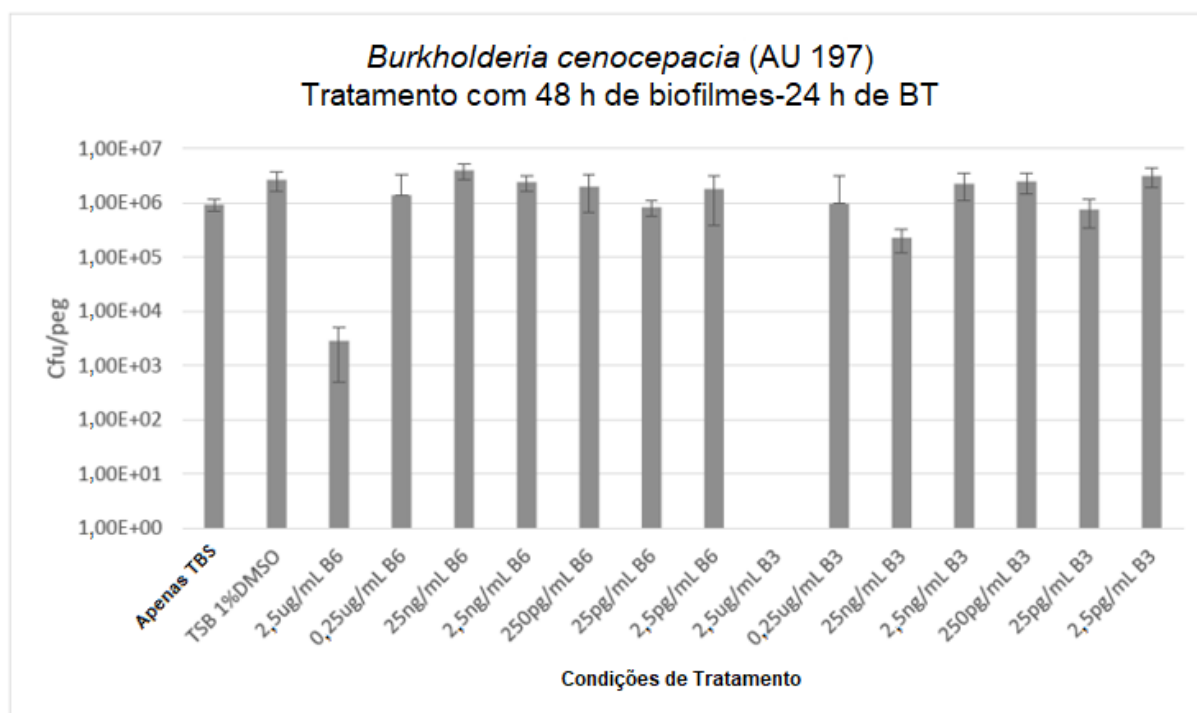


Fig. 17

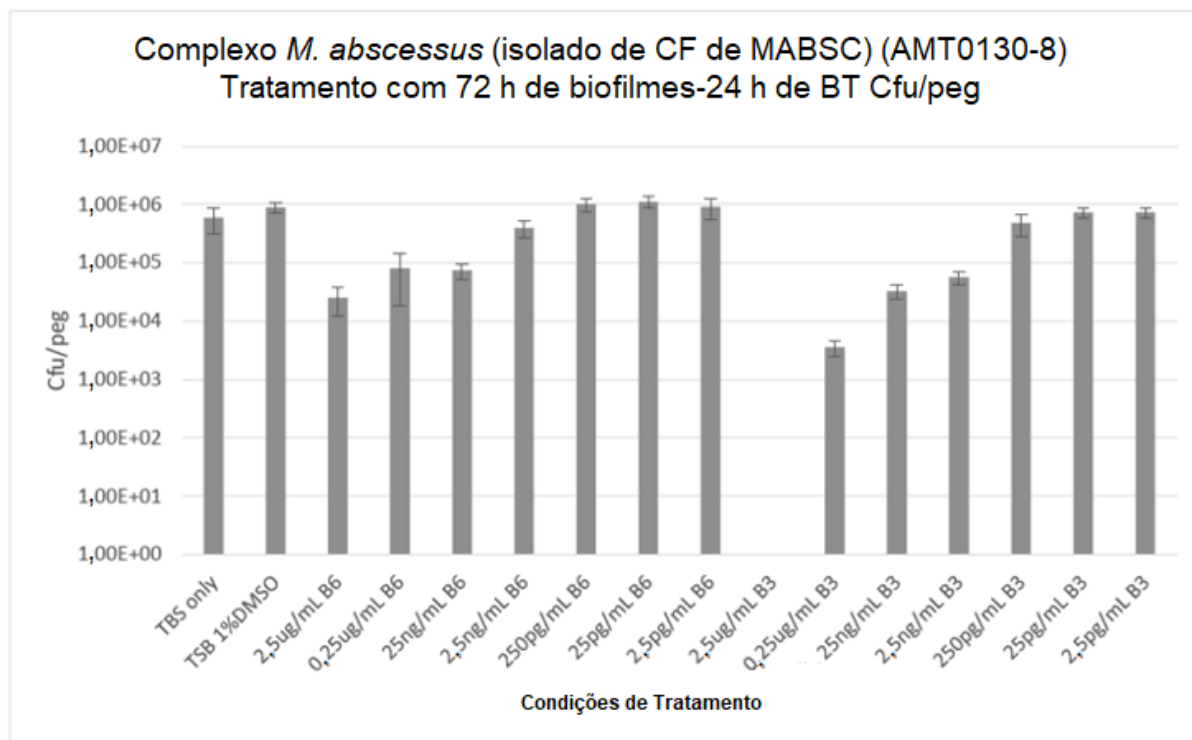


Fig. 18

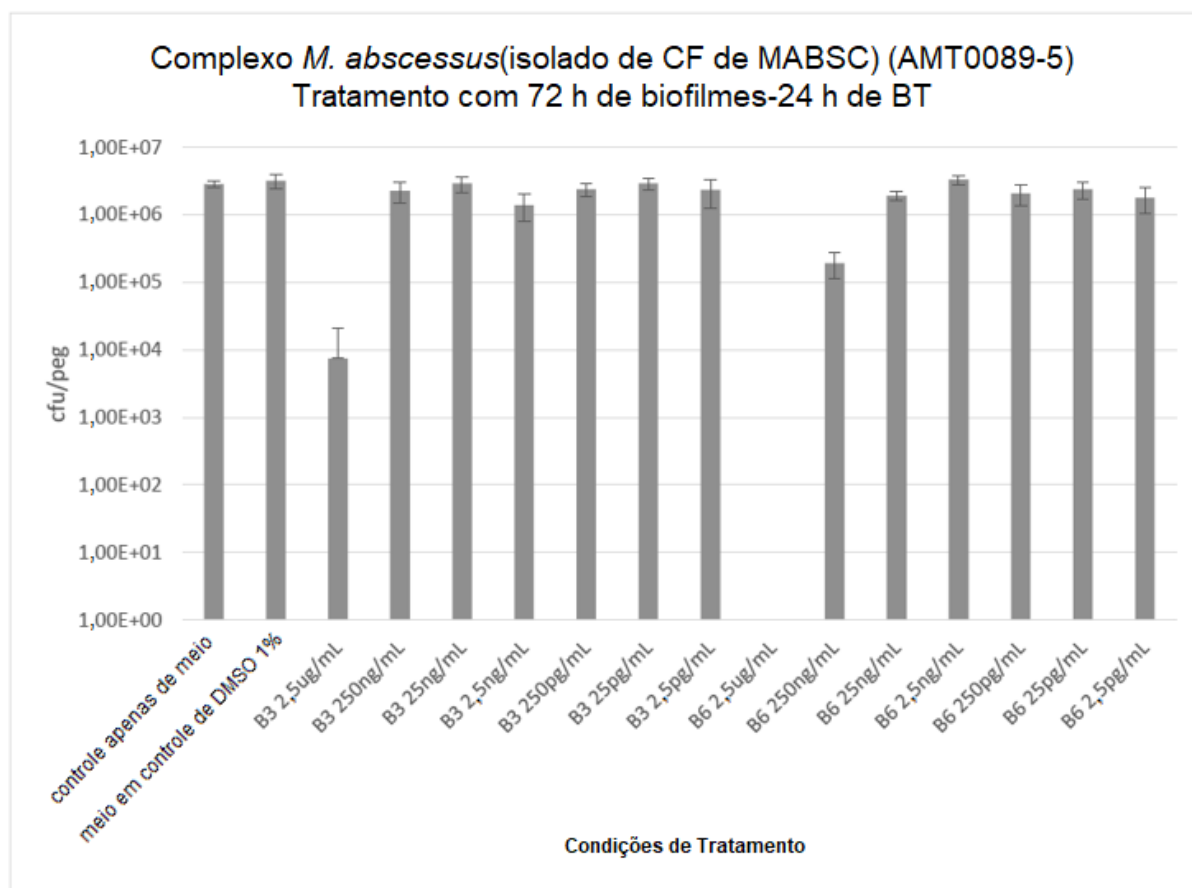


Fig. 19

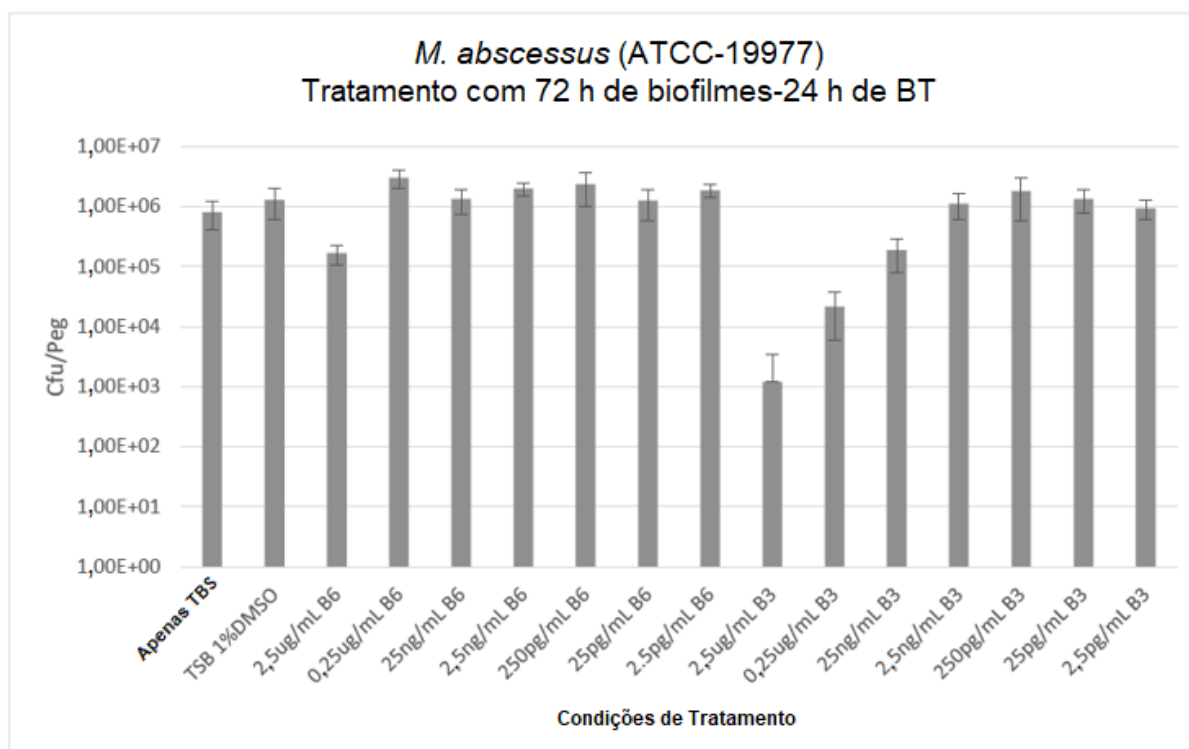


Fig. 20

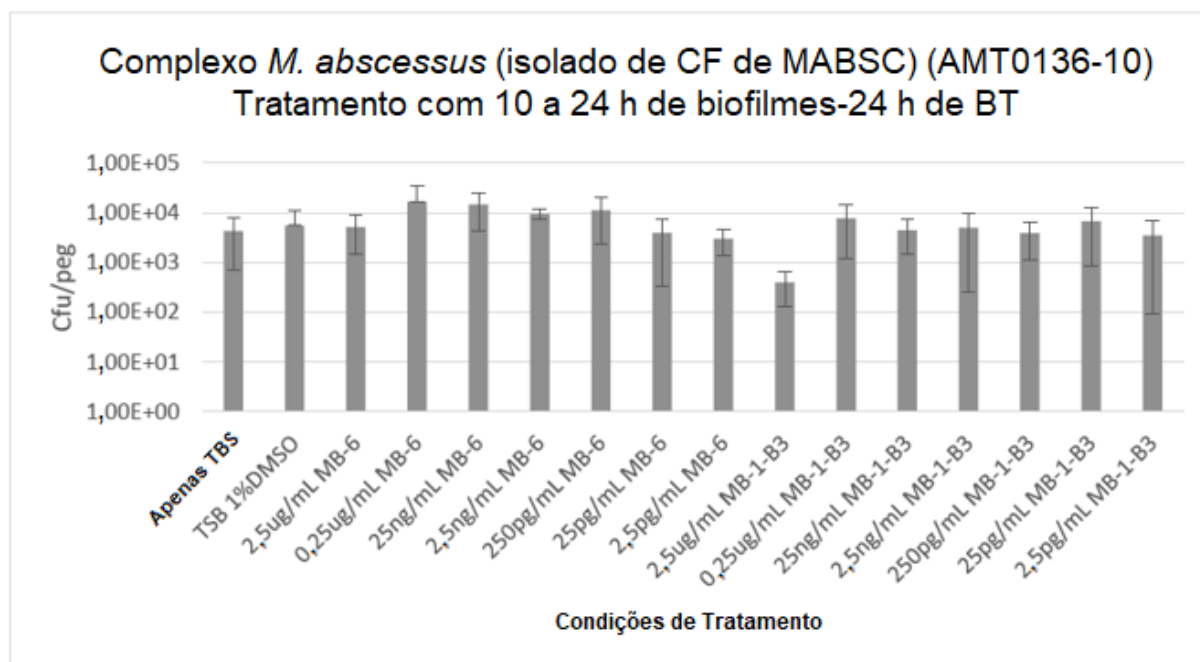


Fig. 21

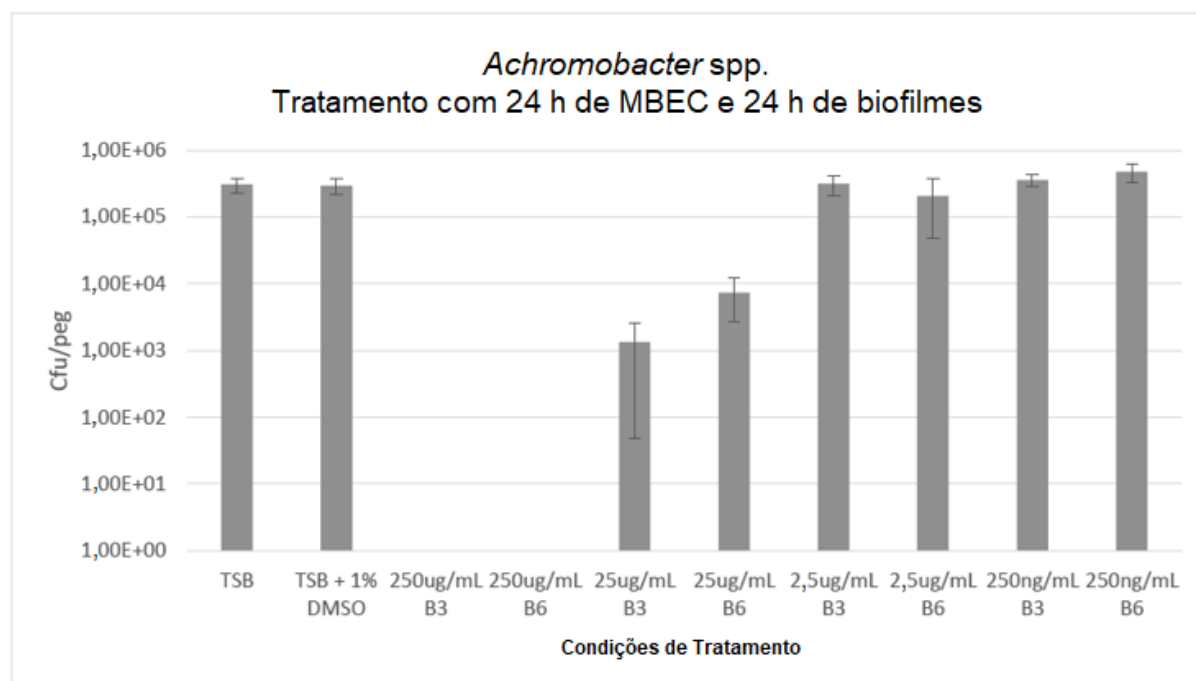


