

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

(22) Data de pedido: 2009.02.09	(73) Titular(es): PROTHERA, INC.	
(30) Prioridade(s): 2008.02.08 US 65186	795 TRADEMARK DR. RENO, NV 89521	US
(43) Data de publicação do pedido: 2010.12.01	(72) Inventor(es): STEPHEN F. OLMSTEAD	US
(45) Data e BPI da concessão: 2017.07.26 220/2017	(74) Mandatário: MARIA TERESA DELGADO AVENIDA DA LIBERDADE, Nº 69, 3º D 1250-140 LISBOA	PT

(54) Epigrafe: **INIBIÇÃO E TRATAMENTO DE BIOFILMES GASTROINTESTINAIS**

(57) Resumo:

COMPOSIÇÕES ANTIBIOFILME FISIOLÓGICAMENTE ACEITÁVEIS ADMINISTRADAS POR VIA ORAL QUE COMPREENDEM ENZIMAS E, CASO SE PRETENDA, COMPONENTES ADICIONAIS TAIS COMO ANTIMICROBIANOS, ANTIBIÓTICOS, ANTIFÚNGICOS, PRODUTOS DERIVADOS DE PLANTAS, AGENTES QUELANTES, LACTOFERRINA E COMPOSTOS RELACIONADOS, MINERAIS, TENSIOATIVOS, AGLUTINANTES E ENCHIMENTOS ÚTEIS PARA A INIBIÇÃO E TRATAMENTO DE BIOFILMES GASTROINTESTINAIS EM HUMANOS. AS COMPOSIÇÕES ANTIBIOFILME FISIOLÓGICAMENTE ACEITÁVEIS QUE CONTÊM ESTAS ENZIMAS SÃO ÚTEIS NA INIBIÇÃO, REDUÇÃO E/OU TRATAMENTO DE INFEÇÕES POR BIOFILMES GASTROINTESTINAIS, E SINTOMAS SISTÊMICOS ASSOCIADOS PROVOCADOS POR MICRORGANISMOS ASSOCIADOS AOS BIOFILMES DENTRO DO TRATO GASTROINTESTINAL. SÃO TAMBÉM PROPORCIONADOS MÉTODOS DE IDENTIFICAÇÃO, PREPARAÇÃO E UTILIZAÇÃO DE TAIS COMPOSIÇÕES ANTIBIOFILME FISIOLÓGICAMENTE ACEITÁVEIS.

RESUMO

"INIBIÇÃO E TRATAMENTO DE BIOFILMES GASTROINTESTINAIS"

Composições antibiofilme fisiologicamente aceitáveis administradas por via oral que compreendem enzimas e, caso se pretenda, componentes adicionais tais como antimicrobianos, antibióticos, antifúngicos, produtos derivados de plantas, agentes quelantes, lactoferrina e compostos relacionados, minerais, tensioativos, aglutinantes e enchimentos úteis para a inibição e tratamento de biofilmes gastrointestinais em humanos. As composições antibiofilme fisiologicamente aceitáveis que contêm estas enzimas são úteis na inibição, redução e/ou tratamento de infecções por biofilmes gastrointestinais, e sintomas sistêmicos associados provocados por microrganismos associados aos biofilmes dentro do trato gastrointestinal. São também proporcionados métodos de identificação, preparação e utilização de tais composições antibiofilme fisiologicamente aceitáveis.

DESCRIÇÃO

"INIBIÇÃO E TRATAMENTO DE BIOFILMES GASTROINTESTINAIS"

Um "biofilme" é um fenómeno bem conhecido e pode ser definido como uma população de células procarióticas em crescimento sobre uma superfície e fechada numa matriz autoproduzida de material polimérico extracelular, a qual medeia a adesão das células entre si e com as superfícies. Os biofilmes não são simplesmente conjuntos passivos de células que estão presos às superfícies, mas são sistemas biológicos estrutural e dinamicamente complexos. Em comparação com as células que são de natureza planctónica, as bactérias que crescem em biofilmes exibem um fenótipo diferente em relação à taxa de crescimento e transcrição de genes. Ver <http://en.wikipedia.org/wiki/Biofilme>.

Os biofilmes indesejados têm sido responsáveis, por exemplo, pela formação de incrustações nas torres de arrefecimento de água, tubos de água, unidades de membranas e plantas de processamento de alimentos. Os biofilmes são notoriamente difíceis de erradicar. Os micróbios nos biofilmes industriais estão protegidos de produtos químicos antimicrobianos, bacteriófagos ambientais e amebas fagocitárias. (Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. Clin Microbiol Rev 2002; 15:167-293.)

Além da sua importância na indústria, os biofilmes podem estar envolvidos numa percentagem significativa de infeções microbianas humanas (Potera C. Forging a link between biofilms and disease. Science 1999;283: 1837-8). Parsek e

Singh propuseram quatro critérios para definir a etiologia de uma infecção por um biofilme: as bactérias patogénicas estão associadas à superfície ou aderentes a um substrato; o exame direto revela bactérias em agregados, contidas dentro de uma matriz de constituintes bacterianos ou do hospedeiro; a infecção está localizada; e a infecção é resistente a terapia de antibióticos apesar da sensibilidade aos antibióticos dos organismos planctónicos constituintes (Parsek MR, Singh PK. Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis. *Annu Rev Microbiol* 2003;57:677-701.)

As infecções por biofilmes podem estar envolvidas na etiologia de cáries dentárias, doença periodontal, fibrose quística (CF) infecções das vias respiratórias, endocardite valvular nativa, prostatite bacteriana crónica, otite média e infecções vaginais. Os microrganismos de biofilmes estão também envolvidos nas infecções relacionadas com implantes, nas quais se formam populações microbianas aderentes sobre as superfícies de cateteres, válvulas cardíacas protéticas, substituições de articulações, e outros dispositivos (Donlan RM. Biofilms and device-associated infections. *Emerg Infect Dis* 2001;7:277-81.)

O trato intestinal proporciona um reservatório para muitas bactérias de biofilmes resistentes a antibióticos, incluindo espécies *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa* e espécies *Acinetobacter* (Donskey CJ. The role of the intestinal tract as a reservoir and source for transmission of nosocomial pathogens. *Clin Infect Dis* 2004;39:219-26.) O agente patogénico oportunista humano, *Pseudomonas aeruginosa*, é uma causa importante de mortalidade relacionada com infecções entre os pacientes

criticamente doentes, e acumula uma das taxas mais elevadas de casos fatais de todas as infeções gram-negativas. Embora se considere tradicionalmente que os pulmões são um sítio principal de infeção por *P. aeruginosa* entre os pacientes criticamente doentes, um número significativo destas infeções surge como consequência da contaminação direta das vias respiratórias pela flora gastrointestinal ou por disseminação hematogénica dos intestinos para o parênquima pulmonar. Os métodos eficazes para a inibição, redução e/ou tratamento de *P. aeruginosa* teriam um impacto significativo para esta condição.

Em relação aos biofilmes no intestino, sabe-se agora que as bactérias podem existir, por exemplo, como biofilmes no epitélio do cólon, dentro da camada de muco que o reveste, e sobre partículas de alimentos no lúmen. (MacFarlane S, MacFarlane GT. Composition and metabolic activities of bacterial biofilms colonizing food residues in the gastrointestinal tract. *Appl Environ Microbiol* 2006;72:6204-II; Probert HM, Gibson GR. Bacterial biofilms in the human gastrointestinal tract. *Curr Issues Intest Microbiol* 2002;3:23-7.) As bactérias associadas a biofilmes gastrointestinais incluem *Bacteroides* ssp., *Clostridium* ssp., *Fusobacterium* ssp., *Klebsiella* ssp., *Espirochaetes* ssp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Helicobacter pylori*, *Bifidobacterium* ssp. E cocos gram-positivos.

A WO 2004/066945 A2 refere-se a composições de enzimas hidrolíticas para reduzir condições tecidulares que envolvem biofilmes, tais como distúrbios gastrointestinais.

A US 6,759,040B1 refere-se à preparação e utilização de misturas de enzimas hidrolíticas de especificidade múltipla que degradam biofilmes.

Assim, tem permanecido por satisfazer uma necessidade de composições melhoradas relacionadas com a redução de biofilmes dentro do intestino de mamíferos. A presente invenção proporciona estas e/ou outras vantagens.

SUMÁRIO

A presente invenção refere-se a uma composição para utilização na inibição ou tratamento de uma infecção por biofilmes gastrointestinais, que compreende combinar uma quantidade farmacologicamente eficaz de uma celulase estável em ácido, uma glucoamilase, um complexo de hemicelulase/pectinase estável em ácido, β -glucanase, um complexo de protease/peptidase que tem atividade de dipeptidil-peptidase IV (DPP-IV), quitosanase, lisozima e peptidase de *Serratia* com, pelo menos, um de um veículo, adjuvante, excipiente, tampão e diluente farmacologicamente aceitável. Assim, as presentes composições, são dirigidas à redução de biofilme(s) gastrointestinal(ais) no intestino de animais.

