

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

| | |
|--|---|
| (22) Data de pedido: 2004.08.17 | (73) Titular(es): NOVABAY PHARMACEUTICALS, INC. 5980 HORTON STREET SUITE 550 EMERYVILLE CA 94608 US |
| (30) Prioridade(s): 2003.08.18 US 496207 P | |
| (43) Data de publicação do pedido: 2006.05.17 | |
| (45) Data e BPI da concessão: 2014.01.01 049/2014 | (72) Inventor(es): MANSOUR BASSIRI US RAMIN NAJAFI US LU WANG US JANE YANG US |
| | (74) Mandatário: MANUEL BASTOS MONIZ PEREIRA RUA DOS BACALHOEIROs, 4 1100-070 LISBOA PT |

(54) Epígrafe: **AMINOÁCIDOS N,N-DIHALOGENADOS E SEUS DERIVADOS**

(57) Resumo:

PRESENTE INVENÇÃO REFERE-SE A COMPOSTOS E COMPOSIÇÕES ATIVOS BACTERICIDAS, ANTIBACTERIANOS, ANTI-INFECCIOSOS, ANTIMICROBIANOS, ESPORICIDAS, DESINFETANTES, ANTIFÚNGICOS E ANTIVIRAIS E A NOVOS USOS DESTAS COMPOSIÇÕES EM TERAPIA. ESTA DESCRIÇÃO TAMBÉM DESCREVE MÉTODOS DE USO PARA OS NOVOS COMPOSTOS E COMPOSIÇÕES. A DESCRIÇÃO DESCREVE ADICIONALMENTE MÉTODOS PARA PREPARAR ESTES COMPOSTOS.

DESCRIÇÃO

AMINOÁCIDOS N,N-DIHALOGENADOS E SEUS DERIVADOS

1. ÁREA DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se a compostos e composições bactericidas, antibacterianos, anti-infecciosos, antimicrobianos, esporicidas, desinfetantes, antifúngicos e antivirais baseados em aminoácidos e seus derivados que possuem a capacidade de libertar halogéneo e a novos usos destas composições em terapia.

Esta descrição também descreve métodos de uso para os novos compostos e composições. A descrição descreve adicionalmente métodos para preparar estes compostos. Mais especificamente, estes aminoácidos halogenados e os seus derivados também são referidos aqui como aminoácidos.

Os materiais de partida podem ser usados na sua forma de ésteres ou sais. O termo halogéneo como usado aqui inclui cloro, bromo e iodo.

Os materiais de partida para os aminoácidos NN-dihalo são geralmente compostos conhecidos ou podem ser preparados por métodos conhecidos. Estes materiais são descritos em Tetrahedron: Asymmetry 1997, 8 (13), FEMS Microbiol. Lett., 70, 23-28 (1990), Synth. Commun. 2725-2731 (1994), FEMS Microbiol. Lett. 108, 225-230 (1993), Neurosci. Lett. 21: 77-92 (1981), Br. J. Pharmacol. 75, 65, e por exemplo, em Prof. R. Noyori Nobel Lecture 'Asymmetric Catalysis: Science and Opportunities' de Dezembro 8, 2001 (www.nobel.se/chemistry/laureates/2001/noyori-lecture.pdf).

Um número de aminoácidos N, N-dihalogenados é conhecido. A respeito destes aminoácidos e seus derivados, nós fornecemos novas composições com propriedades bactericidas, antibacterianas, anti-infecciosas, antimicrobianas, antifúngicas e antivirais.

A invenção também se refere a um número de novos aminoácidos N, N-dihalogenados e seus derivados com propriedades bactericidas, antibacterianas, anti-infecciosas, esporicidas, antimicrobianas, antifúngicas e antivirais.

2. ANTECEDENTES DA TÉCNICA

As células imunitárias de um corpo, os neutrófilos e macrófagos que são conhecidos pelas suas capacidades para curar infeções podem gerar metabolitos reativos de oxigénio que destroem microrganismos e células normais ou neoplásticas (cancerígenas) e modulam repostas inflamatórias.

Neutrófilos podem ser ativados como uma resposta a estímulo inflamatório, infeção bacterial e / ou outras alterações membranares. Como resultado, eles produzem radicais superóxido tais como: $\text{HOO}\cdot$, $\text{O}_2\cdot$, e $\text{OH}\cdot$. Ião cloreto (Cl^-) a concentrações fisiológicas de 100-150 mM é oxidado por H_2O_2 , que é catalisado por mieloperoxidase (uma enzima do interior dos neutrófilos) para formar ácido hipocloroso (HOCl) e HCl .

A produção fisiológica de HOCl é rigorosamente regulada através de inibição por *feedback* por uma rede complexa de sinais bioquímicos. HOCl é gerado a uma concentração de 2×10^{-7} M por 10^6 neutrófilos ativados. Esta quantidade de HOCl

é estimada eliminar aproximadamente 150×10^6 bactérias E. coli. Assim que HOCl é produzido, é degradado rapidamente por reação com múltiplos substratos oxidáveis no interior do complexo sistema celular. Assim, as concentrações de metabolitos reativos de oxigénio são previstas reduzirem para níveis indetetáveis dentro de horas. No entanto, foi demonstrado que os neutrófilos podem usar o seu HOCl para gerar grandes quantidades de oxidantes de vida longa considerável, tais como N-cloraminas. Estes oxidantes de vida longa são gerados como monocloraminas de taurina (NCT, ou N-clorotaurina) e dicloroaminas de taurina (NNDCT, ou N,N-diclorotaurina) dependendo do pH do meio celular. Estes oxidantes são antimicrobianos potentes e têm um papel chave no sistema de defesa assim como na modulação de citocinas e fatores de crescimento no corpo hospedeiro.

3. DESCRIÇÃO DA TÉCNICA RELACIONADA

O Pedido de Patente Alemã 4041703 W. Gottardi descreve sais metais alcalinos de N-clorotaurina. O pedido menciona que não foi possível isolar N-clorotaurina como uma substância pura mas apenas na forma de uma solução diluída quando é preparada *in situ*. Trabalho posterior estabeleceu que a N-clorotaurina poderá ser preparada como descrito abaixo. O pedido de patente Alemã também descreve a preparação de sais metais alcalinos puros de N-clorotaurina na forma cristalina. Também divulga o uso destes sais como desinfetantes e bactericidas em aplicações medicinais para humanos. O pedido Alemão descreve as preparações dos sais metais alcalinos através da reação de taurina com um metal alcalino de cloramina, tal como sulfonamida sódica de n-clorobenzeno (Cloramina-B) ou sulfonamida sódica de N-cloro-4-metil-benzeno (Cloramina-T). Cloramina-B e

Cloramina-T estão listadas em Merck Index, Thirteenth Edition, 2001, Alíneas 2084 e 2085 na página 356.

W00222118 W. Gottardi et al. descrevem N-clorotaurina, em particular na sua forma de sal de sódio como útil para o tratamento de infeções fúngicas, tais como rinosinusite aguda ou crónica ou outras infeções fúngicas tais como *Otite*, *Dermatite*, semelhante a *Bronquite*, diversas formas de pneumonia, tais como *Pneumocystis carinii*, a infeção fúngica dos órgãos sexuais, tais como *Colpíte*, *Endometrite*, *Balanite*, infeções fúngicas do trato gastrointestinal, tais como *Estomatite*, *Esofagite*, *Enterite*, ou infeções fúngicas da uretra, tais como *Pielonefrite*, *Ureterite*, *Cistite*, ou *Uretrite*.

Recentemente, Gelder et al. sintetizaram e isolaram N,N-diclorotaurina como um pó (Gelder, N. M.; Bowers, R. Synthesis and characterization of N,N-dichlorinated amino acids: Taurine, Homotaurine, GABA and L-Leucine J. Neurochemical Research. 2001; 26:575-578). N-clorotaurina (NCT) e N,N-diclorotaurina (NNDCT) podem ser identificadas pelo seu espectro UV. NNDCT possui uma absorvância máxima a 302 nm com uma absorvidade molar de 332,9 M⁻¹cm⁻¹. Estes valores são de Gottardi, W.; Nagl, M. Arch. Pharm. Med. Chem. 2002, 9, 411-421. NCT possui uma absorvância máxima a 252 nm com uma absorvidade molar de 415 M⁻¹cm⁻¹.

Juan M. Antelo et al., J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2, 2000, 2109-2114 descreveram a catálise ácido-base geral na reação de desproporcionamento reversível de N-clorotaurina. Os autores também descrevem a preparação de soluções de N,N-diclorotaurina por desproporcionamento de N-clorotaurina a pH 2-2,5 e a estabilidade de N,N-

diclorotaurina a pH = 1,88. A perda de N, N-diclorotaurina foi menos de 5% após 5 horas.