Fig. 22

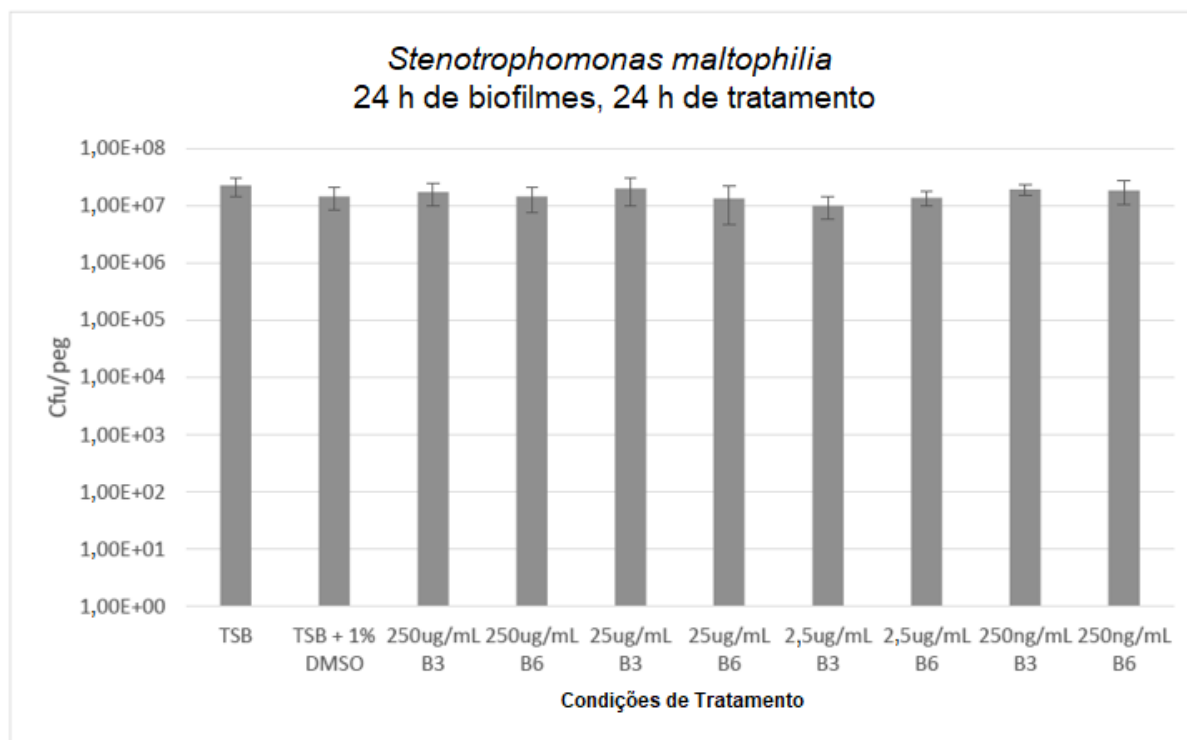


Fig. 23

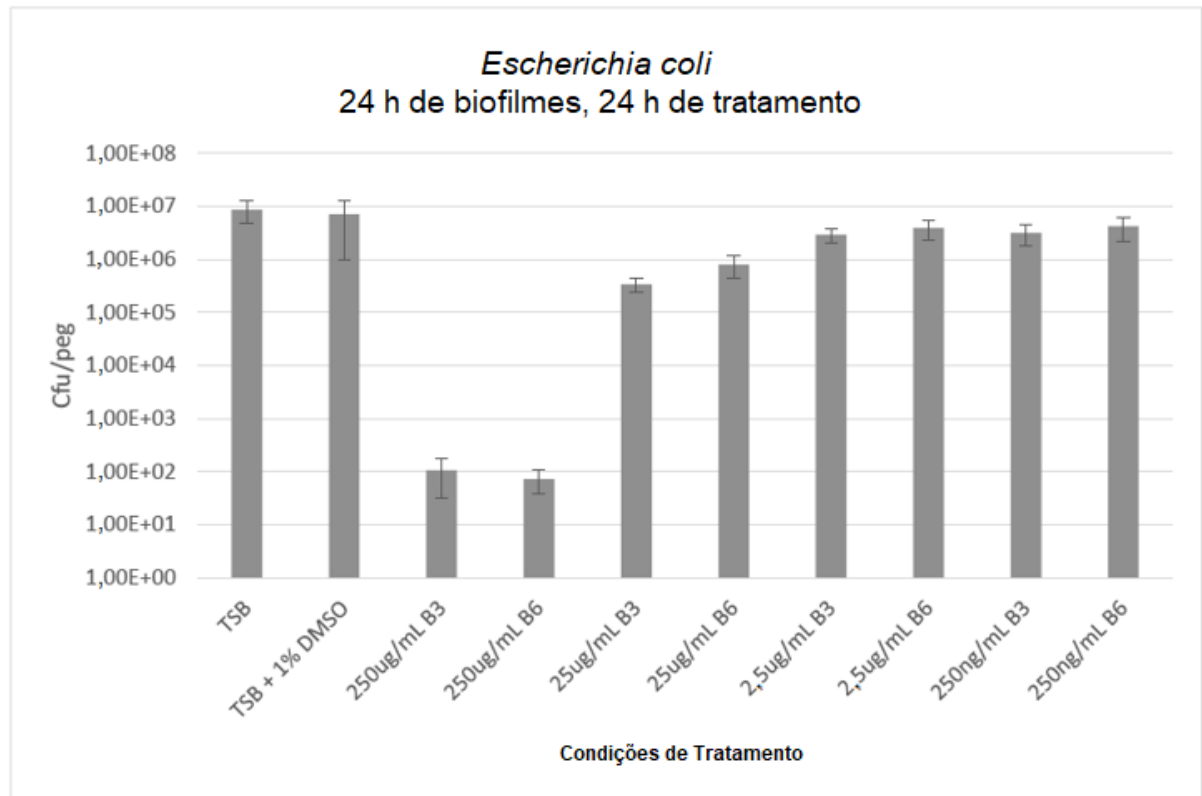
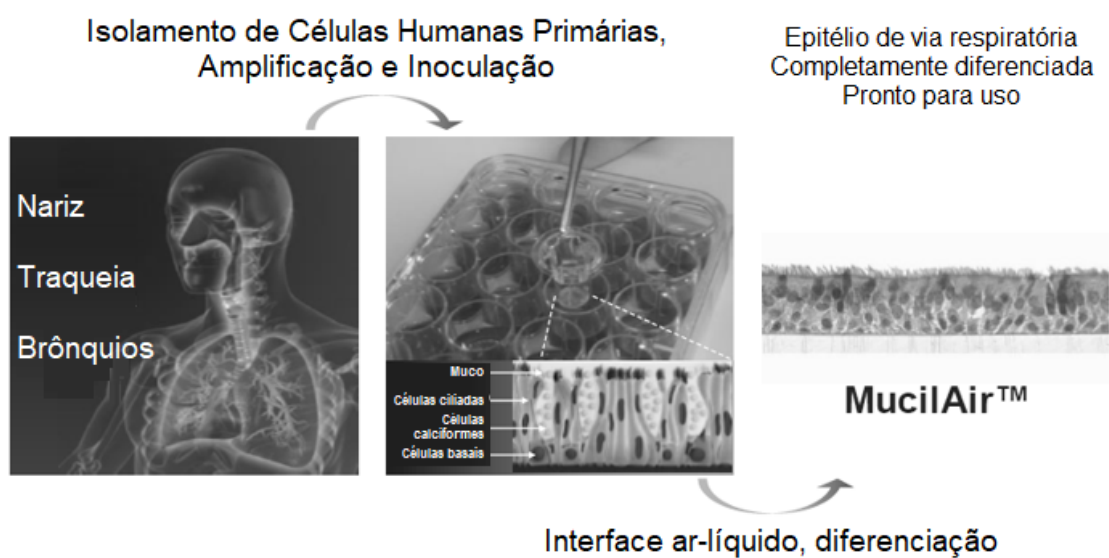


Fig. 24



MucilAir™, um modelo celular in vitro 3D completamente diferenciado dos epitélios de via respiratória humana. As células epiteliais foram recém-isoladas das biópsias (nariz e brônquios), então, semeadas numa membrana semiporosa (Costar Transwell, tamanho de poros 0,4 µm). Após cerca de 45 dias de cultura em interface de ar-líquido, os epitélios foram completamente diferenciados, tanto morfológica quanto funcionalmente.