Na descrição descreve-se métodos que incluem a pesquisa de composições antibiofilme fisiologicamente aceitáveis, incluindo, por exemplo, composições nutracêuticas, terapêuticas ou farmacêuticas, que compreendem enzimas antibiofilme e outros componentes adequados para ingestão oral por mamíferos tais como humanos, e métodos de preparação e utilização ou administração de tais composições. Estes métodos são dirigidos à seleção de

enzimas digestivas em modelos de biofilme para identificar enzimas e composições úteis para as composições antibiofilme fisiologicamente aceitáveis e aos métodos de tratamento aqui discutidos. Tais enzimas podem ser selecionadas como agentes únicos, misturas de agentes ou em combinação com agentes antimicrobianos, agentes quelantes, lactoferrina, produtos derivados de plantas ou outros componentes, consoante for desejado.

As composições antibiofilme fisiologicamente aceitáveis utilizam enzimas digestivas para a inibição e redução do biofilme patogénico no trato gastrointestinal de humanos.

Por exemplo, as composições antibiofilme fisiologicamente aceitáveis e os métodos podem ser dirigidos à utilização de celulasas, hemicelulasas, lisozima, pectinases, amilases, ADNase I, peptidase de Serratia e outras hidrolases que são capazes de digerir a matriz de exopolissacáridos e exoproteínas de biofilmes.

Num aspeto da presente invenção, as presentes composições antibiofilme fisiologicamente aceitáveis são dirigidas a composições antibiofilme fisiologicamente aceitáveis orais para utilização num método de inibição e tratamento de biofilmes gastrointestinais patogénicos em humanos.

As presentes composições antibiofilme fisiologicamente aceitáveis são dirigidas a agentes que são de origem alimentar, de origem hídrica ou são nosocomiais. Além disso, as infeções por biofilmes podem ser resistentes a antibióticos e/ou recorrentes. As composições antibiofilme fisiologicamente aceitáveis podem ser utilizadas em conjunto com antibióticos ou antimicrobianos. Além disso,

estas composições antibiofilme fisiologicamente aceitáveis podem ser utilizadas em doentes cujas infeções por biofilmes não responderam aos antibióticos ou antimicrobianos.

Estes e outros aspetos, características e formas de realização são definidos neste pedido, que inclui a seguinte Descrição Detalhada. A menos que expressamente especificado de outro modo, todas as formas de realização, aspetos, características, etc., podem ser misturadas e combinadas, associadas e permutadas, de qualquer maneira pretendida.

DESCRIÇÃO DETALHADA

Os biofilmes gastrointestinais em mamíferos têm sido implicados numa variedade de doenças possíveis, quer como originando essas doenças ou piorando-as. As presentes composições são dirigidas à redução de biofilme(s) gastrointestinal(ais) no intestino de animais e são para uso em métodos que incluem a inibição, tratamento ou redução de biofilmes no sistema gastrointestinal.

Seleção de Enzimas Antibiofilme

Os dispositivos de biofilme, tais como o Dispositivo de Biofilme Calgary (Ceri et al, 1999; US 7,041,470) podem ser modificados, por exemplo, para serem utilizados em conjunto com os métodos supramencionados, para identificar composições antibiofilme fisiologicamente aceitáveis, para seleccionar enzimas que (a) são disponíveis por via oral; (b) são geralmente reconhecidas como seguras (GRAS); (c) que se sabe ou que se possa estabelecer que retêm a sua

atividade durante a passagem através do estômago; e (d) são ativas na rutura de biofilmes em sistemas de modelo. Pode utilizar-se outros dispositivos que sejam adequados para o estudo de biofilmes que afetam os humanos. Como discutido em Ceri, um Dispositivo de Biofilme Calgary (CBD) proporciona um ensaio rápido e reprodutível para a suscetibilidade de biofilmes a antibióticos utilizando 96 biofilmes equivalentes numa placa de 96 poços padrão (ou outro número adequado, consoante for desejado), cujos biofilmes são em seguida expostos aos antibióticos sob investigação. Na presente discussão, tais biofilmes de seleção são expostos a concentrações de enzimas como aqui discutidas. A formação de biofilmes pode ser, por exemplo, seguida de microbiologia quantitativa e microscopia eletrónica de varrimento.

Enzimas Ilustrativas que Tratam ou Inibem Biofilmes

O crescimento bacteriano sobre uma superfície gastrointestinal envolve frequentemente a autoprodução de uma matriz extracelular rica em polissacáridos que proporciona suporte estrutural para a formação de comunidades de biofilmes. As enzimas que rompem as matrizes de biofilme destes organismos dentro do trato gastrointestinal são o objeto dos presentes métodos.

A(s) enzima(s) particular(es) a ser(em) utilizada(s) pode(m) ser selecionada(s) de acordo com as propriedades, se conhecidas, do biofilme específico a ser removido, ou pode utilizar-se uma combinação de várias enzimas com diferentes atividades enzimáticas. A composição da matriz extracelular é complexa e variável entre diferentes espécies bacterianas e mesmo dentro da mesma espécie em

diferentes condições ambientais. Apesar da sua composição heterogênea, os exopolissacáridos são um composto típico da matriz do biofilme, que proporcionam a estrutura onde são inseridas as células microbianas. Entre os muitos exopolissacáridos diferentes que foram descritos, a celulose e a β -1,6-acetilglicosamina ligada por N parecem ser os componentes mais comuns da matriz do biofilme de muitas bactérias diferentes.

Num aspeto, as composições antibiofilme fisiologicamente aceitáveis adequadas compreendem, preferencialmente, uma quantidade de agentes anti- β -1,6-N-acetil-D-glicosamina polimérica (poli- β -1,6-GlcNAc) que dispersam substancialmente a poli- β -1,6-GlcNAc e são assim capazes de degradar significativamente o biofilme. Por exemplo, ver Itoh Y, Wang X, Hinnebusch BJ, Preston JF, Romeo T. Depolymerization of β -1,6-N-acetyl-D-glucosamine disrupts the integrity of diverse bacterial biofilms. *J Bacteriol* 2005;187;382-7). Nalgumas formas de realização, para este e outros agentes, quer sozinhos ou em combinação, uma tal redução significativa significa, se medida in vitro, uma redução log de 1, tipicamente 1,5, ou 3,0-3,8 ou melhor. In vivo, essa redução significativa pode ser uma redução substancial de um ou mais sintomas associados a uma infeção por biofilmes, ou mesmo uma eliminação substancial de um ou mais sintomas associados a uma infeção por biofilmes. Os agentes anti-GlcNAc ilustrativos incluem uma β -hexosaminidase e uma enzima dispersante de biofilmes de *A. actinomycetemcomitans*, DspB ou dispersina B, que hidrolisa especificamente as ligações glicosídicas de poli- β -1,6-GlcNAc e rompe o biofilme bacteriano (Kaplan JB, Ragunath C, Ramasubbu N, Fine DH. 2003. Detachment of *Actinobacillus actinomycetem comitans* biofilm cells by an endogenous β -

hexosaminidase activity. J Bacteriol 2003;185:4693-8) anteriormente identificadas. A dispersina B dissocia o polímero de $\beta(1,6)$ -acetilglicosamina ligada por N utilizando uma maquinaria catalítica semelhante a outra família de 20 hexosaminidases que dissociam resíduos de $\beta(1,4)$ -acetilglicosamina ligada por N. A dispersina B e hexosaminidases semelhantes com atividade em biofilmes são adequadas para utilização nos métodos e composições antibiofilme fisiologicamente aceitáveis aqui discutidos. Os agentes anti-poli- β -1,6-GlcNAc podem ser utilizados em conjunto com celulase, discutida mais abaixo.

De acordo com a presente invenção, as composições antibiofilme fisiologicamente aceitáveis compreendem uma celulase numa quantidade capaz de degradar significativamente o biofilme. Essas celulasas podem ter atividade contra, por exemplo, a celulose num biofilme de salmonela ou outros. Celulase refere-se a uma classe de enzimas produzidas principalmente por fungos, bactérias e protozoários que catalisam a hidrólise de celulose. No entanto, existem também celulasas produzidas por outros tipos de organismos, tais como plantas e animais. Sabe-se que as celulasas que têm sido utilizadas como enzimas digestivas são estáveis em ácidos. Estas incluem, mas não se limitam às celulasas das espécies de *Aspergillus*. Conhece-se vários tipos diferentes de celulasas que diferem estrutural e mecanisticamente. O número EC para este grupo de enzimas é EC 3.2.1.4. A reação catalisada é a endo-hidrólise das ligações 1,4- β -D-glicosídicas na celulose. Outros nomes para a celulase são: Endoglucanase, endo-1,4- β -glucanase, carboximetilcelulase, endo-1,4- β -D-glucanase, β -1,4-glucanase, β -1,4-endoglucano-hidrolase, celudextrinase, avicelase. As celulasas têm sido utilizadas

in vitro na rutura de biofilmes em implantes médicos sob condições de pH ácido (Loiselle M, Anderson KW, The use of cellulase in inhibiting biofilm formation from organisms commonly found on medical implants. Biofouling 2003;19:77-85.) Em formas de realização típicas, a(s) presente(s) celulase(s) são resistentes à desnaturação/inativação a uma gama de pH de 1,0 a 5,0 e 10 a 14, possui/possuem atividade hidrolítica ao longo de uma gama de pH de 1 a 14, tem/têm atividade hidrolítica eficaz no ambiente gástrico a um pH em jejum de 1,0 a 3,0 e na presença de alimentos e outro material ingerido, e/ou possui atividade hidrolítica eficaz a um pH de 6,5 a 7,5 que inclui o pH fisiológico no intestino delgados e cólon.