US 4,386,103 refere-se a derivados de dicloro-aminoácidos que são úteis como agentes germicidas e fungicidas. Os compostos descritos em US 4,386,103 são aminoácidos e derivados dos mesmos todos possuindo um grupo ácido carboxílico. O documento não divulga aminoácidos ou derivados de aminoácidos possuindo um grupo ácido sulfônico.

WO 98/30116 refere-se à conservação de alimentos por pressão hidráulica aumentada. Em exemplos específicos do documento, monoclorotaurina e diclorotaurina são usadas como conservantes.

4. SUMÁRIO DA INVENÇÃO

No seu aspeto mais geral, a presente invenção fornece uma composição com atividade bactericida, antibacteriana, anti-infecciosa, antimicrobiana, desinfetante, antifúngica esporicida e antiviral compreendendo um N,N-dihalo-aminoácido selecionado de entre o grupo consistindo de N,N-dicloro-2,2-dimetiltaurina, N,N-dicloro-1,1,2,2-tetrametiltaurina, N,N-dibromo-2,2-dimetiltaurina, N,N-dibromo-1,1,2,2-tetrametiltaurina, N,N-dicloro-3,3-dimetilhomotaurina, ou um derivado dos mesmos; os derivados mencionados sendo selecionados de entre o grupo consistindo de sais farmacologicamente aceitáveis e ésteres com alcanóis C₁-C₆.

Uma composição preferida da invenção compreende possui uma concentração do N,N-dihaloaminoácido entre 0,1 a 50mM e um

intervalo de pH entre 2 a 7, ou 3,0 a 6,0, ou 3,0 a 5,0, ou 3,5.

Os sais farmacologicamente aceitáveis incluem sais com catiões farmacologicamente aceitáveis. Os sais do N,N-dihaloaminoácido incluem sais ou bases com o grupo $-SO_3H$. Sais farmacologicamente aceitáveis também incluem sais de amônia, metal alcalino, magnésio, ou cálcio e quaisquer sais de amina orgânicos. Sais metais alcalinos, Mg, Ca e sais Al são de interesse. Os sais metais alcalinos são de particular interesse, particularmente sais de lítio, sódio, ou potássio.

Exemplos de sais ácidos de adição incluem, mas não estão limitados a, sais ácidos minerais ou orgânicos de resíduos básicos tais como aminas; sais alcalinos ou orgânicos de resíduos acídicos tais como ácidos carboxílicos, e semelhantes. Sais farmacologicamente aceitáveis incluem, mas não estão limitados a, hidro-halogenetos, sulfatos, metosulfatos, metanosulfatos, toluenosulfatos, nitratos, fosfatos, maleatos, acetatos, lactatos e semelhantes.

Listas de sais adequados estão presentes em Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th ed, Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1985, p. 1418 ou The Merck Index, Thirteenth Edition, 2001, Published by Merck Research Laboratories Division of Merck & Co., Inc. nas páginas MISC-22 e MISC-23, as divulgações dos quais são aqui incorporadas por referência na sua totalidade.

O termo "composição" como usado aqui, refere-se a várias formas dos compostos ou composições da presente invenção, incluindo sólidos tais como pós, misturas de pós e semelhantes, emulsões, suspensões assim como soluções.

As composições e seus usos incluem novos N,N-dihaloaminoácidos ou seus derivados. As composições podem ser mantidas na forma acídica, que é a um pH inferior a 7, por exemplo 6,8, que é a um pH entre 2 a 7, que é a um intervalo de pH entre 2,0 a 6,8, 2,5 to 6,5, 2,5 to 6,0, ou 2,5 to 5,0, ou 3,0 to 5,0, ou a um pH de 3,5. Sob diferentes circunstâncias o pH pode ser mantido abaixo de 5, que é, a um intervalo de pH de 3 a 4,5, ou 3,5 a 4,5, ou a um pH 3,5. A chave é que o pH da composição é ácido. A seleção do pH irá depender de muitos fatores, incluindo o uso específico de N,N-dihaloaminoácido (tanto *in vitro* com *in vivo*), o tipo de infecção tratada (por exemplo, se a infecção é causada por bactérias, leveduras, fungos ou vírus), o local de infecção (por exemplo, se é uma infecção do olho, da laringe ou da uretra ou qualquer órgão ou tecido alvo), a gravidade da infecção, a sensibilidade do paciente, etc.

Noutro aspeto da composição, as soluções da invenção contêm N,N-dihaloaminoácidos no intervalo de concentração de 0,1 a 100 milimolar (mM).

Num outro aspeto a composição será isotónica e fisiologicamente equilibrada.

Os N,N-dihaloaminoácidos diferem significativamente de HOCl porque mantêm um potencial oxidativo com atividades bactericidas significativas, e no entanto são menos tóxicos do que HOCl. N,N-dihaloaminoácidos são também suficientemente estáveis para se difundirem a alguma distância antes de oxidarem moléculas alvo suscetíveis. Os N,N-dihaloaminoácidos de baixo peso molecular da presente

invenção com $n=0$ ou um número inteiro até 5 são moléculas mais hidrofílicas.

Surpreendentemente, foi descoberto que, conquanto os N,N-dihaloaminoácidos da invenção possuem forte atividade bactericida, antibacteriana, anti-infecciosa, antimicrobiana, esporicida, desinfetante, antifúngica e antiviral, possuem reduzida citotoxicidade.

Num outro aspeto as composições da invenção são estabilizadas para corresponder à necessidade de serem utilizáveis como composições para o tratamento ou prevenção de contaminações e infeções de bactérias, micróbios, esporos, fungos e vírus.

Num outro aspeto a estabilização da composição é providenciada armazenando as composições num recipiente que assegurará a estabilidade suficiente para controlar infeções ou contaminações de bactérias, micróbios, esporos, fungos e vírus.

Derivados dos compostos incluem sais farmacologicamente aceitáveis, e ésteres com alcanóis inferiores. O termo "inferiores" neste contexto inclui resíduos com 1 a 6, preferencialmente 1 a 4 átomos de carbono.

Os derivados preferidos são sais farmacologicamente aceitáveis.

Num outro aspeto, as composições descritas acima incluem os seguintes compostos ou um derivado dos mesmos; os derivados mencionados sendo selecionados de entre o grupo consistindo de sais farmacologicamente aceitáveis e ésteres com alcanóis inferiores:

N,N-dicloro-2,2-dimetiltaurina;
N,N-dicloro-1,1,2,2-tetrametiltaurina;
N,N-dicloro-2,2-dimetiltaurina
N,N-dicloro-1,1,2,2-tetrametiltaurina;
N,N-dicloro-3,3-dimetil-homotaurina;
ou um sal farmacologicamente aceitável ou éster com
alcanóis C₁-C₆.

Num outro aspeto, as composições da invenção compreendem adicionalmente um veículo farmacologicamente aceitável.

Novamente, todos os atributos, características e intervalos descritos para a invenção, em qualquer aspeto, tanto descrito como de interesse ou particular ou não, podem ser combinados uns com os outros.

Processos para a Preparação de N,N-dihaloaminoácidos e Derivados

Os N,N-dihaloaminoácidos e derivados são preparados através da reação do aminoácido ou um derivado do mesmo a partir dos quais os aminoácidos halogenados são produzidos com uma fonte de halogéneo sob condições de reação que levam à substituição de dois átomos de hidrogénio no grupo amina do aminoácido com dois átomos de halogéneo, que são átomos de cloro ou bromo. Estes processos são conhecidos de químicos especializados na técnica.

Num aspeto da invenção, os aminoácidos que são usados como materiais de partida incluem taurina e homotaurina. Noutro aspeto, estes materiais de partida podem ser usados na sua forma de ésteres ou sais. Todos estes materiais de partida são ou bem conhecidos, comercialmente disponíveis, ou podem ser preparados por métodos de preparação bem conhecidos. Um

número de materiais de partida está comercialmente disponível, por exemplo na Sigma-Aldrich.

As seguintes fontes não-exclusivas de halogéneo podem ser usadas para produzir N,N-dihaloaminoácidos e seus derivados: HOCl ou os seus sais (por exemplo, NaOCl ou KOCl), sais N-haloarilosulfonamida, em que o grupo arilo contém entre 6 a 15 átomos de carbono com 1 ou 2 anéis aromáticos, 6 a 10, ou 6 a 8, átomos de carbono e um anel aromático, tal como N-halobenzeno-sulfonamida ou N-halo-4-alquilbenzenosulfonamida, em que o grupo alquilo é alquilo inferior de 1 a 4 carbonos, metilo ou etilo. As N-halobenzeno-sulfonamidas ou N-halo-4-alquilbenzenosulfonamidas são frequentemente usadas na forma dos seus sais, por exemplo, sais alcalinos, por exemplo, os seus sais de sódio ou potássio. Os reagentes mais frequentemente usados serão N-clorobenzenosulfonamida e N-cloro-4-metil-benzenosulfonamida na forma dos seus sais de sódio, porque estão comercialmente disponíveis no imediato. Outros agentes ou fontes libertadores de halogéneo não-limitantes podem ser HClO₂, N-cloro-succinimida ou N-bromosuccinimida, Cl₂, BR₂, e agentes de cloração, tais como aqueles usados em piscinas, ou combinações dos agentes.