Fig. 25

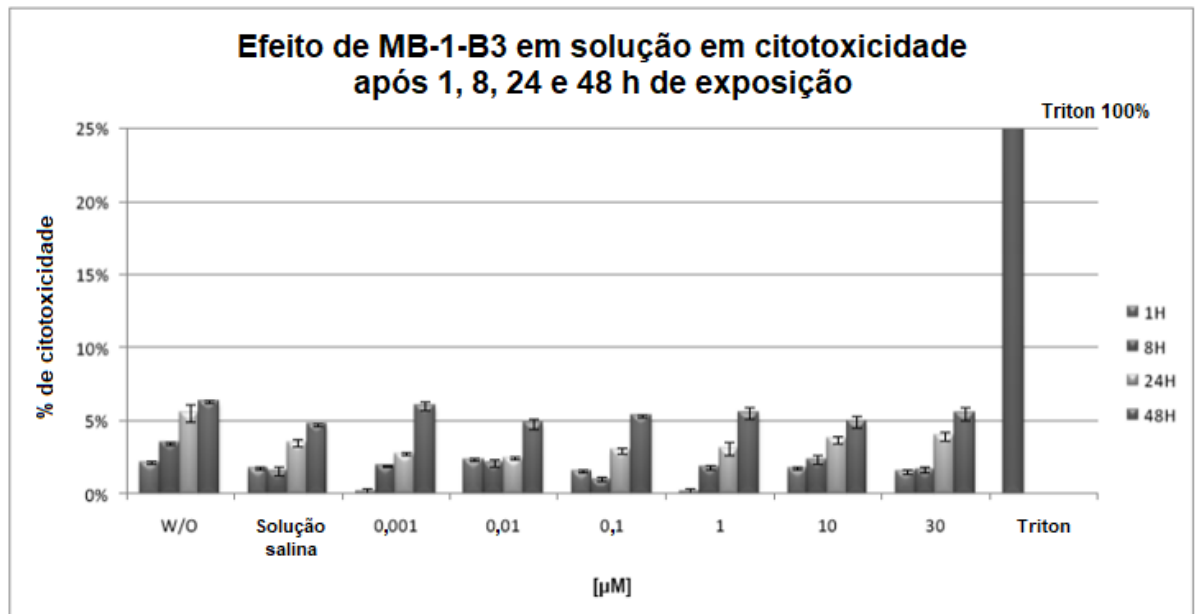


Fig. 26

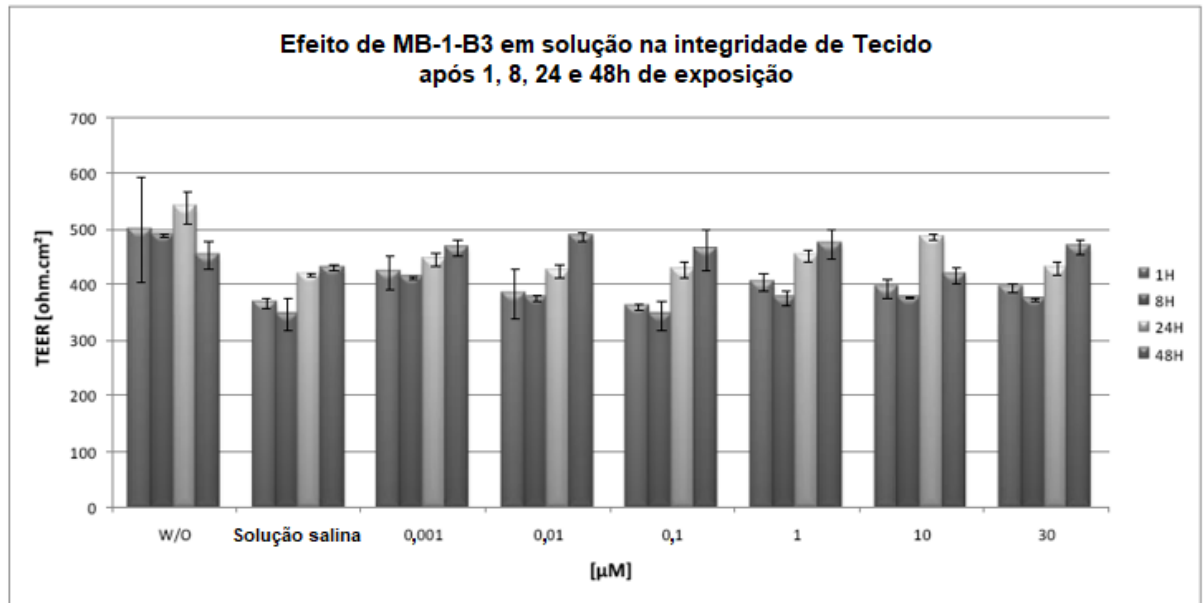


Fig. 27

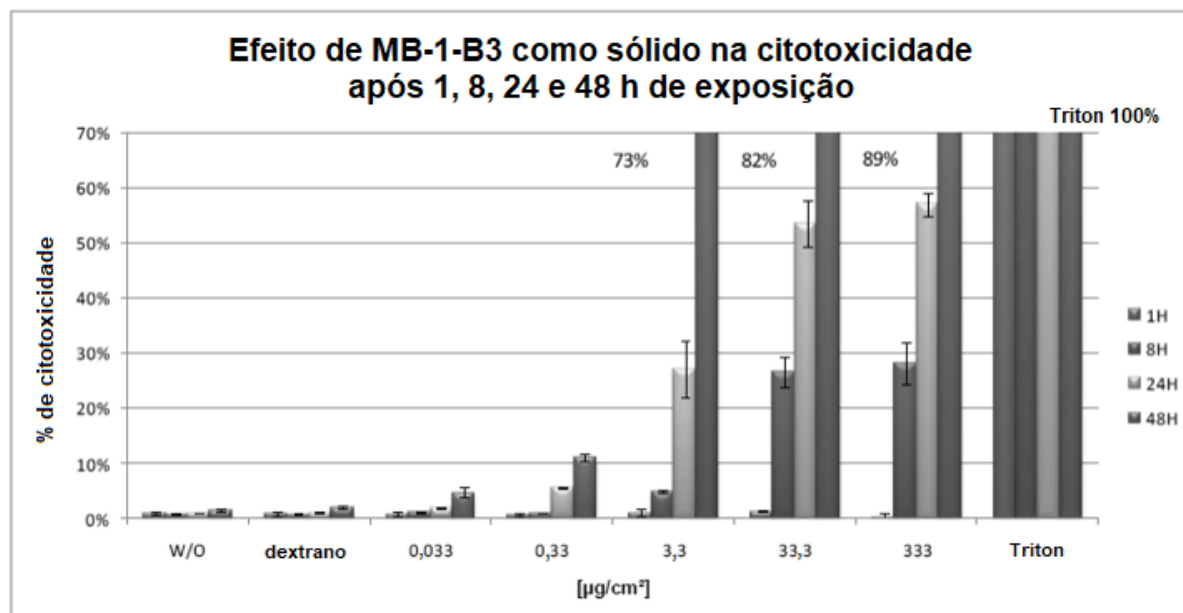


Fig. 28

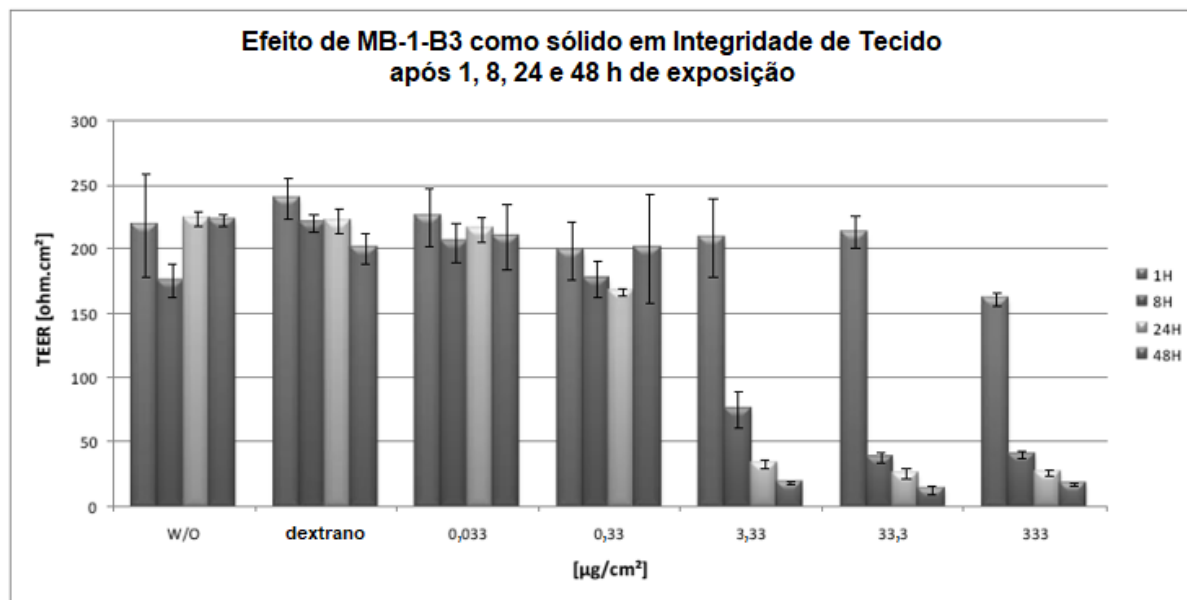


Fig. 29

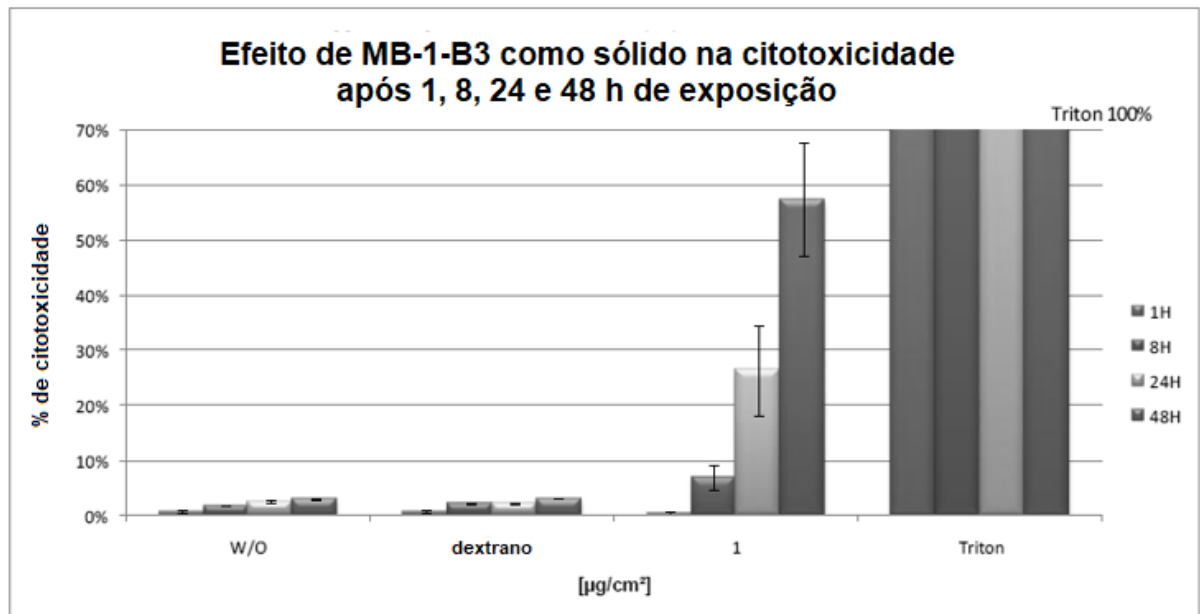


Fig. 30

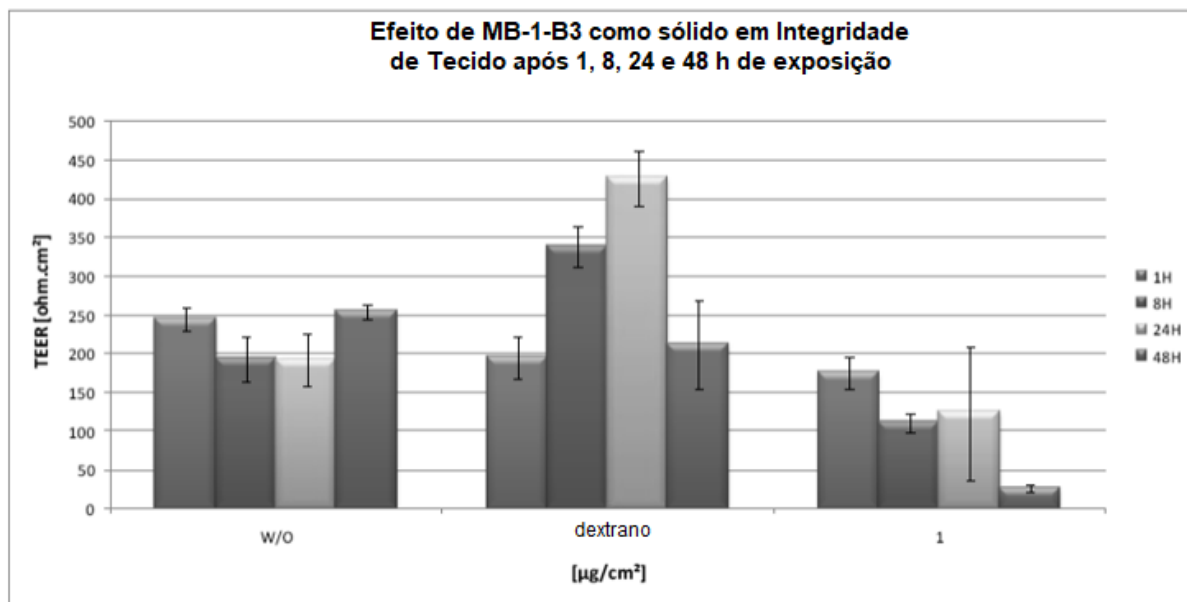


Fig. 31

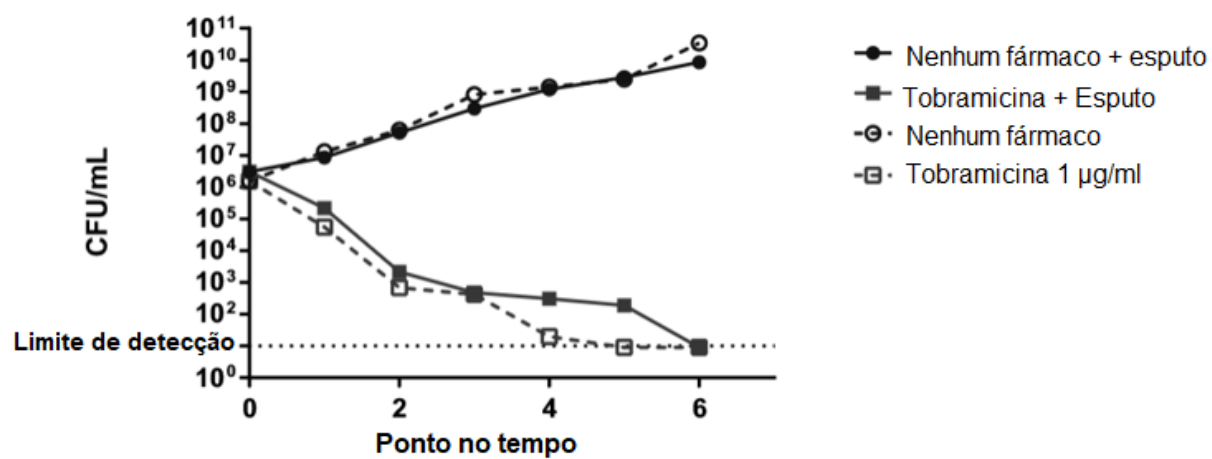


Fig. 32

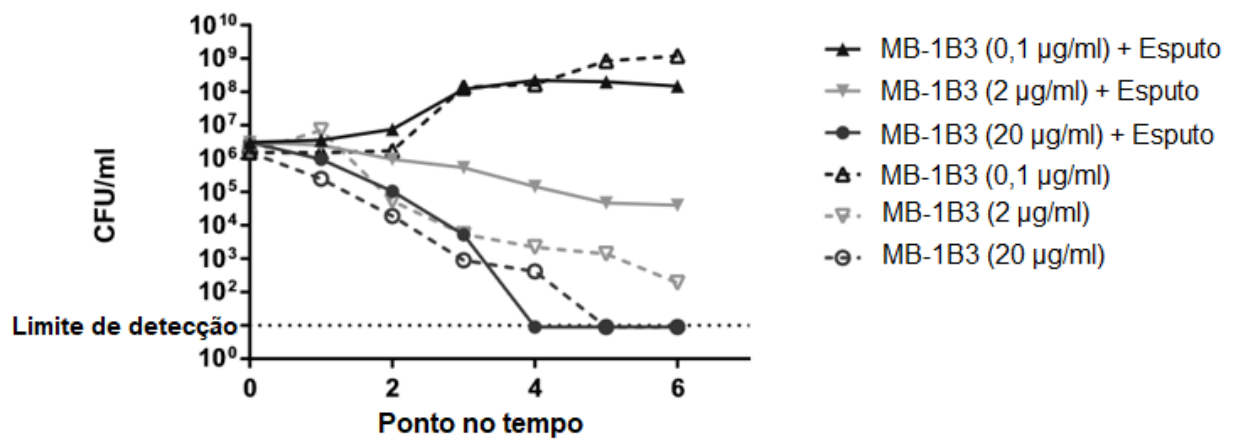


Fig. 33

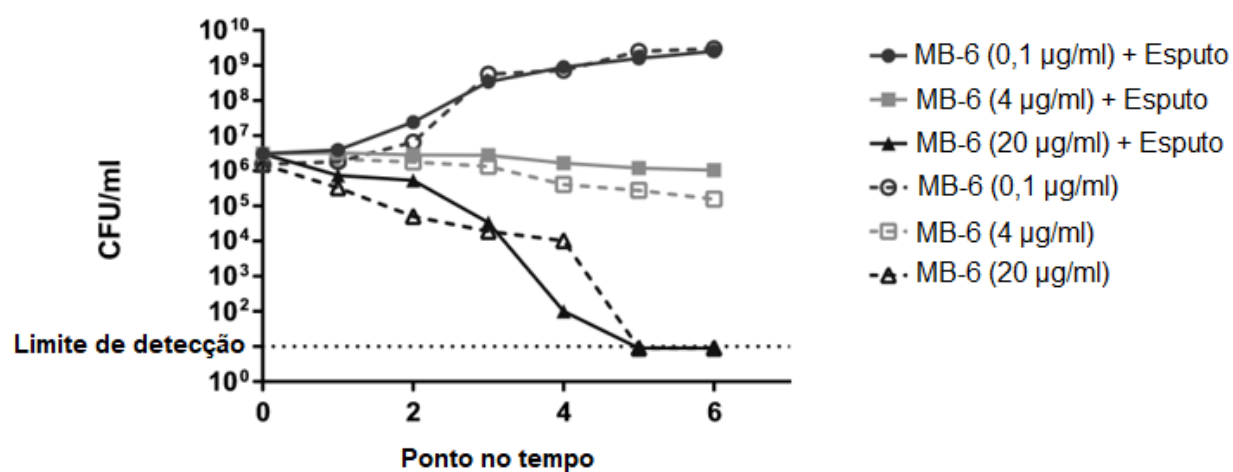