As fontes comerciais de celulasas, hemicelulasas e outras enzimas que podem ser utilizadas incluem as seguintes: Deerland Enzymes, Kennesaw, GA (www.deerland-enzymes.com); National Enzyme Company (www.nationalenzyme.com). Specialty Enzymes (www.specialtyenzymes.com); e outras. As enzimas podem ser derivadas de qualquer fonte adequada, tal como fontes vegetais, bacterianas, fúngicas ou animais.

De acordo com a presente invenção, a composição antibiofilme fisiologicamente aceitável compreende celulase, glucoamilase, complexo de hemicelulase/pectinase, β -gluconase, um complexo de protease/peptidase que tem atividade de dipeptidil-peptidase IV (DPP-IV), quitosanase, lisozima e peptidase de Serratia com pelo menos um veículo, diluentes, excipientes, tampões ou adjuvantes farmacologicamente aceitáveis. Os veículos ou diluentes, excipientes, tampões, adjuvantes farmacologicamente aceitáveis, e semelhantes são não tóxicos para os recetores às dosagens e concentrações utilizadas.

Numa outra forma de realização, a quantidade de celulase por dose oral é de cerca de 100-300 CU e tipicamente de cerca de 200 CU; a quantidade de complexo de hemicelulase/pectinase é de cerca de 60-100 HSU, e tipicamente cerca de 80 HSU; a quantidade de β -gluconase é de cerca de 6-10 BGU, e tipicamente cerca de 8 BGU; a quantidade de protease ácida é de cerca de 15-25 SAP, e tipicamente cerca de 20 SAP; e a quantidade de protease alcalina é de cerca de 15-25 HUT, e tipicamente cerca de 20 HUT.

Ainda noutras formas de realização, a quantidade de celulase por dose oral varia desde 1 a 10 000 CU, a quantidade de complexo de hemicelulase/pectinase varia desde 1 a 8 000 HSU, a quantidade de β -gluconase varia desde 1 a 1000 BGU, a quantidade de protease ácida varia desde 1 a 10 000 SAP, e a quantidade de protease alcalina varia desde 1 a 40 000 HUT.

Numa outra forma de realização, a composição antibiofilme fisiologicamente aceitável compreende adicionalmente e qualquer um ou mais dos seguintes numa quantidade capaz uma quantidade capaz de degradar significativamente o biofilme: dissacáridos, amilase, α -amilase, β -amilase, endoglucanase, xilanase, lipase, bromelina, papaína, ficina, protease de kiwi, protease ou proteinase derivada de qualquer planta, ou fitase.

Numa outra forma de realização, a composição antibiofilme fisiologicamente aceitável contém adicionalmente qualquer uma ou mais das seguintes enzimas específicas numa quantidade capaz de degradar o biofilme: 1,2-1,3- α -D-manano

mano-hidrolase, 1,3- β -D-xilano xilano-hidrolase, 1,3- β -D-glucano glucano-hidrolase, 1,3(1,3;1,4)- α -D-glucano 3-glucano-hidrolase, 1,3(1,3;1,4)- β -D-glucano 3(4)-glucano-hidrolase, 1,3-1,4- α -D-glucano 4-glucano-hidrolase, 1,4- α -D-glucano glucano-hidrolase, 1,4- α -D-glucano gluco-hidrolase, 1,4-(1,3:1,4)- β -D-glucano 4-glucano-hidrolase, 1,4- β -D-glucano gluco-hidrolase, 1,4- β -D-xilano xilano-hidrolase, 1,4- β -D-manano manano-hidrolase, 1,5- α -L-arabinano-hidrolase, 1,4- α -D-glucano malto-hidrolase, 1,6- α -D-glucano 6-glucano-hidrolase, 2,6- β -fructano fructano-hidrolase, α -dextrina 6-glucano-hidrolase, α -D-galactosídeo galacto-hidrolase, α -D-glucosídeo gluco-hidrolase, α -D-manosídeo mano-hidrolase, acilneuraminil-hidrolase, polissacárido capsular de *Aerobacter* galacto-hidrolase, β -D-fructofuranosídeo fructo-hidrolase, B-D-fucosídeo fuco-hidrolase, α -D-fructano fructo-hidrolase, β -D-galactosídeo galacto-hidrolase, β -D-glucosídeo gluco-hidrolase, β -D-glucuronosídeo, glucuronoso-hidrolase, β -D-manosídeo mano-hidrolase, β -N-acetil-D-hexosaminida N-acetil-hexosamino-hidrolase, sulfato de celulose sulfo-hidrolase, collagenase, dextrina 6- α -D-glucano-hidrolase, glicoproteína-fosfatidilinositol fosfatido-hidrolase, hialuronato 4-glicano-hidrolase, hialuronoglucuronidase, pectina pectil-hidrolase, peptidoglicano N-acetilmuramoil-hidrolase, fosfatidilcolina 2-acil-hidrolase, fosfatidilcolina 1-acil-hidrolase, poli(1,4- α -D-galacturonídeo), poli(1,4-(N-acetil- β -D-glucosaminida))-glicano-hidrolase, proteases, sacarose α -glicosidase, triacilglicerol acil-hidrolase, triacilglicerol proteína-acil-hidrolase.

Outro grupo de enzimas que pode ser aqui utilizado é um subgrupo de serina-proteases comumente designadas como subtilisinas. Uma subtilisina é uma serina-protease

produzida por bactérias Gram-positivas ou fungos. As sequências de aminoácidos de um número de subtilisinas foram determinadas, incluindo pelo menos seis subtilisinas de estirpes de *Bacillus*, nomeadamente, subtilisina 168, subtilisina BPN, subtilisina Carlsberg, subtilisina DY, subtilisina de *amylosacchariticus*, e mesentericopeptidase, uma subtilisina de *Actinomycetales*, termitase de *Thermoactinomyces vulgaris*, e uma subtilisina fúngica, proteinase K de *Tritirachium album*.

Uma lipase ilustrativa como se discute acima pode ser uma lipase microbiana. Como tal, a lipase pode ser selecionada de lipases de levedura, por exemplo, *Candida*, e lipases bacterianas, por exemplo *Pseudomonas* ou *Bacillus*; ou lipases fúngicas, por exemplo, *Humicola* ou *Rhizomucor*.

Os exemplos de amilases úteis nos presentes métodos, etc., incluem amilases de *Bacillus*, por exemplo, amilase de *Bacillus stearothermophilus*, amilase de *Bacillus amyloliquefaciens*, amilase de *Bacillus subtilis* ou amilase de *Bacillus licheniformis* ou amilases de *Aspergillus*, por exemplo amilase de *Aspergillus niger* ou *Aspergillus oryzae*.

Outro grupo de enzimas úteis nos presentes métodos, etc., inclui as pectinases que pertencem às classes de enzimas poligalacturonases (EC3.2.1.15), pectinoesterases (EC3.2.1.11), liases de pectina (EC4.2.2.10) e hemicelulases tais como endo-1,3- β -xilosidase (EC 3.2.1.32), xilano 1,4- β -xilosidase (EC 3.2.1.37) e α -L-arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55). Um organismo de origem adequado para pectinases pode ser o *Aspergillus niger* ou *Aspergillus aculeatus*.

A lisozima, também conhecida como muramidase ou N-acetilmuramida glicano-hidrolase, é uma enzima de 14,4 quilodalton (EC 3.2.1.17) que danifica as paredes das células bacterianas catalisando a hidrólise das ligações 1,4- β entre os resíduos de ácido N-acetilmurâmico e N-acetil-D-glicosamina num peptidoglicano e entre resíduos de N-acetil-D-glicosamina em quitodextrinas. A lisozima encontra-se na saliva, lágrimas e polimorfonucleócitos e tem atividade antibacteriana conhecida. A enzima atua através do ataque a peptidoglicanos (presentes nas paredes das células de bactérias, especialmente bactérias Gram-positivas) e hidrólise da ligação glicosídica que liga o ácido N-acetilmurâmico com o quarto átomo de carbono da N-acetilglicosamina. A lisozima foi utilizada no tratamento de otite média e sinusite (US 7,060,674). As composições orais de lisozima têm sido utilizadas no tratamento de várias condições em humanos, incluindo artrite (US 7,229,809).