Outros aminoácidos materiais de partida incluem 2,2-dimetil-hipotaurina, 1,1,2,2-tetrametil-hipotaurina, 2,2-dimetiltaurina, 1,1,2,2-tetrametiltaurina, e 3,3-dimetil-homotaurina.

Se a molécula da fonte de halogéneo liberta um halogéneo, obviamente para cada amina de partida da molécula de aminoácido ou derivado pelo menos duas moléculas da fonte de halogéneo serão usadas. Mais detalhes da preparação de

N,N-dihaloaminoácidos e seus derivados são fornecidos nos exemplos.

Compostos de acordo com a presente invenção podem também incluir os seus estereoisômeros (enantiômeros e diestereoisômeros) assim como as misturas racêmicas do composto. Os isômeros individuais, tais como os R, S, RR, SS, RS, SR, etc. puros podem ser preparados tratando a mistura isomérica com um agente resolvente opticamente ativo para formar um par de compostos diestereoisoméricos. Os compostos diestereoisoméricos podem ser separados e o enantiômero ou diestereoisômero opticamente puro podem ser isolados usando procedimentos conhecidos na técnica. Uma vez que os diestereoisômeros possuem propriedades físicas distintas (tais como pontos de fusão, pontos de ebulição, solubilidades, reatividade, etc.), podem ser prontamente separados tirando vantagem destas dissimilaridades. Os diestereoisômeros podem ser separados por cromatografia ou, preferencialmente, por separação ou técnicas de resolução baseadas nas diferenças na solubilidade. Uma descrição mais detalhada das técnicas aplicáveis à resolução de estereoisômeros de compostos das suas misturas racêmicas pode ser encontrada em Jean Jacques Andre Collet, Samuel H. Wilen, *Enantiomers, Racemates and Resolutions*, John Wiley & Sons, Inc. (1981) e referências ali citadas.

O material de partida de aminoácidos é dissolvido num álcool inferior (por exemplo, metanol ou etanol) e tornado ácido. A esta solução uma solução NaOCl aquosa é adicionada. A reação resulta na cloração do grupo amina e na precipitação de cloreto de sódio. O solvente é evaporado a temperaturas baixas, por exemplo, abaixo de 30°C e um resíduo é obtido. O resíduo é recolhido num solvente e o N,N-dihaloaminoácido isolado por extração com um solvente

não miscível com a fase aquosa de alcanol inferior. De modo semelhante, o N,N-dihaloaminoácido pode ser preparado reagindo o material de partida de aminoácido com HOCl.

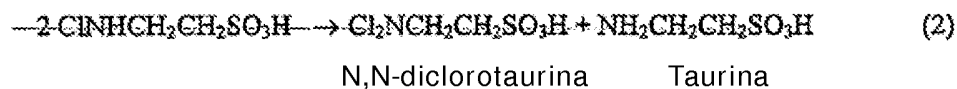
Conformemente, os análogos de bromo podem também ser preparados com NaOBr como o agente halogenante.

De acordo com J Marcinkiewicz et al 2000 (J of Inflammatory Research 49, 280-289), NNDCT (N,N-diclorotaurina) pode ser sintetizada em solução reagindo HOCl com taurina a pH 5. NNDCT também pode ser gerada na oxidação do sal de Bunte ($\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{S}-\text{SO}_3\text{H}$) (Chinake et al. Oxyhalogen-sulfur chemistry: kinetics and mechanism of the oxidation of a Bunte salt 2-aminoethanethiolsulfuric acid by chlorite. Phys. Chem. Chem. Phys. 2001; 3:4957-4964) e hipotaurina ($\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{SO}_2\text{H}$) por clorito (ClO_2^-) (Martincigh, B. S.; Mundoma, C.; Simoyi, R. H.; Antioxidant chemistry: Hypotaurine-aurine oxidation by chlorite. J. Phys. Chem. A. 1998; 102:9838-9846).

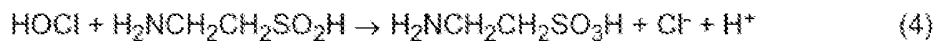
As reações estão representadas nas equações 1-6:



N-clorotaurina desproporciona para formar N,N-diclorotaurina e taurina em solução acídica:



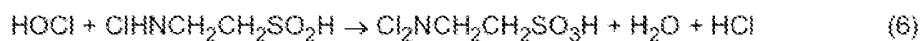
HOCl pode rapidamente oxidar a restante hipotaurina para taurina:



ou oxidar hipotaurina para N-clorohipotaurina:

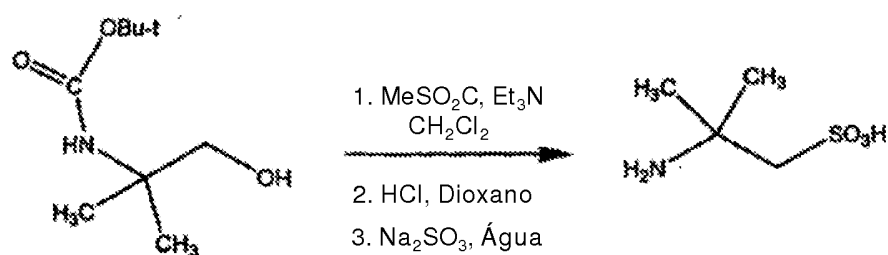


Em condições altamente acídicas, HOCl oxida N-clorohipotaurina para N,N-diclorotaurina.

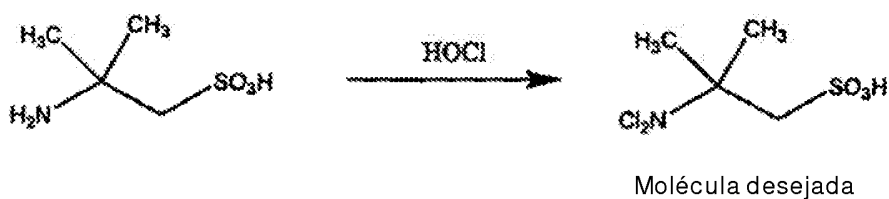


Estes compostos com pelo menos um grupo alquilo inferior acoplado ao átomo de carbono ao qual o grupo amina está acoplado são aminoácidos dihalogenados mais estáveis.

Estes compostos podem ser preparados da seguinte forma:



Tet. Let. 1996, 37(40), 7319-7322



Sais farmacologicamente aceitáveis dos compostos da invenção podem ser preparados reagindo as formas livres de ácido ou base destes compostos com uma quantidade estequiométrica ou maior da base ou ácido apropriado em água ou num solvente orgânico, ou numa mistura dos dois; em geral, por exemplo, meio não-aquoso como éter, acetato de etilo, etanol, isopropanol. Os sais da invenção podem também ser preparados por troca iônica, por exemplo.

Sais podem também ser preparados reagindo os N,N-dihaloaminoácidos de outras maneiras conhecidas per se incluindo um método análogo ao método descrito no Pedido de Patente Alemão 4041703 W. Gottardi.

Os sais de sódio dos N,N-dihaloaminoácidos podem ser convertidos nos ésteres alquilo inferiores reagindo o sal de sódio com um sulfato de dialquilo inferior, tal como sulfato de dimetilo ou dietilo na presença de bicarbonato de sódio.

Métodos de Uso para N,N-dihaloaminoácidos e Derivados

Os N,N-dihaloaminoácidos e seus derivados são agentes antimicrobianos que eliminam micróbios a concentrações relativamente baixas e podem ser tolerados por células eucarióticas a concentrações significativamente elevadas. Esta amplitude de atividade terapêutica e índice terapêutico favorável é absolutamente crucial considerando o papel fisiológico das cloraminas na destruição de patogêneos in vivo. Para um produto antimicrobiano que é aplicado a tecidos tais como oftálmico, pele ou quaisquer outras áreas sensíveis, a sua segurança e eficácia não podem ser comprometidas. Assim, o uso de tal(is) produto(s)

em humanos para tratar infecções é sustentado pelos nossos resultados positivos.