Fig. 34

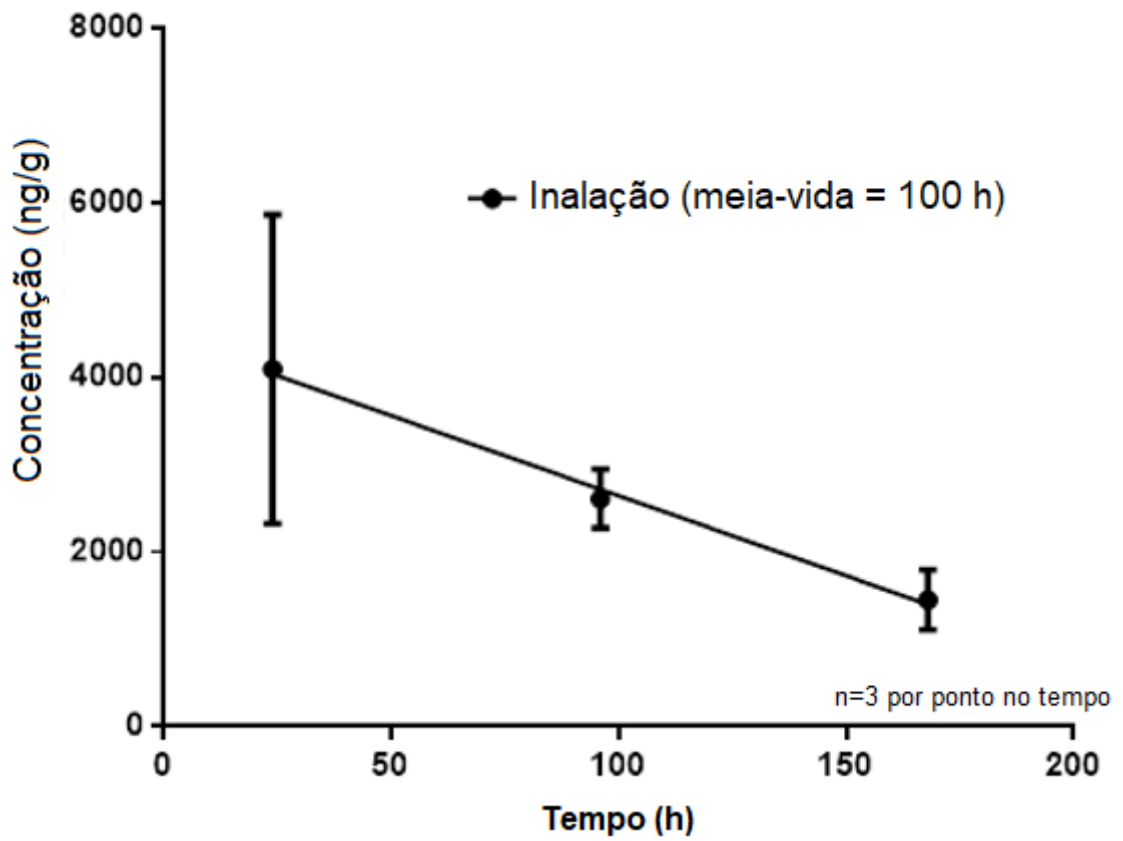


Fig. 35

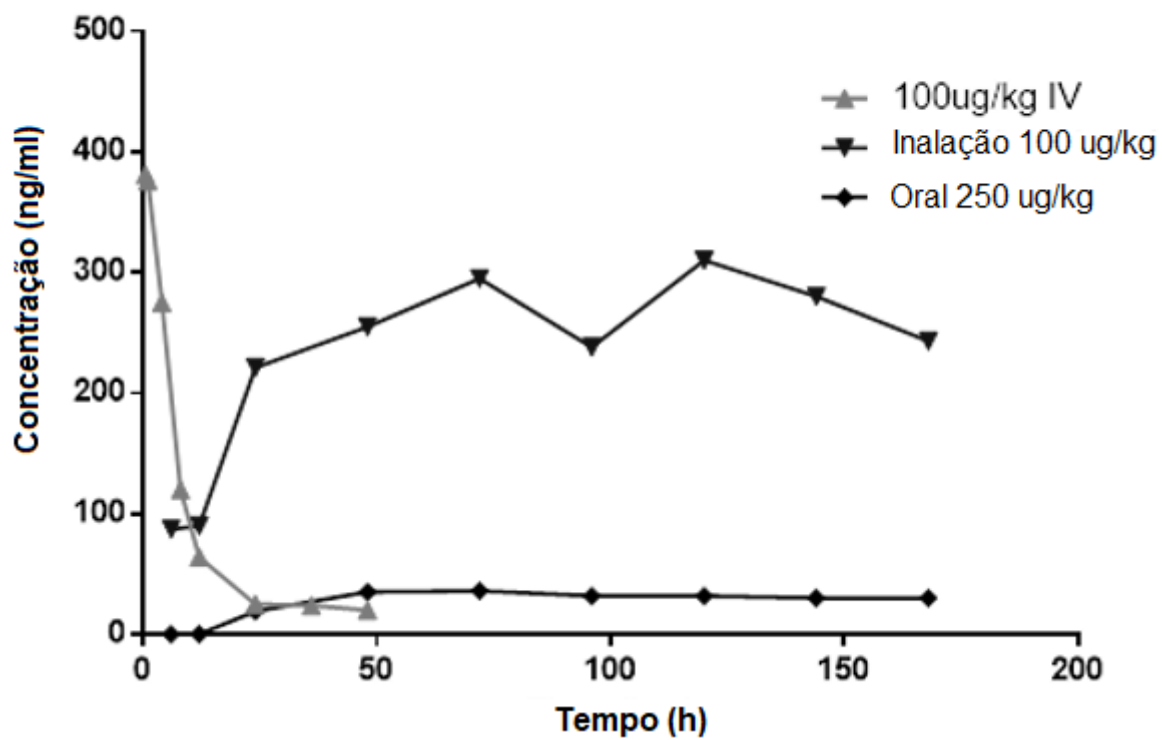


Fig. 36

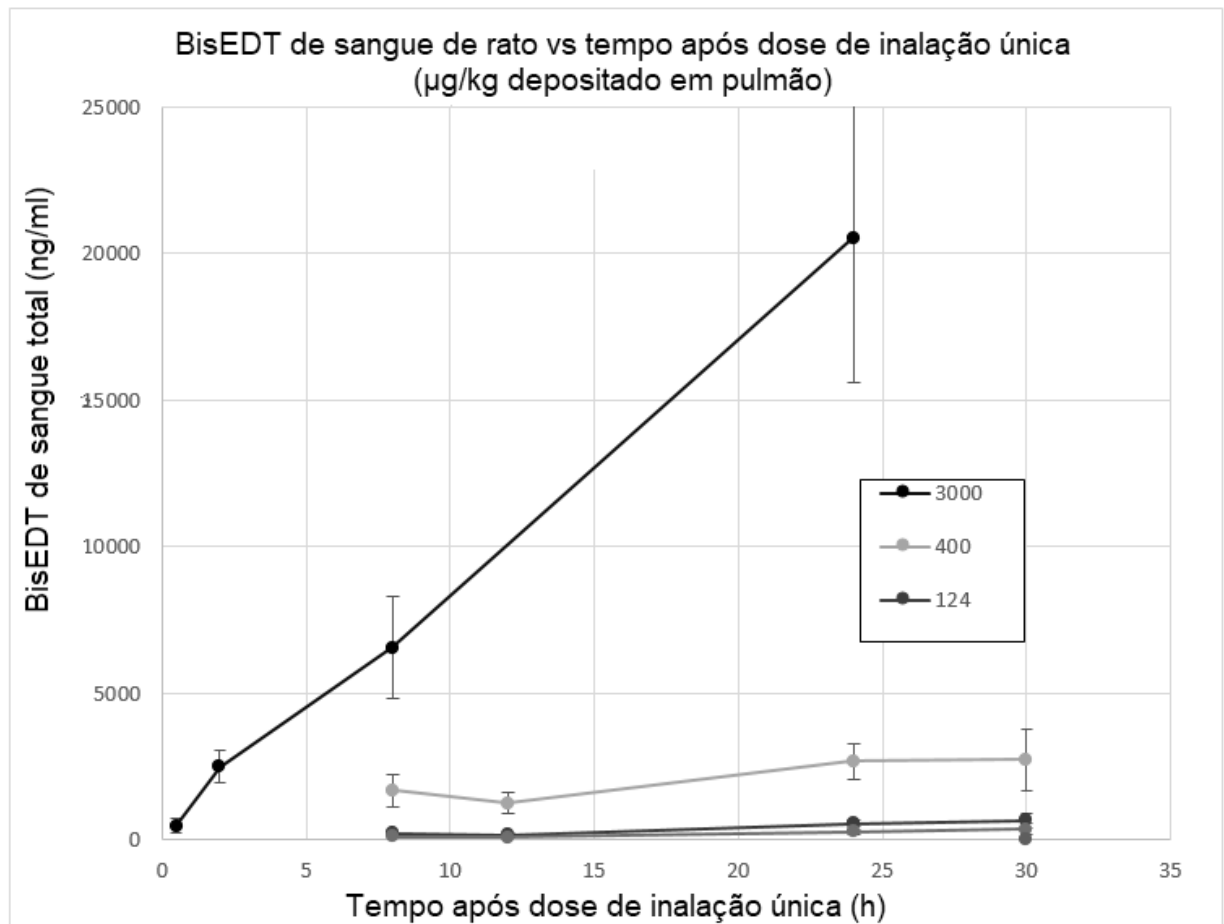


Fig. 37

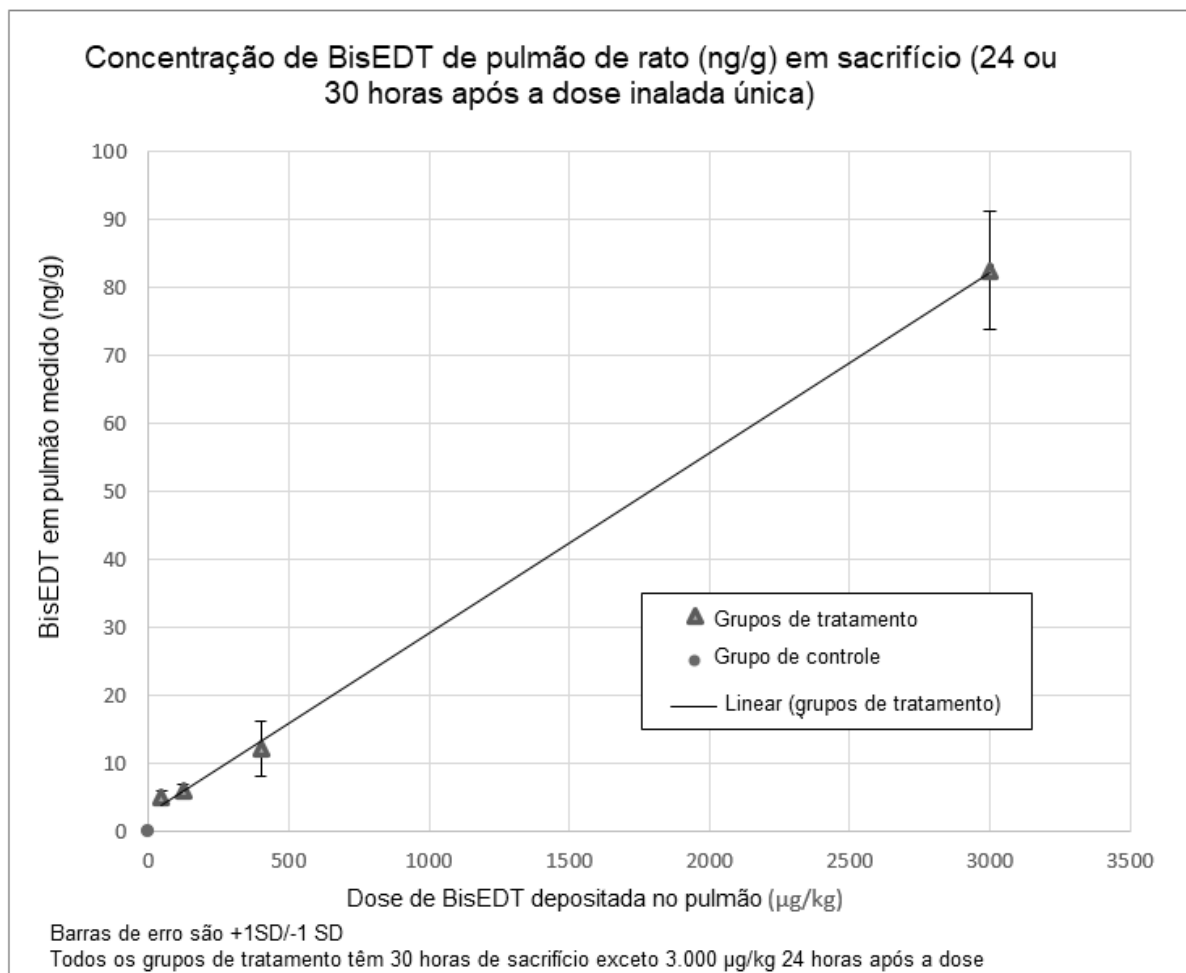


Fig. 38

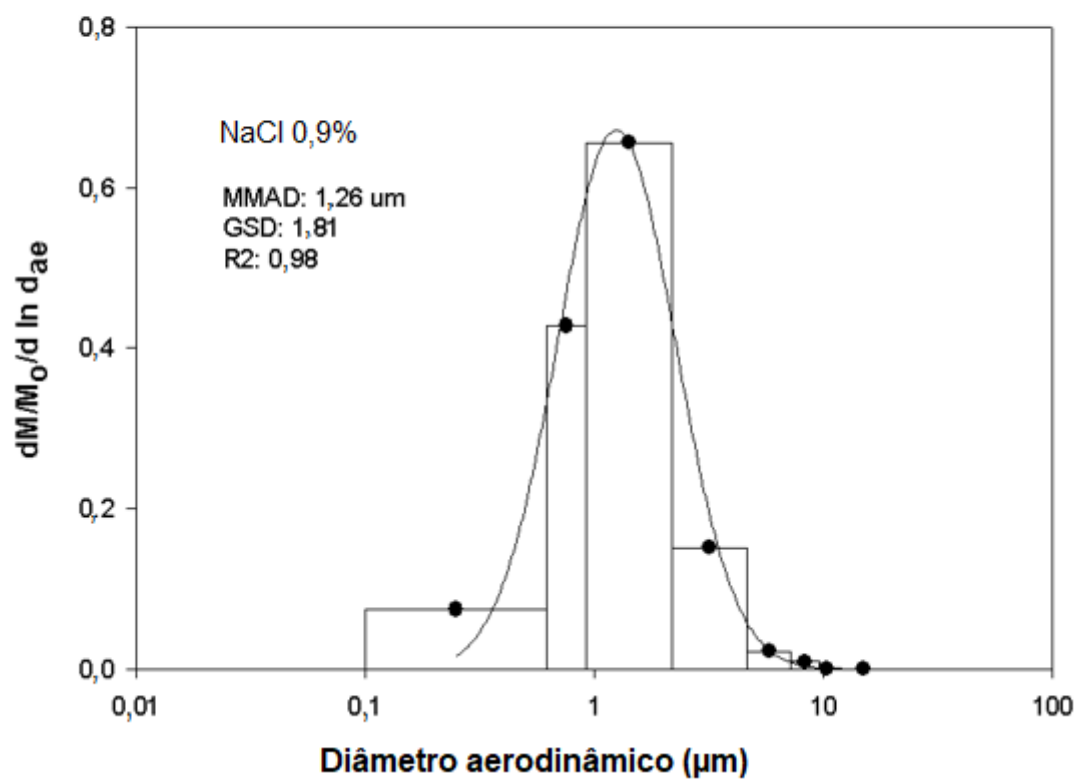
DISTRIBUIÇÃO DE MASSA DE IMPACTADOR EM CASCATA

Fig. 39

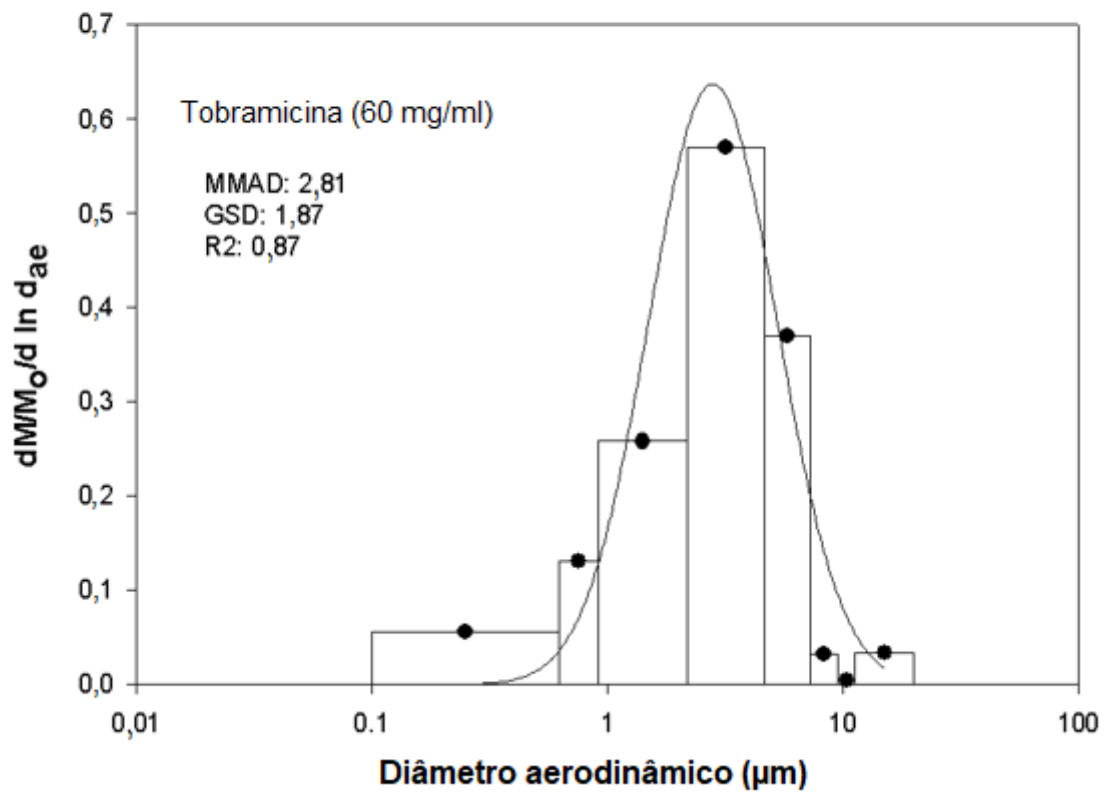
DISTRIBUIÇÃO DE MASSA DE IMPACTADOR EM CASCATA

Fig. 40

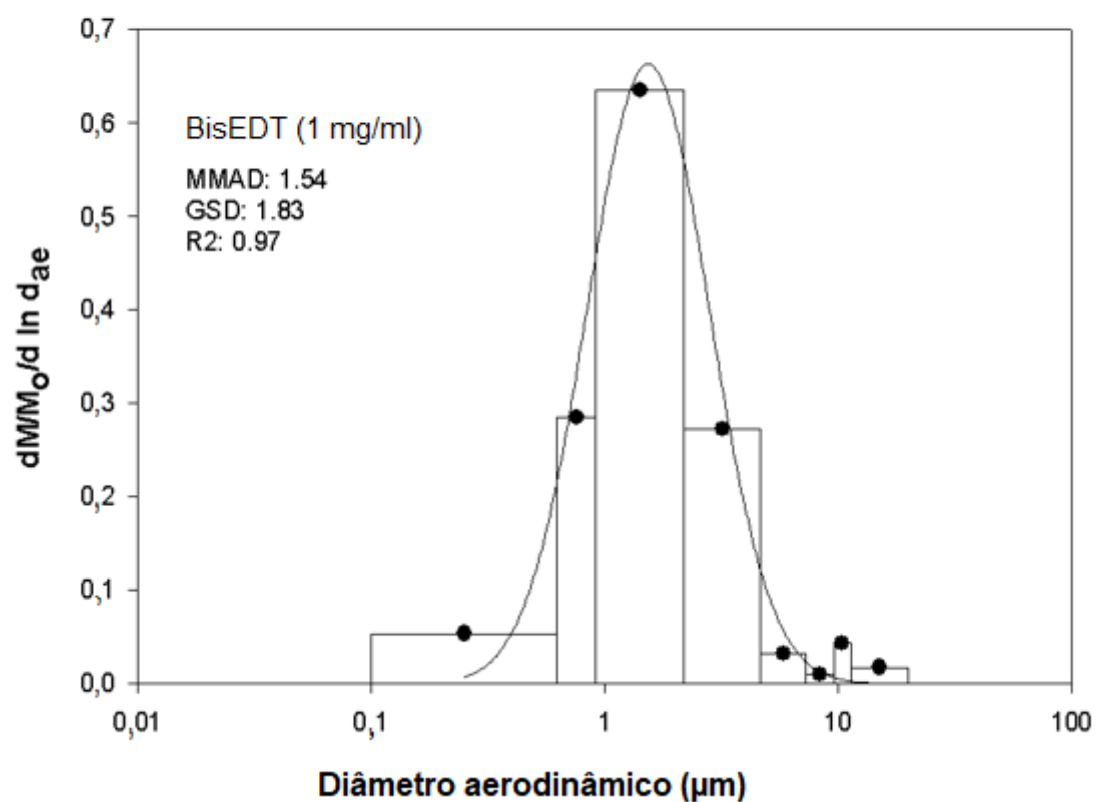