Outra enzima que pode ser utilizada nas presentes composições é a desoxirribonuclease I (ADNase I), uma fosfodiesterase capaz de hidrolisar o ácido polidesoxirribonucleico. A ADNase I foi purificada de várias espécies em vários graus. A ADNase I, quando inalada, afeta a capacidade da *P. aeruginosa* para formar biofilmes nos pulmões nas etapas iniciais de desenvolvimento. A ADNase I hidrolisa o ADN presente na expectoração/muco de doentes com fibrose quística e reduz a viscosidade nos pulmões, promovendo uma melhor eliminação das secreções. As enzimas que são estáveis em ácidos são candidatas para utilização em conjunto com os métodos, composições antibiofilme fisiologicamente aceitáveis, etc., aqui discutidas. As atividades da ADNase I são

classificáveis em três grupos com base nas distribuições da ADNase I nos diferentes tecidos. A ADNase I de tipo parótida é segregada a partir da glândula parótida e deve passar através das condições muito ácidas no estômago.

Aqui, as composições antibiofilme fisiologicamente aceitáveis são para ser administradas através da boca, tipicamente pelo menos 1 hora antes ou 1 hora depois de uma refeição ou consumo de alimentos. Aqui, as composições antibiofilme fisiologicamente aceitáveis são tipicamente para ser administradas 2 a 4 vezes por dia (outros intervalos podem ser apropriados em certas circunstâncias) e o regime é tipicamente para ser seguido durante um período prolongado, por exemplo pelo menos cerca de 1 ou 2 meses.

A preparação de enzimas pode ser combinada com um agente antimicrobiano natural, tal como óleo de orégão, berberina ou ácido undecilénico ou com uma prescrição antibiótica ou antimicrobiana. A preparação de enzimas pode ser combinada com a ingestão oral de um ou mais microrganismos probióticos. A Organização Mundial de Saúde define organismos probióticos como microrganismos vivos que quando administrados em quantidades adequadas conferem um benefício para a saúde do hospedeiro. A preparação de enzimas pode ser combinada com um ou mais prebióticos. Um prebiótico é definido como "ingredientes fermentados seletivamente que permitem alterações específicas, na composição e/ou atividade da microflora gastrointestinal que conferem benefícios ao bem-estar e saúde do hospedeiro." (Roberfroid M. Prebiotics: the concept revisited. JNutr 2007;137(3 Supl 2):830S-7S.)

Os métodos relacionados com as presentes composições incluem métodos de seleção, preparação e utilização, incluindo para o fabrico de medicamentos.

Por exemplo, os métodos incluem métodos de seleção de uma composição antibiofilme fisiologicamente aceitável adequada para administração oral a um mamífero, que retenha ao mesmo tempo eficácia no intestino, em que o método compreende proporcionar uma multiplicidade significativa de amostras de um biofilme alvo vivo em pelo menos um substrato; aplicar a cada uma da multiplicidade de amostras uma de uma gama de doses de um agente antibiofilme candidato selecionado do grupo que compreende uma celulase estável em ácido e um agente antibiofilme anti- β -1,6-*N*-acetil-D-glicosamina polimérica (poli- β -1,6-GlcNAc), sob condições em que as amostras do biofilme alvo podem crescer ausentes de um efeito antibiofilme significativo devido ao agente antibiofilme candidato; e, determinar se cada uma da gama de doses do agente antibiofilme candidato inibiu o crescimento da sua respetiva amostra.

Os métodos podem compreender ainda a seleção tanto da celulase antibiofilme estável em ácido como do agente anti-poli- β -1,6-GlcNAc antibiofilme. O agente anti-poli- β -1,6-GlcNAc antibiofilme pode ser uma hexosaminidase tal como a Dispersina B. Os métodos podem compreender ainda a seleção de pelo menos um de um complexo de hemicelulase/pectinase estável em ácido, β -gluconase, protease ácida, protease alcalina ou peptidase de *Serratia*. A quantidade de celulase pode ser equivalente a uma dose de cerca de 100-300 CU, a quantidade de complexo de hemicelulase/pectinase pode ser de cerca de 60-100 HSU, a quantidade de β -gluconase pode ser de cerca de 6-10 BGU, a quantidade de protease ácida

pode ser de cerca de 15-25 SAP e a quantidade de protease alcalina pode ser de cerca de 15-25 HUT.

Os métodos podem compreender também a seleção de pelo menos um agente estável em ácido selecionado dos seguintes: um dissacárido; amilase; α -amilase; β -amilase; glucoamilase; endoglucanase; xilanase; lipase; lisozima; uma enzima com atividade de dipeptidil-peptidase IV (DPP-IV); quitosanase; bromelina; papaína; ficina; protease de kiwi; protease ou proteinase derivada de qualquer planta, ou fitase. A lipase pode ser uma lipase microbiana, tal como de, pelo menos, uma de *Candida*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Humicola* ou *Rhizomucor*. A amilase pode ser, pelo menos, uma de uma amilase de *Bacillus* ou amilase de *Aspergillus*. A seleção pode compreender, pelo menos, uma pectinase que pode ser, pelo menos, uma de uma poligalacturonase (EC3.2.1.15), pectinoesterase (EC3.2.1.11), liase de pectina (EC4.2.2.10) ou hemicelulase. A pectinase pode ser, pelo menos, uma pectinase de *Aspergillus niger* ou pectinase de *Aspergillus aculeatus*.

Os métodos podem ainda compreender a seleção de, pelo menos, um dos seguintes: 1,2-1,3- α -D-manano manano-hidrolase, 1,3- β -D-xilano xilano-hidrolase, 1,3- β -D-glucano glucano-hidrolase, 1,3(1,3;1,4)- α -D-glucano 3-glucano-hidrolase, 1,3(1,3;1,4)- β -D-glucano 3(4)-glucano-hidrolase, 1,3-1,4- α -D-glucano 4-glucano-hidrolase, 1,4- α -D-glucano glucano-hidrolase, 1,4- α -D-glucano gluco-hidrolase, 1,4-(1,3:1,4)- β -D-glucano A-glucano-hidrolase, 1,4- β -D-glucano gluco-hidrolase, 1,4- β -D-xilano xilano-hidrolase, 1,4- β -D-manano manano-hidrolase, 1,5- α -L-arabinano-hidrolase, 1,4- α -D-glucano malto-hidrolase, 1,6- α -D-glucano 6-glucano-hidrolase, 2,6- β -fructano fructano-hidrolase, α -dextrina 6-

glucano-hidrolase, α -D-galactosídeo galacto-hidrolase, α -D-glucosídeo gluco-hidrolase, α -D-manosídeo mano-hidrolase, acilneuraminil-hidrolase, polissacárido capsular de *Aerobacter* galacto-hidrolase, β -D-fructofuranosídeo fructo-hidrolase, β -D-fucosídeo fuco-hidrolase, α -D-fructano fructo-hidrolase, β -D-galactosídeo galacto-hidrolase, β -D-glucosídeo gluco-hidrolase, β -D-glucuronosídeo, glucuronoso-hidrolase, β -D-manosídeo mano-hidrolase, β -N-acetil-D-hexosaminida N-acetil-hexosamino-hidrolase, sulfato de celulose sulfo-hidrolase, collagenase, dextrina 6- α -D-glucano-hidrolase, glicoproteína-fosfatidilinositol fosfatido-hidrolase, hialuronato 4-glicano-hidrolase, hialuronoglucuronidase, pectina pectil-hidrolase, peptidoglicano N-acetilmuramoil-hidrolase, fosfatidilcolina 2-acil-hidrolase, fosfatidilcolina 1-acil-hidrolase, poli(1,4- α -D-galacturonídeo), poli(1,4-(N-acetil- β -D-glucosaminida))-glicano-hidrolase, proteases, sacarose α -glicosidase, triacilglicerol acil-hidrolase, triacilglicerol proteína-acil-hidrolase.

Os métodos podem compreender ainda a seleção de uma subtilisina estável em ácido, uma ADNase I estável em ácido, óleo de orégão, berberina, ácido undecilénico, um antibiótico de prescrição, um antimicrobiano de prescrição, um microrganismo probiótico ou um prebiótico.

Nalguns aspetos, os métodos compreendem a inibição de uma infeção por biofilmes gastrointestinais num mamífero, em que o método compreende: identificar a presença da infeção por biofilmes gastrointestinais, administrar por via oral ao mamífero uma quantidade terapêuticamente eficaz de pelo menos um agente antibiofilme que compreende uma celulase estável em ácido ou um agente anti- β -1,6-N-acetil-D-

glicosamina polimérica (poli- β -1,6-GlcNAc) em pelo menos um veículo farmacologicamente aceitável, numa quantidade e durante um tempo suficiente para originar degradação significativa do biofilme no sistema gastrointestinal do mamífero. Noutras formas de realização, os métodos compreendem a administração de um ou mais dos outros aspetos das presentes composições.

A composição pode ser utilizada como uma substância terapêutica ativa, para utilização no fabrico de um medicamento para inibir ou tratar um biofilme gastrointestinal num mamífero, ou para fabricar um medicamento capaz de reduzir os sintomas associados a um biofilme gastrointestinal num doente humano, por exemplo que compreende combinar uma quantidade farmacologicamente eficaz de, pelo menos, um de uma celulase antibiofilme estável em ácido ou um agente antibiofilme anti- β -1,6-N-acetil-D-glicosamina polimérica (poli- β -1,6-GlcNAc) numa quantidade capaz de degradar significativamente o biofilme com pelo menos um de um veículo, adjuvante, excipiente, tampão e diluente farmacologicamente aceitável.