Os N,N-dihaloaminoácidos e seus derivados possuem as seguintes potenciais áreas de aplicação: solução para lentes de contacto, inativação bacteriana, oftálmica, preparação cirúrgica geral, desinfecção de instrumentos cirúrgicos, desinfecção de dispositivos e instrumentos médicos, desinfecção de instrumentos dentários e aplicação em saneamento alimentar incluindo desinfecção de áreas de superfície. São também úteis em formulações de vacinas (como conservantes e potencialmente adjuvantes), como compostos com efeito viricida, para a inativação viral de vírus tanto de classe de DNA como de RNA incluindo HIV, hepatite A, vírus respiratório sincicial, vírus do Nilo Ocidental, HSV-1, HSV-2, SARS, vírus de influenza e para-influenza, picomavírus, e vírus vaccinia (como um Modelo para Poxvírus). Adicionalmente, estes compostos são também úteis para o tratamento de infecções fúngicas, tais como Rinosinusite aguda ou crónica ou outras infecções fúngicas tais como *Otite*, *Dermatite*, semelhante de *Bronquite*, pneumonias tais como *Pneumocystis carinii*, a infecção fúngica de órgãos sexuais, tais como *Colpíte*, *Endometrite*, *Balanite*, infecções fúngicas do trato gastrointestinal, tais como *Estomatite*, *Esofagite*, *Enterite*, ou infecções fúngicas da uretra, tais como *Pielonefrite*, *Ureterite*, *Cistite*, ou *Uretrite*. Além disso, as composições descritas aqui possuem atividade antimicrobiana contra muitos outros microrganismos, incluindo *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA), *Pseudomonas aeruginosa*, *Lactobacillus*, leveduras, enterococcus resistentes a vancomicina, bolores, e esporos, incluindo esporos de antraz. Em particular, as soluções da presente invenção podem ser úteis no tratamento

de várias estirpes diferentes de *Bacillus anthracis*. Bactérias resistentes a vancomicina, MRSA, e outras são facilmente destruídas pelas composições da presente invenção.

Estas composições da invenção podem ser usadas num método para o tratamento de várias condições médicas selecionadas de entre os grupos consistindo de promoção de cura de feridas, redução de patogéneos em feridas abertas, descontaminação de feridas, desinfeção ou descontaminação ocular, desinfeção oral, terapia antifúngica, oftálmica, cirurgia oral e odontologia, aplicações otológicas, redução de patogéneos em infeções pulmonares, redução de patogéneos nas nádegas, lavagem, redução de carga infecciosa em órgãos para transplante, redução de carga bacteriana em transplante autólogo ou tecido artificial, terapia de desinfeção oral antifúngica, tratamento de biofilme para fibrose cística ou outras doenças que produzem biofilmes, tratamento de infeções virais, tratamento de doenças de pele, e regeneração e reparação de tecidos, que o método compreende o uso da solução da invenção aplicando a solução no local onde o tratamento é necessário.

A dosagem para uso em feridas crónicas de aproximadamente 25 cm quadrados pode estar no intervalo de 30 mL de solução contendo 2 a 200 mg de princípio ativo onde o princípio ativo é NNDCT aplicado uma a dez vezes por dia. Em certos casos a composição pode conter 0,1 a 100 mM de princípio ativo. Dosagens em outras aplicações seriam ajustadas à área de superfície dependendo de onde a atividade antimicrobiana é necessária e da gravidade da infeção.

As Composições da Invenção

Num aspeto as composições em forma de soluções são osmoticamente equilibradas, e possuem mínima citotoxicidade.

Noutro aspeto as composições descritas aqui possuem um índice terapêutico de cerca de 1000 a cerca de 5000, definido pelo rácio dos seus índices de citotoxicidade de concentração de inibição 50% (IC₅₀) após uma hora contra células epiteliais de pulmão L929 de ratinho e fibroblastos humanos primários em relação às suas Concentrações Mínimas Bactericidas contra *Escherichia coli* ATCC 11229 a 37°C durante uma hora.

Uma vez que as composições da presente invenção são não-toxicas e possuem propriedades antibacterianas, são úteis em qualquer aplicação nas quais propriedades antimicrobianas são desejáveis. Tais aplicações incluem, sem limitação, tratamento de feridas, nádegas, e aftas; irrigação; limpeza de locais de tecido (p.ex., pre- e pós-operativo); aplicações oftálmicas (p.ex., em soluções para lentes de contacto ou para irrigação do olho antes, durante, ou após cirurgia oftálmica); para aplicações dermatológicas, psoríase; e várias aplicações que são prontamente evidentes a alguém especializado na técnica. A aplicação também inclui a eliminação ou redução de patogéneos em superfícies incluindo equipamento médico, instrumentos, dispositivos ou alimentos (sem limitar a carne, frutos, vegetais) e superfícies de contacto com alimentos incluindo a eliminação ou redução de biofilmes bacterianos. Ao contrário de muitas composições anti-infecciosas usadas em aplicações semelhantes, as composições da invenção apresentam mínimos a nenhuns efeitos secundários.

As composições da invenção que compreendem N,N-dihaloaminoácidos ou seus derivados podem ser incorporadas uma variedade de aplicações, incluindo ligaduras ou pensos. As composições na forma de soluções acídicas fisiologicamente equilibradas podem ser usadas em combinação com ligaduras especialmente delineadas num protocolo de tratamento de feridas. A ligadura especializada pode incluir uma abertura ou "janela" através da qual materiais de tratamento tópico tais como a solução da presente invenção podem ser aplicados.

Também é aqui divulgado um artigo de fabrico compreendendo a composição da invenção contida num recipiente. Superfícies do recipiente que estão em contacto com a composição da invenção são feitas de material que não é reativo com um agente oxidante.

A estabilidade de uma solução de N,N-dihaloaminoácidos e seus derivados permite o uso de formas diferentes de empacotamento que seriam práticas para uso dos pacientes. A solução pode ser empacotada em várias garrafas de vidro âmbar de 30 mL de uso único com tampas de rosca revestidas de Teflon e fechadas com fita-cola para assegurar o estancamento de gás. Num aspeto, a mesma solução pode ser empacotada numa garrafa de vidro âmbar de 250 mL ou numa garrafa de plástico não-reativa de 250 mL. Contudo, garrafas até 5 litros podem ser usadas, porque tais maiores volumes são práticos para o tratamento de nádegas. Armazenamento nestes recipientes assegura estabilidade a longo-termo necessária para os usos das composições descritas aqui em detalhe. Adicionalmente, empacotamento pode incluir um sistema de câmara dupla onde o componente A é misturado com o componente B para formar o produto final, N,N-dihaloaminoácido ou seus derivados.

Num aspeto, as soluções da presente invenção podem ser armazenadas em recipientes descartáveis. Noutro aspeto, as soluções da invenção podem ser armazenadas em recipientes de uso único de vários tamanhos diferentes, configurações, e possuindo diferentes volumes como adequado para as aplicações desejadas como divulgado aqui. Em algumas aplicações, por exemplo, a solução da invenção pode ser armazenada em recipientes de 30 mL de uso único, opcionalmente descartáveis. Num aspeto a presente composição pode ser armazenada como pó juntamente com excipientes farmacologicamente aceites sob gás inerte a temperatura ambiente.

As composições da invenção podem incluir os seguintes veículos farmacologicamente aceitáveis: cloreto de sódio para obter isotonicidade, tampões, estabilizadores, solventes, aromatizantes (no caso de administração oral ou via nasofaríngea e indústria alimentar), conservantes, diluentes, aditivos e outras substâncias ou excipientes auxiliares. Exemplos específicos de veículos e excipientes farmacologicamente aceitáveis que podem ser usados são descritos em Remington: The Science and Practice of Pharmacy, A. Gennaro, ed., 20th edition, Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia, PA; Advances in Pharmaceutical Sciences (David Ganderton, Trevor Jones, Eds., 1992); Advances in Pharmaceutical Sciences Vol 7. (David Ganderton, Trevor Jones, James McGinity, Eds., 1995), cujas divulgações são incorporadas aqui na sua totalidade. Em geral, água, um óleo adequado, soluções salinas, álcoois inferiores, e glicóis tais como propileno glicol ou polietileno glicóis podem ser veículos adequados para soluções. Num aspeto, as soluções contêm o princípio ativo em forma dissolvente em água ou meio aquoso

dissolvente, por exemplo como um sal, juntamente com agentes estabilizadores adequados, e se necessário, substâncias tampão. Adicionalmente, soluções podem conter conservantes, tais como cloreto de benzalcônio, metil- ou propil-parabeno, e clorobutanol. Veículos farmacológicos adequados são descritos em Remington: The Science and Practice of Pharmacy, o texto de referência *standard* nesta área identificado acima.

As composições podem compreender adicionalmente outros princípios ativos, tais como HOCl ou outros antibacterianos desde que estes não interfiram com a estabilidade ou função dos N,N-dihaloaminoácidos da invenção.

As quantidades ou concentrações de N,N-dihaloaminoácidos nas composições da invenção podem variar entre intervalos alargados. Por exemplo, uma composição pode conter entre 0,001 a 100% por peso da composição do N,N-dihaloaminoácido. No caso de 100%, a composição pode ser aplicada na forma de um pó sem qualquer substância veículo. Um intervalo típico da composição irá incluir 0,1 a 95% por peso da composição do N,N-dihaloaminoácido, por exemplo, 0,1 a 50%, ou 0,1 a 10%, por exemplo, 0,5 a 5%. Nas soluções, normalmente uma concentração mais baixa de N,N-dihaloaminoácido será aplicada. Por exemplo, uma concentração de 1 a 2% pode ser apropriada no caso de um enxaguamento ou vaporizador.