DISTRIBUIÇÃO DE MASSA DE IMPACTADOR EM CASCATA

Fig. 41

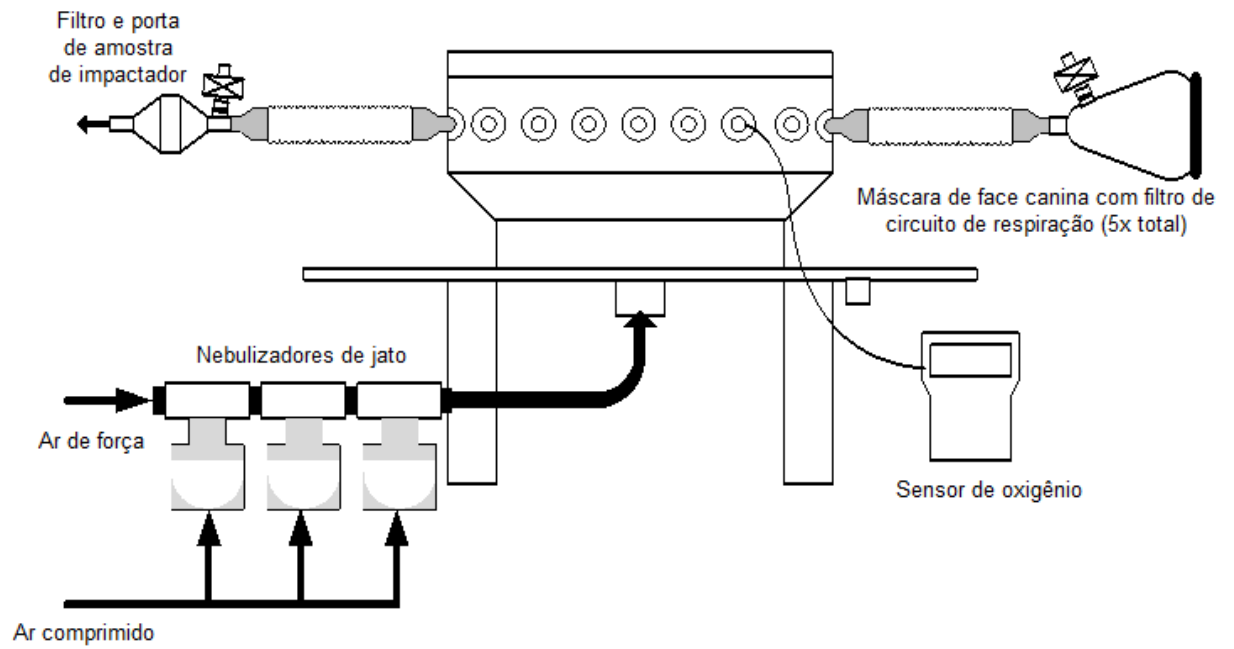


Fig. 42

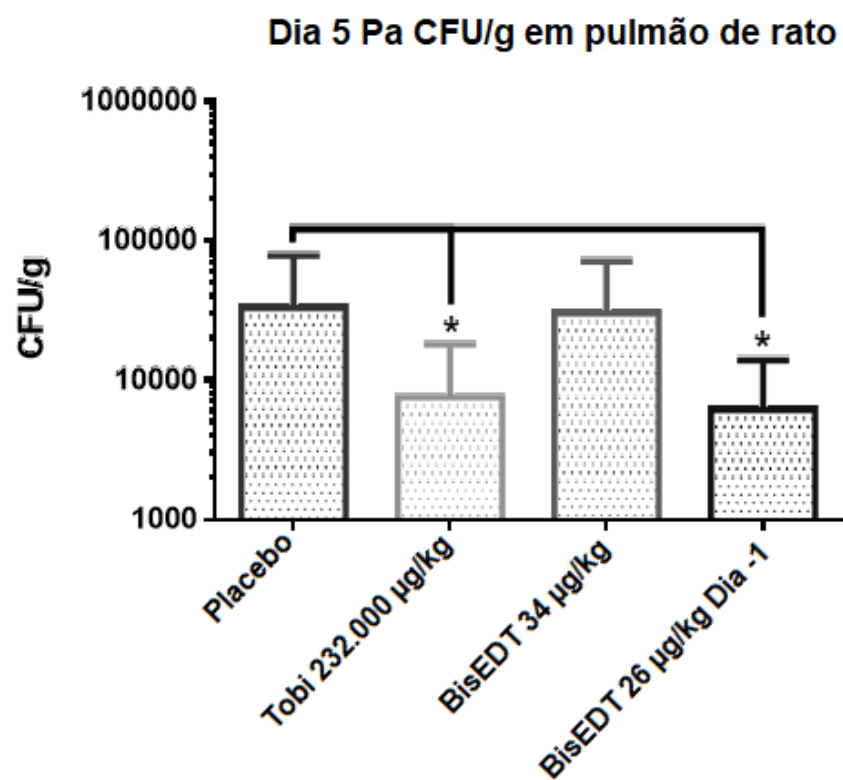
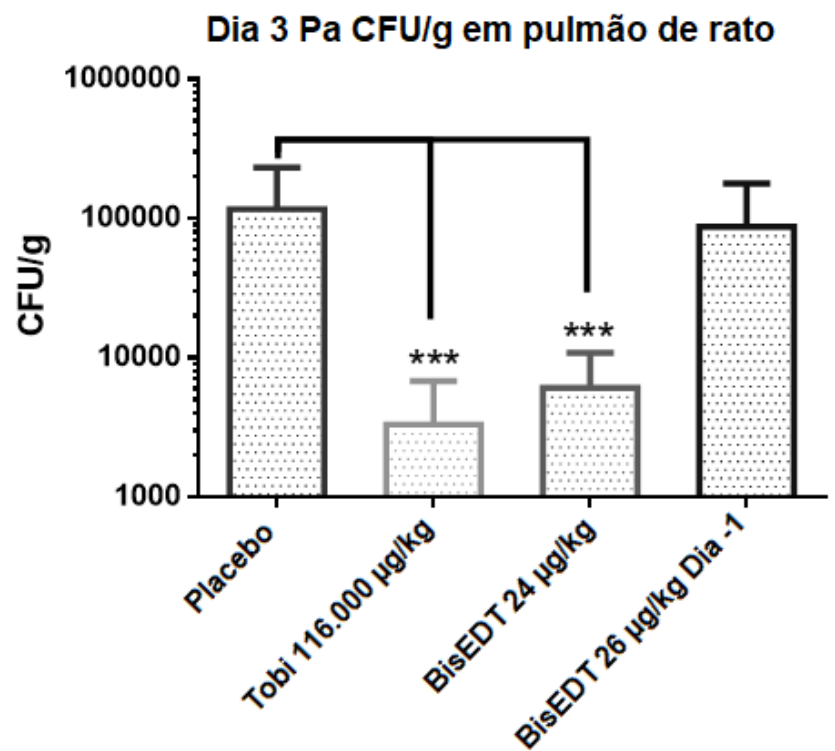


Fig. 43

Org:		Agente de combinação											
Agente de Teste		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	A	64/,5	32/,5	16/,5	8/,5	4/,5	2/,5	1/,5	,5/,5	,25/,5	,12/,5	,06/,5	0/,5
	B	64/,25	32/,25	16/,25	8/,25	4/,25	2/,25	1/,25	,5/,25	,25/,25	,12/,25	,06/,25	0/,25