Alvos de Biofilme Ilustrativos

Os organismos de biofilme alvo ilustrativos, que incluem tanto organismos infecciosos indígenas como de biofilme são discutidos a seguir.

Enterococos

Os enterococos, embora façam parte da flora normal do trato gastrointestinal humano, foram reconhecidos como uma causa importante de infeção nosocomial há mais de duas décadas e

estão comumente envolvidos em infecções do aparelho urinário, bacteriemia, infecções intra-abdominais e de feridas cirúrgicas, infecções relacionadas com cateteres e endocardite.

Estafilococo

Os estafilococos patogênicos podem formar biofilmes nos quais exibem uma maior resistência aos antibióticos e ao sistema de defesa imunitário do que os seus homólogos planctônicos. O *Staphylococcus aureus* é um agente patogênico comum associado a infecções nosocomiais. Pode persistir em quadros clínicos e ganhar resistência acrescida aos agentes antimicrobianos através da formação de biofilmes. O *Staphylococcus aureus* está entre os principais agentes patogênicos que provocam infecções da corrente sanguínea capazes de formar biofilmes no tecido hospedeiro e em dispositivos médicos permanentes e de perdurar e causar doença. As infecções provocadas por *S. aureus* são cada vez mais difíceis de tratar devido ao aumento da resistência aos antibióticos (por exemplo, *Staphylococcus aureus* resistente a vancomicina ou meticilina). Em particular, num ambiente de biofilme, os micróbios exibem uma maior resistência aos agentes antimicrobianos.

Pseudomonas

O agente patogênico oportunista humano, *Pseudomonas aeruginosa*, é uma causa importante de mortalidade relacionada com infecções entre os pacientes criticamente doentes, e acumula uma das maiores taxas de casos fatais de todas as infecções gram-negativas. Embora se considere

tradicionalmente que os pulmões são um sítio principal de infecção por *P. aeruginosa* entre os pacientes criticamente doentes, um número significativo destas infecções surge como consequência da contaminação direta das vias respiratórias pela flora gastrointestinal ou por disseminação hematogénica do intestino para o parênquima pulmonar. A *Pseudomonas aeruginosa* provoca infecções graves em doentes comprometidos imunologicamente e é um agente patogénico importante em doentes com fibrose quística. Um mecanismo de virulência importante é a formação de um biofilme mucóide. O alginato segregado é um constituinte crucial da matriz do biofilme mucóide. No entanto, os mutantes de *P. aeruginosa* negativos para o alginato são também capazes de formar biofilmes não mucóides, que exibem uma arquitetura diferente daquela dos biofilmes formados por *P. aeruginosa* mucóide com sobreprodução de alginato (Nivens DE, Ohman DE, Williams J, Franklin MJ. Role of alginate and its O acetylation in formation of *Pseudomonas aeruginosa* microcolonies and biofilms. *J Bacteriol* 2001;183: 1047-57; Wozniak DJ, Wyckoff TJ, Starkey M, Keyser R, Azadi P, OToole GA, Parsek MR. Alginate is not a significant component of the extracellular polysaccharide matrix of PAI 4 and PAOI *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Proc Natl AcadSci USA* 2003;100:7907-12.)

Helicobacter pylori

A *H. pylori* é um dos agentes patogénicos humanos mais comuns que infetam 50% da população mundial. Está associada a úlceras duodenais, úlceras gástricas, gastrite e carcinoma gástrico. O tratamento da *H. pylori* é difícil e envolve regímenes de múltiplos fármacos e intervalos de tratamento prolongados. Há uma taxa de recidiva de 10-20%.

Estudos recentes documentam a importância dos biofilmes na patogénese da doença por *H. pylori*. (Coticchia JM et al. Presence and density of *Helicobacter pylori* biofilms in human gastric mucosa in patients with peptic ulcer disease. J Gastrointest Surg. 2006;10:883-9). Uma formulação multienzimática oral é muito promissora para facilitar a eliminação de biofilmes de *H. pylori* e a erradicação dos agentes patogénicos de *H. Pylori*, reduzindo, desse modo, o risco de gastrite, doença de úlcera péptica e cancro gástrico.

Listeria

O agente patogénico de origem alimentar *Listeria* é o agente ocasionador de listeriose, uma doença grave onde a forma aberta tem uma mortalidade severa superior a 25%. A *Listeria monocytogenes* pode sobreviver e crescer numa grande gama de condições ambientais tais como temperaturas de refrigeração, baixo pH e alta concentração de sal. Isto permite que o agente patogénico ultrapasse as barreiras de segurança e conservação de alimentos, e seja um risco potencial para a saúde humana. A *Listeria monocytogenes* pode encontrar-se especificamente em alimentos crus, tais como leite líquido não pasteurizado, vegetais crus, aves domésticas cruas e cozinhadas. Tem a capacidade de crescer a baixas temperaturas; permitindo, assim, o seu crescimento em alimentos refrigerados. Julgava-se que a *Listeria monocytogenes* estava exclusivamente associada a infeções em animais, mas recentemente esta espécie patogénica foi também isolada, na sua forma dormente, no trato intestinal de uma pequena percentagem da população humano (Rouquette

C, Berche P. The pathogenesis of infection by *Listeria monocytogenes*. *Microbiologia* 1996;12:245-58).

Campylobacter

A *Campylobacter jejuni* é uma espécie de bactéria microaerofílica, Gram-negativa, em forma de bastonete curvado que se encontra comumente nas fezes de animais. É uma das causas mais comuns de gastroenterite humana no mundo. A intoxicação alimentar provocada pela espécie *Campylobacter* pode ser gravemente debilitante, mas raramente coloca a vida em risco. Foi relacionada com desenvolvimento subsequente da síndrome de Guillain-Barre (GBS), que geralmente se desenvolve duas a três semanas após a doença inicial. Os alimentos contaminados são uma fonte importante de infecções isoladas, sendo normalmente a carne e as aves domésticas incorretamente preparadas a fonte das bactérias. A infecção por *C jejuni* resulta geralmente em enterite, a qual se caracteriza por dor abdominal, diarreia, febre e mal-estar. Demonstrou-se que o agente patogénico gastrointestinal importante *Campylobacter jejuni* existe como três formas de biofilme monoespécie em cultura líquida. (Joshua GW, Guthrie-Irons C, Karlyshev AV, Wren BW. Biofilm formation in *Campylobacter jejuni*. *Microbiology* 2006;152(Pt 2):387-96.)

Bacillus anthracis

O *Bacillus anthracis* é uma bactéria Gram-positiva que forma endósporos e é o agente etiológico do antraz pulmonar, gastrointestinal e cutâneo. Nas áreas endémicas onde há interação entre gado e humanos, são comumente relatados casos crónicos de antraz cutâneo. Atualmente, existem

poucos dados conhecidos do inventor que expliquem a importância do modo de vida em biofilme do *B. anthracis*, contudo foram caracterizados biofilmes noutras espécies patogénicas e não patogénicas de *Bacillus*, incluindo *Bacillus cereus* e *Bacillus subtilis*, respetivamente. O *B. anthracis* forma facilmente biofilmes que são inerentemente resistentes aos antibióticos comumente prescritos. (Lee K, Costerton JW, Ravel J, Auerbach RK, Wagner DM, Keim P, Leid JG. Phenotypic and functional characterization of *Bacillus anthracis* biofilms. *Microbiology* 2007;153(Pt 6): 1693-701.)

Yersinia

A iersiniose é uma doença infecciosa provocada por uma bactéria do género *Yersinia*. Nos Estados Unidos, a maioria da doença humana é provocada por uma espécie, *Y. enterocolitica*. A infeção por *Y. enterocolitica* ocorre muito frequentemente em crianças de tenra idade. Os sintomas comuns em crianças são febre, dor abdominal e diarreia. Os sintomas gastrointestinais são comuns tanto nos estados agudos como crónicos da iersiniose. A infeção é muito frequentemente adquirida pela ingestão de alimentos contaminados, especialmente produtos de porco crus ou malcozinhados. O consumo de leite não pasteurizado contaminado ou água não tratada pode também transmitir a infeção.

A *Yersinia pestis*, o agente ocasionador de peste bubónica, é transmitida a roedores e humanos pelas picadas de pulgas, cujos proventrículos estão bloqueados por uma massa densa

das bactérias de biofilme. (Tan L, Darby C. A movable surface: formation of *Yersinia* sp. biofilms on motile *Caenorhabditis elegans*. J Bacteriol. 2004; 186:5087-92.) O bloqueio deixa a pulga com fome e estimula-a a picar repetidamente na procura de refeições de sangue, espalhando assim as bactérias a novos hospedeiros. Os modelos de biofilme que utilizam *Caenorhabditis elegans* podem ser utilizados para identificar enzimas que matam biofilmes de *Yersinia* (Styer KL, Hopkins GW, Bartra SS, Piano GV, Frothingham R, Aballay A. *Yersinia pestis* kills *Caenorhabditis elegans* by a biofilm-independent process that involves novel virulence factors. EMBO reports 2005;10:992-7.)