No caso de aplicação por via nasofaríngea um cateter para aplicação nasal contendo uma solução 1% de N,N-dihaloaminoácido ou o seu sal com um pH de 3,5 a 5 pode ser usado durante várias semanas usando cerca de 10 a 15 mL da solução para cada tratamento. Após cada tratamento a solução de enxaguamento será aspirada.

Métodos específicos para usar as composições da invenção

Num aspeto, as composições da invenção são administradas ou usadas topicamente.

As soluções acídicas da presente invenção podem ser usadas ao tratar um número de pacientes com feridas profundas, que não respondem a medicações usuais e tratamentos localmente aplicados. Num aspeto a presente invenção fornece um método para o tratamento de várias condições médicas tais como a promoção de cura de feridas, redução de patógenos em feridas abertas, descontaminação de feridas, desinfeção ou descontaminação ocular, desinfeção oral, terapia antifúngica, aplicações oftálmicas, redução de patógenos em infeções pulmonares, redução de patógenos em queimaduras, lavagem, redução da carga infecciosa em órgãos para transplante, redução da carga bacteriana em transplante autólogo ou de tecido artificial, terapia antifúngica de desinfeção oral, tratamento de biofilme para fibrose cística e doenças relacionadas, tratamento de infeções virais, tratamento de doenças de pele, e regeneração e reparação de tecidos, que métodos compreendem o uso da solução da presente invenção aplicando a solução no local onde o tratamento é necessário. Exemplos não-limitantes de biofilme que podem ser tratados usando as soluções da presente invenção incluem aqueles mencionados no artigo de revisão intitulado "Is there a role for quorum signals in bacterial biofilms?" por S. Kjelleberg, e S. Molin, PMID: 12057677 (indexado por PubMed para MEDLINE).

As soluções da invenção podem ser eficientes em reduzir a carga bacteriana assim melhorando a cura de feridas. As

soluções poderão ser bem toleradas, melhorar a granulação do tecido de ferida, reduzir a necessidade de desbridamento comparadas com soluções da técnica antecedente, com pacientes descrevendo menos dor durante o seu tratamento.

Cuidado Oral

A solução acídica da invenção pode ser usada para tratar aftas (úlceras orais) ou herpes labial enxaguando a área afetada. Por exemplo, a solução pode ser usada embebendo o herpes labial 3-4 vezes por dia, de cada vez com 2-3 aplicações, e colocando a solução em contacto com o herpes labial durante 20-30 segundos. A solução pode também ser usada como elixir oral para higiene dental e oral e para controlar a infeção. Neste caso, a solução pode ser usada como uma solução de gargarejo para combater infeção da garganta. A solução pode ser aplicada com a ajuda de um cotonete para áreas mais específicas. A solução pode ser usada uma ou várias vezes por dia de acordo com as necessidades e condição de um paciente.

Cuidado Oftálmico

A solução acídica fisiologicamente equilibrada da invenção pode ser usada no lugar de uma solução salina para remover um corpo estranho de, para enxaguar, ou para irrigar os olhos. Também pode ser aplicada topicamente antes ou após cirurgia para desinfetar um olho e tecidos circundantes. A solução pode ser usada uma ou várias vezes por dia de acordo com as necessidades e condição de um paciente. A solução pode ser aplicada gotejando-a diretamente para o olho como necessário. Também pode ser aplicada para limpar os olhos esfregando gentilmente os olhos com gaze saturada.

A solução pode também ser decantada num pequeno lavador de olhos, depois o lavador é invertido sobre o olho e a pálpebra aberta e fechada várias vezes.

A solução acídica fisiologicamente equilibrada da invenção pode ser usada para o tratamento de desinfeção ou descontaminação ocular. Adicionalmente, pode ser usada como substituto de nitrato de prata na desinfeção dos olhos de neonatais.

As soluções da presente invenção podem ser usadas para limpar olhos em adultos e em pediatria. Por exemplo, várias infeções virais, infeções bacterianas ou fúngicas, ou agentes patogénicos podem ser eficientemente tratados com a presente invenção. Exemplos não-limitantes de agentes patogénicos que poderão ser tratados com sucesso com a solução da presente invenção incluem chlamydia trachomatis, gonorreia assim como outras infeções bacterianas, fúngicas, e virais.

O leitor verá que a solução da invenção tem aplicações no tratamento de muitos tipos diferentes de feridas, incluindo, sem limitações, úlceras diabéticas, gangrena, úlceras venosas, úlceras de decúbito, úlceras de pressão, feridas devido a mordidas, feridas traumáticas agudas, feridas cirúrgicas e queimaduras. A composição da invenção também é útil como uma solução de irrigação, por exemplo, durante procedimentos dentários, periodontais, e oftálmicos. A composição da invenção pode também ser usada para limpeza pré- e pós-operativa de locais de tecidos, e como uma solução de gargarejo para tratamento de aftas.

Métodos de Usar uma Solução para Desinfeção de Pele:

A solução da presente invenção pode também ser usada para tratar pele que está infetada. Numa pele de um paciente evidenciando sinais médicos de infeção, a solução da presente invenção pode ser aplicada diretamente na área da pele que está infetada. Após pelo menos uma aplicação da solução na pele infetada usando métodos de aplicação padrão conhecidos na técnica, as propriedades desinfetantes da solução podem ser notadas.

Redução de Patogéneos em Infeções Pulmonares:

A solução da presente invenção pode ser usada para a redução de patogéneos em infeções pulmonares. Por exemplo, várias infeções virais ou bacterianas e fúngicas podem ser eficientemente tratadas com a solução da presente invenção. Exemplos não-limitantes de infeções que podem ser eficientemente tratadas usando a solução da presente invenção incluem esporos de antraz nos pulmões, e a redução de bactérias causadoras de pneumonia nos pulmões, incluindo bactérias estreptocócicas e semelhantes.

Métodos de Usar as Soluções da Invenção em Ginecologia:

A composição da presente invenção pode ser usada para o tratamento de infeções ginecológicas, tais como infeções do trato urinário e semelhantes. Por exemplo, vários microrganismos, leveduras (p.ex., *Monilia*, *Candida albicans*, etc), infeções bacterianas, HSV-2, HIV ou outros agentes patogénicos podem ser eficientemente tratados com a solução de presente invenção. Opcionalmente, a aplicação das soluções da presente invenção pode ser usada com outras medicações para o tratamento de infeções ginecológicas. Por exemplo, uso como uma lavagem do canal de parto em pacientes do sexo feminino grávidas com doenças venéreas

suspeitadas, e potencialmente como solução de banho e limpeza em bebés imediatamente após o nascimento nas salas de parto de hospitais ou como desinfetantes em cateteres e *shunt* em salas de diálise.

Métodos de Uso como um Tratamento para Infecções Tópicas

Os compostos da corrente invenção podem ser usados para tratar infeções tópicas incorporando-os em cremes, pomadas ou loções para uso em tais condições. Tais cremes, pomadas ou loções podem ser usados numa variedade alargada de condições de pele e podem incorporar intensificadores de penetração para passar a atividade antimicrobiana do composto a micróbios presentes por baixo das camadas exteriores (epiderme) da pele.

Métodos de Uso para Prevenir Infecções em Locais de Cirurgia

Soluções isotónicas da presente invenção podem ser usadas como um irrigador durante cirurgia para prevenir o desenvolvimento de infeções nos locais de cirurgia, que frequentemente levam a hospitalizações prolongadas e, ocasionalmente, à morte. O uso de uma solução da presente invenção no lugar de soluções salinas poderia reduzir substancialmente os riscos de tais infeções especialmente no caso de cirurgia gástrica e de operações prolongadas, onde a taxa de infeções pode ser tão alta quão 10%.

Métodos de Uso para Desinfecção de Dispositivos Médicos e Instrumentos Cirúrgicos

A solução da presente invenção pode ser usada para a redução de patógenos nas superfícies de dispositivos médicos e instrumentos cirúrgicos para prevenir infecção do paciente no qual os instrumentos e dispositivos são usados, ou no qual são implantados.

A solução pode também ser usada para a redução ou eliminação de infecções que ocorrem nas portas de entrada de cateteres e *shunts* que são particularmente propícias a tais infecções.

Método de Uso para Desinfecção de Superfície

A solução da presente invenção pode ser aplicada diretamente ou através de entrega a partir de um dispositivo que cria um vapor (tratamento por aerossol) nas superfícies de uma sala, interior de veículo ou outro espaço largo fechado para reduzir ou eliminar patógenos infecciosos que se suspeitam estar presentes. Em tal aplicação, esta pode ser usada para descontaminar teatros de operação onde patógenos infecciosos foram detetados ou salas, veículos e outras superfícies onde agentes de guerra biológica foram dispersos.