	C	64/,12	32/,12	16/,12	8/,12	4/,12	2/,12	1/,12	,5/,12	,25/,12	,12/,12	,06/,12	0/,12
	D	64/,06	32/,06	16/,06	8/,06	4/,06	2/,06	1/,06	,5/,06	,25/,06	,12/,06	,06/,06	0/,06
	E	64/,03	32/,03	16/,03	8/,03	4/,03	2/,03	1/,03	,5/,03	,25/,03	,12/,03	,06/,03	0/,03
	F	64/,015	32/,015	16/,015	8/,015	4/,015	2/,015	1/,015	,5/,015	,25/,015	,12/,015	,06/,015	0/,015
	G	64/,008	32/,008	16/,008	8/,008	4/,008	2/,008	1/,008	,5/,008	,25/,008	,12/,008	,06/,008	0/,008
	H	64/0	32/0	16/0	8/0	4/0	2/0	1/0	,5/0	,25/0	,12/0	,06/0	0/0

RESUMO

Patente de Invenção: **"COMPOSIÇÕES DE BISMUTO-TIOL E MÉTODOS DE USO"**.

A presente invenção refere-se a compostos de bis-tiol e a preparações farmacêuticas dos mesmos. A invenção também se refere a métodos para tratar, gerir ou atenuar a gravidade de infecções pulmonares em um indivíduo, sendo que o método compreende administrar ao indivíduo uma composição de bismuto-tiol (BT) que compreende pelo menos um composto de BT.