Espécies de Brucella

Os humanos são geralmente infectados por uma de três vias: através da ingestão ou consumo de algo que esteja contaminado com *Brucella*, da respiração no organismo (inalação) ou da entrada de bactérias no corpo através de feridas cutâneas. A via mais comum de infecção é a ingestão ou consumo de produtos lácteos contaminados.

Salmonella

A *Salmonella enterica*, um agente patogénico de origem alimentar que causa salmonelose, é provocada pela ingestão de bactérias que invadem o epitélio intestinal e se multiplicam no mesmo. Sabe-se que a *Salmonella enterica* forma biofilmes, e a sua fixação e crescimento em células eucarióticas é facilitada por exopolissacáridos (Ledebøer & Jones, 2005). Muitas pessoas infectadas por *Salmonella*

desenvolvem diarreia, febre e cólicas abdominais 12 a 72 horas após infecção. A doença dura geralmente 4 a 7 dias e a maioria das pessoas recuperam sem tratamento. No entanto, nalgumas pessoas a diarreia pode ser tão grave que o doente tem de ser hospitalizado. Nestes doentes, a infecção por *Salmonella* pode disseminar-se dos intestinos para a corrente sanguínea e, em seguida, para outros sítios do corpo e pode originar morte, a menos que a pessoa seja tratada imediatamente.

Shigella

Existem vários tipos diferentes de bactérias de *Shigella*: *Shigella sonnei*, também conhecida como *Shigella* do "Grupo D" é responsável por mais de dois terços da shigellose nos Estados Unidos. A shigellose é uma doença infecciosa provocada por um grupo de bactérias chamadas de *Shigella*. Muitos dos que são infetados por *Shigella* desenvolvem diarreia, febre e cólicas estomacais que começam um dia ou dois depois de terem sido expostos à bactéria. Algumas bactérias *Shigella* tornaram-se resistentes aos antibióticos. Um segundo tipo, a *Shigella flexneri*, ou *Shigella* do "grupo B", é responsável por quase todas as restantes. Outros tipos de *Shigella* continuam a ser causas importantes de doença no mundo em vias de desenvolvimento. Um tipo que se encontra no mundo em vias de desenvolvimento, a *Shigella dysenteriae* tipo 1, provoca ali epidemias mortais.

Typhi (febre tifoide)

A *Salmonella enterica* serovar Typhi provoca febre tifoide, uma febre entérica que é potencialmente fatal. Os

portadores assintomáticos podem transportar as bactérias na vesícula biliar. A *Salmonella typhi* vive apenas em humanos. As pessoas com febre tifoide transportam as bactérias na sua corrente sanguínea e trato intestinal. Além disso, um pequeno número de pessoas, chamados portadores, recupera da febre tifoide, mas continua a transportar as bactérias. Tanto as pessoas doentes como os portadores libertam a *S. typhi* nas suas fezes (excrementos). A *Salmonella typhi* é transmitida por alimentos, água e bebidas contaminados. Foi recentemente desenvolvido um sistema para analisar a formação de biofilmes de salmonella sobre lamelas de vidro (Prouty AM, Schwesinger WH, Gunn JS. Biofilm formation and interaction with the surfaces of gallstones by *Salmonella* spp. Infect Immun 2002;70:2640-9.)

Escherichia coli

A *Escherichia coli* enterotoxígena visa o intestino delgado onde o efeito de barreira da microflora autóctone é baixo devido a maior acidez e aos movimentos peristálticos nesta região. Este organismo adere e coloniza o muco para desencadear um efeito patogénico (Knutton S, Lloyd DR, Candy DC, McNeish AS. In vitro adhesion of enterotoxigenic *Escherichia coli* to human intestinal epithelial cells from mucosal biopsies. Infect Immun 1984;44:514-8.) Isto significa que o agente patogénico e/ou as suas toxinas podem aderir facilmente aos enterócitos expostos e invadir o hospedeiro.

Vibrio cholerae (cólera)

O *Vibrio cholerae* é um agente patogénico Gram-negativo, facultativo que é o agente ocasionador de cólera, uma doença diarreica devastadora que afeta milhões de pessoas no mundo em vias de desenvolvimento a cada ano; sobrevive em reservatórios aquosos, provavelmente na forma de biofilmes.

Entamoeba histolytica

A amebíase intestinal invasiva, provocada por *Entamoeba histolytica* inicia-se com a fixação de trofozoítos à camada mucosa do cólon, rutura e/ou depleção da mucosa, e aderência e citólise das células epiteliais e inflamatórias do hospedeiro. Um modelo de trabalho corrente da amebíase intestinal sugere que o microambiente do intestino do hospedeiro, em particular as mucinas intestinais e o biofilme bacteriano, podem influenciar o comportamento de amebas patogénicas. As enzimas que rompem o biofilme bacteriano serão úteis na inibição e tratamento de amebíase.

EXEMPLOS

EXEMPLO 1:

Documentação da Atividade Antibiofilme de uma Formulação Multienzimática

Foram realizadas experiências iniciais com uma formulação multienzimática que consistia em Celulase - 2000 CU, Glucoamilase - 50 AGU, Hemicelulase/Pectinase - 300 HSU, Beta-glucanase - 100 BGU, atividade de Complexo de protease/peptidase w/DPP-IV - 100 000 HUT, Quitosanase -

100 unidades, Lisozima - 200 000 SHU, e peptidase de *Serratia* - 1000 unidades. Estas atividades enzimáticas estavam contidas numa mistura de 500 mg que incluía 20 mg de L-leucina. A formulação multienzimática foi testada ao longo de uma série de diluições desde 50 mg/mL até 0,34 mg/mL. Foram feitas diluições em Caldo de Mueller Hinton Ajustado com Catiões (CAMHB) estéril ou Caldo de Dextrose de Sabouraud (SDB) para leveduras.

A formulação multienzimática foi testada *in vitro* contra *Escherichia coli* O157:H7, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 4352, *Candida paratropicalis* ATCC 99916 e *Candida albicans* SJ2083133. Embora a *Candida albicans* forme biofilmes significativos *in vivo*, não é previsível que forme biofilmes *in vitro*, mas foi incorporada na experiência pela sua importância clínica.

O processo experimental para o ensaio de suscetibilidade antimicrobiana de alto débito utilizou um ensaio num Dispositivo de Biofilme Calgary (MBEC™ P&G, Innovatech). Este protocolo padrão pode ser dividido numa série de passos, os quais são detalhados a seguir.

Cultura dos organismos e formação dos biofilmes.

- a. Utilizando uma cultura-mãe criogénica (a -70 °C), inocular uma primeira subcultura dos organismos bacterianos listados acima sobre ágar tríptico de soja (TSA).
- b. Incubar a 37 °C durante 24 horas e armazenar a placa envolvida em parafilme a 4 °C.
- c. A partir da primeira subcultura, inocular uma segunda subcultura sobre TSA. Incubar a 37 °C durante 24 horas. A segunda subcultura deve ser utilizada dentro de 24 horas

desde do momento em que foi removida perla primeira vez da incubação. d. Utilizando a segunda subcultura criar um inóculo em 3 mL de água estéril que corresponda a um Padrão de McFarland de 0,5 ($1,5 \times 10^8$ células por mL) num tubo de ensaio de vidro utilizando uma zaragatoa de algodão estéril.

e. Diluir esta solução a 1:30 em CAMHB (ou 1 : 10 em SDB para leveduras).

f. Inverter o organismo diluído 3-5 vezes para se conseguir uma mistura uniforme do organismo.

g. A densidade celular será confirmada diluindo sucessivamente e aplicando em mancha amostras triplicadas do inóculo sobre TSA ou SA.

h. O organismo diluído remanescente (22 mL) será colocado nos depósitos de um dispositivo MBEC HTP peg 96.

i. Colocar a tampa do dispositivo MBEC peg 96 sobre a placa do fundo que continha o organismo.

j. Colocar o dispositivo sobre um agitador oscilante numa incubadora humidificada a 37 °C durante 24 horas ajustado a 3-4 oscilações por minuto.

k. Foram utilizadas placas de poli-L-lisina para cultivar *C. paratropicalis* e *C. albicans*. Estes foram preparados diluindo uma solução de poli-L-lisina a 0,1% (p/v) (Sigma P8920) 10X em água desionizada que foi esterilizada por filtração.

As placas de microtitulação de 96 poços estéreis foram preparadas num hote de fluxo laminar. Cada placa incluía controlos de esterilidade, controlos de crescimento e poço de exposição a antibiótico. A gentamicina foi utilizada para as bactérias e anfotericina B para a *Candida* em gamas de concentração desde 1024 mcg/mL a 1 mcg/mL. Os organismos foram testados utilizando tempos de exposição de 24 horas.

Foi avaliada uma placa por organismo por ponto no tempo. As amostras em triplicado foram utilizadas para avaliar o impacto da formulação multienzimática sobre a formação do biofilme.

A concentração inibidora mínima (MIC) planctônica e a concentração bactericida mínima MBC foram determinadas depois de incubar a placa de exposição a 35 ± 2 °C durante 24 horas. A determinação de MIC foi efetuada por inspeção visual. A MIC é definida como a concentração mínima que inibe o crescimento do organismo. Os resultados de MBC são determinados após a incubação de 24 horas pelo +/- crescimento.