Método de Uso para Melhorar a Segurança Alimentar

A solução da presente invenção pode ser usada para reduzir patógenos em alimentos (incluindo, sem limitação, carnes, frutos e vegetais). A solução poderá ser aplicada como uma lavagem ou vapor aos alimentos, ou os alimentos poderão ser submersos na solução. A taurina seria produto residual principal de tal aplicação e a taurina é um nutriente essencial que é considerado seguro na alimentação humana.

A solução da presente invenção pode também ser aplicada a superfícies e instrumentos usados na preparação de alimentos para prevenir a transferência de patógenos de tais superfícies e instrumentos para os alimentos.

Método de Uso como um Conservante Antimicrobiano

Os compostos da presente invenção podem ser usados como um meio de assegurar que micróbios não conseguem sobreviver em soluções projetadas para uso em injeção, infusão ou para uso no olho por incorporação de uma quantidade adequada de tal composto na solução na altura da fabricação.

Método de Uso como um Antimicrobiano

A solução da presente invenção pode ser usada como um meio de desinfetar de modo seguro e rápido as mãos de cirurgiões e enfermeiros para reduzir o risco de transportar agentes infecciosos para uma sala de operação. Adicionalmente, a solução da presente invenção pode ser usada para eliminar o agente infeccioso da pele de pacientes (pré e pós operativos) na área de uma incisão cirúrgica.

Método de Tratamento de Feridas

Pacientes sofrendo de feridas de longa duração não-curáveis devem ser tratados com a composição acídica da presente invenção todos os dias, tipicamente uma ou duas vezes por dia.

A solução da invenção pode ser usada do seguinte modo: um material de gaze ou enchimento de gaze é pré-embebido com solução suficiente para o saturar e é depois premido para remover solução em excesso. Isto remove espécies presentes

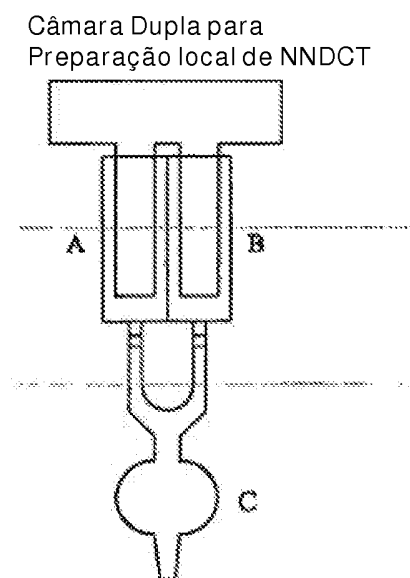
na gaze que iriam reagir com e reduzir a eficácia da solução da invenção. A gaze é molhada depois deste procedimento, mas não encharcada. Solução adicional é depois aplicada para molhar completamente a gaze, que é depois imediatamente aplicada à ferida. Alternativamente, a gaze pode ser aplicada na ferida e depois solução adicional é aplicada. Tipicamente o local de ferida está preenchido com a gaze embebida em solução, e opcionalmente, uma gaze de Vaselina pode ser aplicada em cima da ferida preenchida para mantê-la húmida e livre de germes contaminantes. O local de ferida é depois ligado com pensos como é *standard* na técnica. A solução pode também ser usada para limpar uma ferida decantando-a diretamente no local de ferida para remover qualquer tecido necrótico por um procedimento mecânico, e também como um limpador ou irrigador.

O paciente pode também usar um "estojo de primeiros socorros" fornecido por NovaCal que permite o paciente decantar periodicamente a solução da presente invenção no local de ferida sem ter de remover o penso. Este estojo fornece facilidade de utilização, portabilidade e reduz drasticamente a exposição da ferida a / de re-infeção. O estojo de primeiros socorros inclui uma embalagem contendo a solução da invenção e material de ligadura. Frequentemente o estojo contém uma embalagem contendo a solução da invenção e uma ligadura especializada para uso em combinação com a solução. A ligadura especializada mantém a pele à volta da ferida seca enquanto a ferida é tratada. Além disso, a ligadura pode ser aplicada no gabinete de um médico ou num hospital, com o paciente continuando tratamento em casa; pode ser aplicada e usada em casa de acordo com as instruções de um médico; ou para pequenas lesões, o estojo de primeiros socorros pode ser usado pelo paciente como um tratamento sem receita médica.

Embalagem para certos usos

Noutro aspeto da invenção, as soluções da presente invenção podem ser embaladas para conter a solução em recipientes individuais, de uso único. Os recipientes de uso único podem ser usados, por exemplo, para aplicação em mudança única de penso ou equivalentes dos mesmos. Os recipientes de uso único da presente invenção podem ser usados em conjunto com ligaduras normalmente usadas. Noutro aspeto da invenção, um estojo de primeiros socorros pode compreender recipientes de uso único das soluções da presente invenção com as ligaduras especializadas para várias aplicações.

Noutro aspeto da invenção, as soluções da presente invenção podem ser produzidas in-situ através do uso de um aparelho ou embalagem de câmara dupla como representado na figura com ou sem uma terceira câmara misturadora.



A Câmara Dupla pode consistir de duas seringas ou bolsas. Para fazer solução NNDCT com uma concentração de 3,2 mM a pH 3,5, por exemplo, a câmara A é preenchida com solução 12,8 mM NaOCl, a câmara B é preenchida com 3,3 mM taurina

dissolvida em solução salina 1,8% acidificada. A acidez da solução na câmara B é ajustada com 1 M HCl de modo a que quando as soluções nas duas câmaras são misturadas ou num tubo de entrega comum ou numa câmara misturadora C, a reação produzirá concentração de NNDCT e valor de pH desejados. Uma vez que Taurina é estável em solução acídica, e NaOCl é estável a temperatura ambiente, o uso do método de preparação local descrito acima pode evitar o problema de estabilidade da solução de NNDCT.

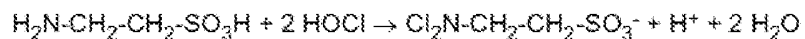
Exemplo 1 (Referência - não faz parte da invenção reivindicada)

Método de Preparação

Reagentes: Todas as soluções foram feitas com água desionizada ou Millipore. Solução NaOCl (6%) foi adquirida de VWR. Taurina foi adquirida de Sigma. NaCl e HCl são de qualidade analítica.

Síntese e Caracterização de N,N-diclorotaurina (NNDCT)

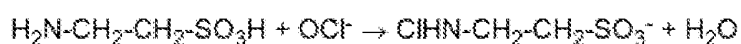
Neste estudo, NNDCT foi preparada dissolvendo pó de taurina em solução HOCl (pH 3,5) a um rácio HOCl/taurina de 2.



Para preparar 1 litro de 1,6 mM de NNDCT em solução NaCl 0,9% a pH 3,5, adicionar 8,6 g de NaCl num frasco volumétrico de 1000 mL, depois adicionar 500 mL de água Millipore ao frasco para dissolver o sal. Adicionar 2 mL de HCl 1 M à solução NaCl, seguida da adição de 22 mL de NaOCl

0,158 M. Misturar a solução. Depois adicionar 0,267 g de taurina ao frasco e encher o frasco volumétrico até à marca com água Millipore. Agitar a solução durante 5 minutos.

NNDCT possui uma absorvância máxima a 300 nm com uma absorvidade molar de $370 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Quando a solução OCl^- (pH 9,5) foi adicionada à solução de taurina, N-Clorotaurina (NCT) ($\text{ClHN-CH}_2\text{-CH}_2\text{-SO}_3^-$) foi o único produto formado.



NNDCT e NCT são espectrofotometricamente distinguíveis. NCT possui uma absorvância máxima a 252 nm. O rendimento de NNDCT foi calculado a partir da sua absorvância a 300 nm. Este método de preparação produz um rendimento de 91% de NNDCT. Titulação iodométrica produz um rácio I_2/NNDCT de 2. Isto sugere que NNDCT retém os dois equivalentes oxidativos de HOCl . Ambas as partes de cloro em NNDCT são capazes de oxidar o I^- para I_2 . NNDCT decompõe-se em solução, mas é mais estável a temperaturas baixas. Um estudo de estabilidade da solução NNDCT (pH 3,5) foi realizado a três temperaturas, 4°C , temperatura ambiente e 40°C . A solução foi selada em ampolas. A estabilidade de NNDCT às três temperaturas é na seguinte ordem: $4^\circ\text{C} > \text{temperatura ambiente} > 40^\circ\text{C}$. Em 4 semanas, 5,4% de NNDCT é perdido quando armazenado no frigorífico (4°C) ($[\text{NNDCT}]_{\text{inicial}} = 1,47 \text{ mM}$).