Os resultados da concentração mínima de erradicação do biofilme (MBEC) foram determinados após uma incubação de 24 horas dos painéis de MBEC utilizando o leitor de placas em conjunto com dados de redução do Log10. A turvação foi avaliada visualmente nos poços da placa de recuperação. Alternativamente, foi utilizada um leitor de placas de microtitulação para se obter as medições de densidade ótica a 630 nm (OD_{630}). Os poços transparentes ($OD_{630} < 0,1$) são evidência da erradicação do biofilme. A MBEC é definida como a concentração mínima de antibiótico que inibe o crescimento do biofilme.

Os resultados da experiência 1 foram como se segue:

a. ***Escherichia coli* O157:H7** - Não foram observados pontos de corte de MIC, MBC e MBEC com as multienzimas testadas. A formulação multienzimática tinha atividade antibiofilme em todas, exceto nas 2 concentrações mais baixas testadas. Os dados são apresentados na tabela a seguir:

							Estatística*	
Redução Log	Placa - Redução Log pela Enzima (GC - Teste)						Redução Log vs. GC	
Diluição (mg/mL)	Filtrada	1	2	3	Média	±DP	P	S/NS*
50,00	-0,42	0,70	0,31	0,16	0,39	0,28	0,00	S
25,00	0,53	1,18	1,37	1,53	1,36	0,17	0,00	S
12,50	1,70	1,64	2,00	1,64	1,76	0,21	0,00	S
6,25	2,78	1,70	2,00	1,58	1,76	0,22	0,00	S
3,13	0,78	0,20	0,53	0,78	0,50	0,29	0,00	S
1,56	0,58	0,78	1,00	0,88	0,89	0,11	0,00	S
0,78	0,14	0,25	0,23	0,23	0,23	0,01	0,00	S
*Teste T de Student bilateral, não emparelhado (para significância estatística, $p \leq 0,05$)								

b. *Klebsiella pneumoniae* ATCC 4352 - Para a MIC e a MBC não foram observados pontos de corte às concentrações testadas. O valor da MBEC para a formulação multienzimática foi de 6,25 mg/mL. A formulação multienzimática tinha atividade antibiofilme com reduções log de 3,0 - 3,8 às concentrações de 50 - 6,25 mg/mL e ~1,5 para as concentrações mais baixas. Os dados são apresentados na tabela a seguir:

							Estatística*	
Redução Log	Placa- Redução Log pela Enzima (GC - Teste)						Redução Log vs. GC	
Diluição (mg/mL)	Filtrada	1	2	3	Média	±DP	p	S/NS*
50,00	3,65	3,87	3,39	4,35	3,87	0,48	0,00	S
25,00	3,02	3,35	3,65	3,57	3,52	0,16	0,00	S
12,50	2,87	3,17	3,04	3,04	3,09	0,07	0,00	S
6,25	2,04	3,65	3,44	3,35	3,48	0,15	0,00	S
3,13	1,57	1,23	2,35	1,50	1,69	0,58	0,00	S
1,56	0,44	1,39	1,50	1,50	1,46	0,06	0,00	S
0,78	0,44	1,50	1,74	1,74	1,66	0,14	0,00	S

							Estatística*	
Redução Log	Placa- Redução Log pela Enzima (GC - Teste)						Redução Log vs. GC	
Diluição (mg/mL)	Filtrada	1	2	3	Média	±DP	p	S/NS*
0,39	1,65	1,14	2,04	1,57	1,58	0,45	0,00	S
*Teste T de Student bilateral, não emparelhado (para significância estatística, $p \leq 0,05$)								

c. **Candida paratropicalis ATCC 99916** - Não foram observados valores de corte para a MIC, MBC e MBEC às concentrações testadas. A formulação multienzimática tinha atividade antibiofilme com uma redução log às concentrações entre 25 mg/mL e 1,56 mg/mL. Os dados são apresentados na tabela a seguir:

							Estatística*	
Redução Log	Placa - Redução Log pela Enzima (GC - Teste)						Redução Log vs. GC	
Diluição (mg/mL)	Filtrada	1	2	3	Média	±DP	p	S/NS*
50,00	-0,40	-0,36	-0,51	-0,36	-0,41	0,08	0,00	S
25,00	-0,54	-0,06	0,16	-0,27	-0,06	0,21	0,00	S
12,50	0,94	1,34	1,16	1,64	1,38	0,24	0,00	S
6,25	1,16	0,94	1,64	1,34	1,30	0,35	0,00	S
3,13	1,34	1,16	1,04	1,64	1,28	0,32	0,00	S
1,56	0,46	1,34	1,16	1,16	1,22	0,10	0,00	S
0,78	0,94	1,04	0,60	-0,06	0,52	0,55	0,00	S
0,39	0,04	0,34	1,04	-0,06	0,44	0,56	0,00	S
*Teste T de Student bilateral, não emparelhado (para significância estatística, $p \leq 0,05$)								

d. **Candida albicans** SJ2083133 não produziu de forma fidedigna um biofilme pelo que as multienzimas não puderam ser avaliadas.

EXEMPLO 2:

A experiência 2 avaliou a formulação multienzimática anterior sem e com 125 mg de ácido etilenodiaminotetracético dissódico quanto à atividade antibiofilme contra *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 e *Staphylococcus aureus* MRSA U de C #18. O meio e condições de crescimento foram TSB/TSA, aeróbicas e 35 ± 2 °C. A concepção e condições experimentais foram como descritas acima para a experiência 1.

Os resultados da experiência 2 foram como se segue:

***Staphylococcus aureus* ATCC 29213** – Constatou-se que as MIC, MBC e MBEC para a formulação multienzimática não têm pontos de corte às concentrações testadas. A formulação multienzimática tinha atividade antibiofilme a todas, exceto à concentração mais baixa testada. As reduções log versus controlos de crescimento (GC) foram significativas ao nível de $P \leq 0,05$. Os dados são apresentados na tabela a seguir:

Redução Log	Placa - Redução Log pela Enzima (GC - Teste)					
Diluição (mg/mL)	Filtrada	1	2	3	Média	\pm DP
50,00	2,38	1,90	1,90	1,58	1,79	0,19
25,00	3,15	3,01	2,81	2,38	2,73	0,32
12,50	3,55	1,65	1,81	0,53	1,33	0,70
6,25	1,38	1,78	2,74	2,08	2,20	0,49
3,13	0,85	3,01	1,55	1,74	2,10	0,79
1,56	1,85	2,16	2,01	1,81	1,99	0,17
0,78	0,44	-0,19	2,65	0,78	1,08	1,44
0,34	0,08	0,38	-0,10	0,53	0,27	0,33

Staphylococcus aureus ATCC 29213 – Constatou-se que a MBEC para a formulação multienzimática com EDTA não tem ponto de corte às concentrações testadas. Observou-se que a MBC para as multienzimas/EDTA tem o ponto de corte a 3,13 mg/mL e observou-se que a MIC para as multienzimas/EDTA tem o ponto de corte a 1,56 mg/mL. A redução log para as multienzimas/EDTA é muito superior à redução log para a formulação multienzimática e a uma concentração muito menor para as multienzimas/EDTA, o que mostra que as multienzimas/EDTA tem um efeito muito maior na erradicação do biofilme bacteriano. Os dados são apresentados na tabela a seguir.

Redução Log	Placa - Redução Log pela Enzima/EDTA (GC - Teste)					
Diluição (mg/mL)	Filtrada	1	2	3	Média	±DP
50,00	2,85	2,38	3,85	1,85	2,69	1,03
25,00	3,55	2,81	5,85	5,85	4,84	1,76
12,50	2,38	3,55	5,85	5,85	5,09	1,33
6,25	2,71	3,38	3,85	5,85	4,36	1,32
3,13	3,85	5,85	5,85	5,85	5,83	0,00
1,56	2,65	3,85	3,38	3,55	3,59	0,24
0,78	2,16	5,85	5,85	3,85	5,19	1,16
0,34	0,95	0,30	0,65	0,49	0,48	0,18

Staphylococcus aureus MRSA 399 – Constatou-se que a MIC, a MBC e a MBEC para a formulação multienzimática não têm ponto de corte às concentrações testadas. A formulação multienzimática exibiu atividade antibiofilme ao longo de uma gama de concentrações, embora a atividade fosse inconsistente. É observada variabilidade entre as amostras em triplicado. Os dados são apresentados na tabela a seguir.