N,N-diclorotaurina é muito solúvel em água a um intervalo de pH entre 1 a 10. N,N-diclorotaurina pode ser identificada e determinada quantitativamente por espectroscopia UV. N,N-diclorotaurina possui uma absorvância

a UV máxima a 300 nm e uma absortividade molar de $370 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

NNDCT não é volátil. Uma solução de 1,47 mM em solução salina 0,9% a pH 3,5 foi colocada em duas garrafas de vidro. Uma garrafa foi fechada firmemente e a outra foi fechada folgadoamente. Não havia diferença na concentração de NNDCT nas duas garrafas após 4 semanas a temperatura ambiente.

O isolamento da forma em pó puro de NNDCT sob atmosfera inerte fornece uma fonte estável de NNDCT. Adicionalmente, a reformulação da matriz sólida de NNDCT em formato de comprimido ajuda a estabilização de NNDCT. Este comprimido foi selecionado para prevenir decomposição enquanto proporciona facilidade de uso na aplicação farmacêutica pretendida (desinfecções de lentes de contacto, outra aplicação).

Exemplo 2 (Referência - não faz parte da invenção reivindicada)

Atividade Antimicrobiana

Atividade Bactericida

Para determinar a atividade bactericida, nós usámos *Escherichia coli* (ATCC 11229). A cultura bacteriana foi diluída em solução salina estéril para preparar inóculo. Vários artigos de teste foram transferidos para tubos individuais já contendo $1,0 \times 10^5$ a $2,0 \times 10^5$ Unidades Formadoras de Colónias (UFC/mL) de bactérias e misturadas por vortexing gentil e depois incubadas a 37°C durante 1 ou 24 horas. Numa tentativa de mimicar tanto quanto possível

as condições, o que poderia ser produzido in vivo se os artigos de teste fossem usados como antissépticos, a preparação de culturas em placas de bactérias numa caixa de Petri foi realizada imediatamente depois do tempo de exposição designado sem a adição de um neutralizador, e independentemente com adição de neutralizador (como controlo). Portanto, 0,1 mL foi removido após 1 ou 24 horas de tempo de exposição e inoculado em placas. As placas foram incubadas a 37°C, e os números de bactérias foram contados por contagem direta de colónias para enumerar as bactérias sobreviventes como UFC/mL. Controlos positivos de crescimento foram feitos com solução salina 0,9% estéril. Todos os artigos de teste foram testados três vezes. Os resultados foram tabulados para mostrar a comparação da amplitude de eficiência antimicrobiana de HOCl, OCl⁻, NNDCT e solução salina 0,9% a vários níveis de pH. A pH 3,5 NNDCT exibiu uma amplitude de concentração antimicrobiana eficiente entre 0,0149 a 1,49 mM após 60 min, e uma amplitude de concentração antimicrobiana eficiente entre 0,000149 a 1,49 mM após 24 hrs, enquanto a amplitude de concentração antimicrobiana eficiente para HOCl iniciou a 0,016 após 60 min e a 0,0016 após 24 hrs. A pH 3,5 NNDCT foi mais ou tão eficiente contra E. coli como HOCl.

Nestes estudos pela primeira vez nós demonstrámos (em paralelo) os perfis bactericidas e de toxicidade celular de N-cloraminas quando comparados com vários artigos de teste. Tanto N-Clorotaurina (NCT) como N,N-Diclorotaurina (NNDCT) foram sintetizadas em NaCl a concentração fisiológica de 0,9% com pH controlado de acordo com procedimentos descritos acima. Estas soluções foram testadas em relação às suas propriedades físico-químicas antes de se analisarem as suas atividades biológicas. Soluções diluídas de NCT e NNDCT são incolores e isotónicas e apresentam atividade

antimicrobiana excepcionalmente rápida. A produção destes oxidantes parece ser dependente de pH. NCT é formada exclusivamente em pH alcalino, enquanto NNDCT é formada em pH ácido.

Ensaio antimicrobiano comparativo usando NNDCT na solução da presente invenção a pH 5,0 e 3,5 e NCT a pH 9,5 demonstraram uma eficiência de eliminação bacteriana (*E. coli*) de cerca de 300 vezes maior para NNDCT a pH 3,5 do que NNDCT a pH 5,0 e 1000 vezes maior eficiência de eliminação de NNDCT a pH 3,5 comparado com NCT a pH 9,5 dentro do tempo de exposição de 60 min a 37°C (Tabela-1).

Tabela-1: Sumário de Produtos:

| Produto | Cor | pH | Tonicidade | Estado Físico | CMB (µg/mL) |
|---|--------------|-----|------------|---------------|-------------|
| NCT | Transparente | 9,5 | Isotónica | solução | 142,5 |
| NNDCT | Transparente | 5,0 | Isotónica | solução | 38,0 |
| NNDCT | Transparente | 3,5 | Isotónica | solução | 0,136 |
| CMB é a Concentração Mínima Bactericida | | | | | |

A atividade antimicrobiana e tempo de eliminação não apenas foram dependentes da concentração mas também aumentaram declaradamente ao reduzir o pH. NCT é menos antimicrobiano do que NNDCT baseado numa concentração igual por um fator de 1000.

Exemplo 3 (Referência - não faz parte da invenção reivindicada)

Ensaio de Toxicidade:

A citotoxicidade foi avaliada por um sistema de ensaio colorimétrico, inicialmente descrito por Scudiero *et al.*, usando hidrato de ácido sulfónico de benzeno 3'-

(fenilamino-carbonilo)-3,4-tetrazólio-bis (4-metoxi-6-nitro) (XTT), ProCheck™ cell viability assay (Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines descrito por Scudiero DA, Shoemaker RAH, Paul KD, Monks A, Tierney S, Nofziger TH, Currens MJ, SeniffD, Boyd MR. Cancer Res. 1988 Sep 1;48(17):4827-33). Estratégias semelhantes para determinar a viabilidade celular são usadas por outros investigadores. Três tipos celulares foram usados: células epiteliais de pulmão (L929) de ratinho, fibroblastos primários de derme humana e células de queratinócitos humanos primários cultivadas em Dulbecco Modified Eagle's Medium e Keratinocyte defined medium com os correspondentes fatores de crescimento mais antibióticos. As células foram tripsinizadas e contadas ao microscópio e inoculadas a 1000-a-2000 células por alvéolo de uma placa de 96 alvéolos de base plana. As células foram permitidas crescer *overnight* a 37°C. No dia seguinte, o meio de cultura de tecidos foi removido e as células foram lavadas com meio 1X recentemente preparado e depois permaneceram em 50 µL de meio de cultura de tecidos. Os artigos de teste foram preparados como diluições duplas e 200 µL foram adicionados a cada conjunto de 4 alvéolos (volume total por alvéolo = 250 µL). As células foram expostas a artigos de teste durante 60 min a temperatura ambiente. Imediatamente após o tempo de exposição, o artigo de teste de cada alvéolo foi removido e as células foram nutridas com 250 µL de meio recentemente preparado. As placas foram incubadas a 37°C durante 18-20 horas. No dia seguinte o meio foi removido novamente e substituído com 100 µL/alvéolo de meio recentemente preparado contendo 10/100 µL reagente XTT. As células foram incubadas sob condições de crescimento (5% CO₂ a 37°C em incubador humedecido), protegidas da luz, até coloração ser obtida. A

absorvância foi lida a 450 nm com comprimento de onda de referência a 750 nm usando Molecular Device ThermoMax Plate reader, referenciando a placa nos alvéolos dos ensaios brancos apenas com meio. Células não-tratadas recebendo apenas reagentes XTT serviram de controlo positivo de proliferação celular.

Quando o índice de toxicidade de concentração inibitória celular (CCI_{50}) foi determinado (medido como 50% de células ainda vivas), o CCI_{50} de NNDCT foi 7 mM e mostrou uma viabilidade celular substancialmente mais elevada de Fibroblastos Primários de Derme Humana no Ensaio XTT do que o CI_{50} de HOCl ($IC_{50} = 0,8$ mM), betadine, ($IC_{50} = 0,01$ mM) ou OCl^- ($IC_{50} = 0,66$ mM). Resultados semelhantes foram obtidos no Ensaio XTT realizado em células epiteliais de pulmão (L929) de ratinho onde mais do que 90% de viabilidade para NNDCT foi observada a uma concentração de 7 mM versus substancialmente menos do que 50% de viabilidade para OCl^- a concentrações de 0,6 mM e betadine a concentrações de 0,02 mM.