Redução Log	Placa- Redução Log pela Enzima (GC - Teste)					
Diluição (mg/mL)	Filtrada	1	2	3	Média	±DP
50,00	-1,27	3,73	0,73	3,73	2,73	1,73
25,00	3,73	3,73	0,25	3,73	2,57	2,01
12,50	-0,75	-2,75	3,73	-0,88	0,03	3,33
6,25	1,72	3,73	3,73	-0,05	2,47	2,18
3,13	1,42	1,72	0,42	3,73	1,96	1,66
1,56	-0,48	-0,32	-1,88	-0,12	-0,77	0,96
0,78	-1,88	-0,27	-1,45	0,65	-0,36	1,05
0,34	-1,39	1,72	-0,27	3,73	1,72	2,00

EXEMPLO 3:

Staphylococcus aureus MRSA 399 - Constatou-se que a MBEC para a formulação multienzimática com EDTA não tem ponto de corte às concentrações testadas. Constatou-se que a MIC e a MBC para a formulação multienzimática com EDTA têm o ponto de corte a 1,56 mg/mL. A formulação multienzimática com EDTA é mais potente e mais eficaz na erradicação do biofilme bacteriano em comparação com as multienzimas uma vez que a maior redução log da formulação multienzimática com EDTA se situa a uma concentração menor do que a maior redução log das multienzimas. A observação para as enzimas/EDTA quanto às atividades MIC e MBC indica propriedades antimicrobianas, assim como antibiofilme significativas. Os dados são apresentados na tabela a seguir.

Redução Log	Placa - Redução Log pela Enzima/EDTA (GC - Teste)
-------------	---

Diluição (mg/mL)	Filtrada	1	2	3	Média	±DP
50,00	-1,60	0,61	3,73	-0,27	1,35	2,10
25,00	-2,97	3,73	3,73	-1,75	1,90	3,16
12,50	0,95	3,73	3,73	3,73	3,73	0,00
6,25	3,73	0,73	3,73	0,42	1,63	1,83
3,13	3,73	3,73	3,73	1,72	3,06	1,16
1,56	1,72	1,72	3,73	3,73	3,06	1,16
0,78	0,73	3,73	3,73	3,73	3,73	0,00
0,34	3,73	3,73	3,73	3,73	3,73	0,00

Todos os termos aqui utilizados, são usados de acordo com os seus significados correntes, a menos que o contexto ou a definição indique claramente o contrário. Também, a menos que expressamente indicado em contrário, a utilização de "ou" inclui "e" e vice-versa. Os termos não limitativos não são para ser interpretados como limitativos a menos que expressamente especificado, ou o contexto indique claramente, o contrário (por exemplo, "incluindo," "possuindo" e "compreendendo" indicam tipicamente "incluindo sem limitação"). As formas singulares, incluindo nas reivindicações, tais como "um," "uma," "o" e "a" incluem a referência plural a menos que expressamente especificado, ou o contexto indique claramente, o contrário.

O âmbito das presentes composições, sistemas e métodos antibiofilme fisiologicamente aceitáveis, etc., inclui ambos os conceitos meios mais função e passo mais função. No entanto, as reivindicações não são para ser interpretadas como indicando uma relação "meio mais função" a menos que a palavra "meio" seja especificamente explicitada numa reivindicação, e são para ser

interpretadas como indicando uma relação de "meio mais função" quando a palavra "meio" é especificamente explicitada numa reivindicação. De forma semelhante, as reivindicações não são para ser interpretadas como indicando uma relação "passo mais função" a menos que a palavra "passo" seja especificamente explicitada numa reivindicação, e são para ser interpretadas como indicando uma relação "passo mais função" quando a palavra "passo" é especificamente explicitada numa reivindicação.

A partir dos precedentes, entender-se-á que, embora se tenham aqui discutido formas de realização específicas para os fins de ilustração, podem ser feitas várias modificações sem que se afaste do espírito e âmbito da presente discussão. Por conseguinte, os sistemas e métodos, etc., incluem tais modificações assim como não são para ser interpretados como limitando, a menos que expressamente especificado, ou o contexto indique claramente, o contrário (por exemplo, "incluindo," "possuindo" e "compreendendo" indicam tipicamente "incluindo sem limitação"). As formas singulares, incluindo nas reivindicações, tais como "um," "uma," "o" e "a" incluem a referência plural a menos que expressamente especificado, ou o contexto indique claramente, o contrário.

A partir dos precedentes, entender-se-á que, embora se tenham aqui discutido formas de realização específicas para os fins de ilustração, podem ser feitas várias modificações.

REIVINDICAÇÕES

1. Uma composição para utilização na inibição ou tratamento de uma infecção por biofilmes gastrointestinais, que compreende combinar uma quantidade farmacologicamente eficaz de uma celulase estável em ácido, uma glucoamilase, um complexo de hemicelulase/pectinase estável em ácido, β -glucanase, um complexo de protease/peptidase que tem atividade de dipeptidil-peptidase IV (DPP-IV), quitosanase, lisozima e peptidase de *Serratia* com, pelo menos, um de um veículo, adjuvante, excipiente, tampão e diluente farmacologicamente aceitável.
2. A composição para utilização na inibição ou tratamento de uma infecção por biofilmes gastrointestinais, de acordo com a reivindicação 1, em que a composição compreende ainda um agente anti-poli- β -1,6-*N*-acetil-D-glicosamina (anti-poli- β -1,6-GlcNAc) selecionado de hexosaminidase ou Dispersina B.
3. A composição para utilização na inibição ou tratamento de uma infecção por biofilmes gastrointestinais, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, em que a quantidade de celulase por dose varia desde 1 a 10 000 CU, a quantidade de complexo de hemicelulase/pectinase varia desde 1 a 8,000 HSU e a quantidade de β -glucanase varia desde 1 a 1000 BGU.
4. A composição para utilização na inibição ou tratamento de uma infecção por biofilmes gastrointestinais, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, em

que a composição compreende ainda uma quantidade eficaz de pelo menos um agente estável em ácido selecionado dos seguintes: um dissacárido; α -amilase; β -amilase; endoglucanase; xilanase; lipase; bromelina; papaína; ficina; protease de kiwi; qualquer protease ou proteinase derivada de planta; ou fitase.

5. A composição para utilização na inibição ou tratamento de uma infecção por biofilmes gastrointestinais, de acordo com a reivindicação 1 a 4, em que a composição compreende ainda pelo menos uma enzima estável em ácido numa quantidade capaz de degradar o biofilme, a pelo menos uma enzima sendo selecionada das seguintes: 1,2-1,3- α -D-manano mano-hidrolase, 1,3- β -D-xilano xilano-hidrolase, 1,3- β -D-glucano glucano-hidrolase, 1,3(1,3;1,4)- α -D-glucano 3-glucano-hidrolase, 1,3(1,3;1,4)- β -D-glucano 3(4)-glucano-hidrolase, 1,3-1,4- α -D-glucano 4-glucano-hidrolase, 1,4- α -D-glucano glucano-hidrolase, 1,4- α -D-glucano gluco-hidrolase, 1,4-(1,3:1,4)- β -D-glucano 4-glucano-hidrolase, 1,4- β -D-glucano gluco-hidrolase, 1,4- β -D-xilano xilano-hidrolase, 1,4- β -D-manano manano-hidrolase, 1,5- α -L-arabinano-hidrolase, 1,4- α -D-glucano malto-hidrolase, 1,6- α -D-glucano 6-glucano-hidrolase, 2,6- β -fructano fructano-hidrolase, α -dextrina 6-glucano-hidrolase, α -D-galactosídeo galacto-hidrolase, α -D-glucosídeo gluco-hidrolase, α -D-manosídeo mano-hidrolase, acilneuraminil-hidrolase, polissacárido capsular de *Aerobacter* galacto-hidrolase, β -D-fructofuranosídeo fructo-hidrolase, 1-D-fucosídeo fuco-hidrolase, α -D-fructano fructo-hidrolase, β -D-galactosídeo galacto-hidrolase, 1,3-D-glucosídeo gluco-hidrolase, β -D-glucuronosídeo, glucuronoso-hidrolase, β -D-manosídeo

mano-hidrolase, β -N-acetil-D-hexosaminida N-acetil-hexosamino-hidrolase, sulfato de celulose sulfo-hidrolase, colagenase, dextrina 6- α -D-glucano-hidrolase, glicoproteína-fosfatidilinositol fosfatido-hidrolase, hialuronato 4-glicano-hidrolase, hialuronoglucuronidase, pectina pectil-hidrolase, peptidoglicano N-acetilmuramoil-hidrolase, fosfatidilcolina 2-acil-hidrolase, fosfatidilcolina 1-acil-hidrolase, poli(1,4- α -D-galacturonídeo), poli(1,4-(N-acetil- β -D-glucosaminida))-glicano-hidrolase, proteases, sacarose α -glicosidase, triacilglicerol acil-hidrolase, triacilglicerol proteína-acil-hidrolase.

6. A composição para utilização na inibição ou tratamento de uma infecção por biofilmes gastrointestinais, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, em que a composição compreende ainda uma subtilisina estável em ácido numa quantidade capaz de degradar o biofilme.
7. A composição para utilização na inibição ou tratamento de uma infecção por biofilmes gastrointestinais, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, em que a composição compreende ainda ADNase I estável em ácido numa quantidade capaz de degradar o biofilme.
8. A composição para utilização na inibição ou tratamento de uma infecção por biofilmes gastrointestinais, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, em que a composição compreende ainda pelo menos um de um óleo de orégão, berberina, ácido undecilénico, um antibiótico de prescrição, um antimicrobiano de

prescrição, um microrganismo probiótico ou um prebiótico.