Citotoxicidade e Índice Terapêutico

NNDCT tem sido submetido a rigorosos testes de segurança in vitro usando o ensaio celular *standard* Pharmacopoeia dos Estados Unidos (células epiteliais de pulmão L929 de ratinho), assim como células de derme humana primárias. Nós descobrimos que NNDCT possui uma toxicidade celular muito baixa em ambos os tipos celulares: Fibroblasto humano primário e células L929 comparados com outros artigos de teste antissépticos: HOCl e Iodopovidona (ver abaixo). Ao contrário de Iodopovidona onde a toxicidade celular era uma importante preocupação, NNDCT demonstrou ser compatível a

nível celular com um perfil de toxicidade muito mais seguro. De facto, o índice terapêutico (IT), que é definido como o rácio de uma concentração tolerada pelas células testadas (citotoxicidade in vitro ou IC₅₀) em relação à Concentração Mínima Bactericida (CMB) para NNDCT foi de cerca de 5000 comparado com cerca de 300 e 7 para HOCl e Iodopovidona, respetivamente (Tabela 2).

Tabela-2 Sumário dos dados de Concentração Mínima Bactericida (CMB) e Índice Terapêutico

| Produto | pH | CMB^a (µg/mL) | ICI₅₀ (µg/mL) | I.T.^b em HF^c |
|--|-----------|------------------------------------|-------------------------------------|---|
| NNDCT | 3,5 | 0,29 | 1442 | 4972 |
| HOCl | 3,5 | 0,16 | 47 | 297 |
| Iodopovidona | 4,2 | 0,38 | 2.5 | 7 |
| ^a Concentração Mínima Bactericida (CMB) ^b Índice Terapêutico ^c Células de fibroblasto de derme humana primárias | | | | |

A aplicação de NNDCT como desinfetante tópico mais seguro particularmente em pacientes de feridas oftálmicas crónicas não-curáveis e queimaduras poderá ser uma grande vantagem, porque o uso de outros desinfetantes com efeitos secundários tóxicos relevantes é altamente desaconselhado pelas autoridades dos cuidados de saúde. Uma vez que a segurança alimentar é também um principal problema de saúde, a aplicação de NNDCT como um desinfetante alargado pode ser estendido à indústria alimentar.

Exemplo 4

Como um exemplo, o procedimento para a preparação de ácido propanosulfónico N,N-dicloro-2-amino-2-metil é descrito da seguinte forma:

Passo 1 Síntese de ácido propanosulfônico 2-amino-2-metil (Braghiroli, D.; Bella, M. D. Tetrahedron Letters, 1996, 37, 7319-7322).

Ácido 2-amino-2-metilpropanosulfônico é preparado através da redução de 2-hidroxi-isobutironitrilo (cianohidrina de acetona) para 1-amino-2-metil-2-propanol, seguido de proteção com (Boc)₂O. Após mesilação e remoção do grupo protetor, o hidrocloreto obtido foi permitido reagir com sulfito de sódio para produzir ácido 1,1-dimetil-etanosulfônico.

Passo 2 Cloração de ácido 2-amino-2-metilpropanosulfônico

Para preparar 1 litro de 1,6 mM de N,N-Dicloro (NNDC-DMESA) em solução NaCl 0,9% a pH 3,5, adicionar 8,6 g de NaCl a um frasco volumétrico de 1000 mL, depois adicionar 500 mL água Millipore ao frasco para dissolver o sal. Adicionar 2 mL de 1 M HCl à solução de NaCl, seguido por adicionar 22 mL de 0,158 M NaOCl. Misturar a solução. Depois adicionar 0,355 g de ácido 2-amino-2-metilpropanosulfônico ao frasco e encher o frasco volumétrico até à marca com água Millipore. Agitar a solução até a reação estar completa como indicado por exemplo por UV ou NMR. Nós preparámos ornitina N,N-clorinada, N,N-dicloro homotaurina e N,N-dicloro alanina. Todos estes compostos dicloro possuem espectros UV ($\lambda_{\text{max}} \approx 300$ nm) e absortividades molares muito semelhantes.

Procedimento para preparar os compostos dicloro-aminoácido

A uma solução acídica de HOCl, uma quantidade estequiométrica de aminoácido ou o seu sal (pó) é adicionada (o rácio molar de HOCl : aminoácido = 2:1). Depois a solução de mistura é misturada durante 15 minutos.

O pH da solução resultante é mais baixo do que o pH da solução HOCl inicial. O produto é identificado e a conclusão da reação é seguida através de um espectrofotômetro UV-vis. O pH da solução é ajustado com ácido hidrocloreto para o valor de pH desejado. A concentração da solução é determinada num espectrofotômetro UV usando a correspondente absorvidade molar a λ_{max} . Um procedimento mais detalhado é descrito no seguinte exemplo.

Exemplo: Preparar 1 litro de solução Dicloro Homotaurina 0,05 M.

Passo 1. Preparar 1 litro de solução HOCl 0,1 M com um pH < 5.

Passo 2. Adicionar 8,06 g de homotaurina de sódio (sódio 3-amino-1-propanosulfônico, MW = 161,13) à solução de HOCl do passo 1. Misturar a solução durante 15 minutos.

Passo 3. Recolher uma alíquota da solução do passo 2 e fazer uma diluição a 100 vezes. Analisar o espectro UV da solução diluída para identificar o produto, que possui λ_{max} a 303 nm (ver a tabela anexada).

Passo 4

Ajustar o pH da solução resultante do passo 2 para o pH desejado com NaOH ou HCl.

Passo 5

Repetir o procedimento no passo 3 para medir a concentração de dicloro Homotaurina (a absorvidade molar é 329,0 M⁻¹cm⁻¹, ver tabela anexada).

Tabela

| |
|--|
| Absorvidades Molares dos Compostos N,N-Dicloro- e N,N-dibromo- Aminoácidos |
|--|

| Compostos | λ_{max} | ϵ (M ⁻¹ cm ⁻¹) |
|-------------------------------|------------------------|--|
| N,N-dicloro taurina | 302 | 332,9 ^a |
| N,N-dicloro homotaurina | 303 | 329,0 ^c |
| N,N-dicloro β -alanina | 301 | 327,6 ^c |
| N,N,N',N'-tetracloro ornitina | 300 ^{c,d} | 241 ^{c,d} |
| N,N-dicloro taurina | 302 | 332,9a |
| N,N-dibromo taurina | 241 | 2713 ^b , 2708 ^c |

^a Gottardi, W.; Nagl, M. Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem. 2002, 9, 411-421.

^b Thomas, E.; Bozeman, P.; Jefferson, M.; King, C. J. Bio. Chem. 1995, 7, 2906-2913.

^c determinado neste estudo.

^d baseado num rácio molar de 4:1 de agente de cloração para ornitina

Exemplo 5 (Referência - não faz parte da invenção reivindicada)

Os resultados da nossa descoberta providenciam sustentação para a atividade antimicrobiana de NNDCT em solução salina 0,9% a pH 3,5. Estas atividades antimicrobianas foram determinadas serem consideráveis numa amplitude de mM e aumentaram significativamente aumentando a concentração e ou tempo de exposição. Em contraste, a toxicidade celular foi observada a uma amplitude 1000 vezes superior na amplitude mM. Nós mostrámos que células tratadas com NNDCT foram capazes de tolerar o tratamento e capazes de prosseguirem o ciclo normal de proliferação celular comparada com células não-tratadas de controlo no nosso ensaio XTT.

Exemplo 6 (Referência - não faz parte da invenção reivindicada)

Soluções de NNDCT com uma concentração de 1,49 mM a pH 3,0, 3,5, 4,0, e 5,0 foram preparadas. Os espectros e concentrações das soluções foram medidos no espectrofotômetro UV-vis. Os resultados mostraram que o espectro e concentração de NNDCT não mudaram no intervalo de pH de 3,0 a 5,0.

Preparação

Adicionar 8,8 g NaCl, 2 mL HCl 1,0 M, e 0,278 g de taurina a um frasco volumétrico de 1000 mL, seguido de adicionar cerca de 800 mL de água desionizada ao frasco. Agitar o frasco para dissolver os pós de NaCl e taurina. Depois adicionar 22 mL da solução NaCl 0,15 M ao frasco. Encher o frasco até à marca com água desionizada. Misturar a solução com um agitador magnético durante 5 minutos. A concentração e pH da solução resultante foram medidos num espectrofotômetro UV-vis e num medidor de pH Beckman recentemente calibrado. Esta solução possui uma concentração de 1,49 mM e um valor de pH de 3,85.

100 mL da solução NNDCT acima (pH = 3,85) foram pipetados para uma proveta de 250 mL, 0,09 mL de solução HCl 1,0 M foi adicionado a esta solução e misturado. O pH final desta solução é 3,0.

100 mL da solução NNDCT com pH 3,85 foi pipetada para uma proveta de 250 mL, 0,003 mL de solução NaOH 5,0 M foi adicionado a esta solução e misturado. O pH final desta solução é 4,85.

Soluções com valores de pH variáveis foram preparadas de modo semelhante dentro do intervalo de pH de 3 a 5. Todas

as soluções exibiram estabilidade se armazenadas adequadamente como evidenciado pelos seus espectros UV.

REIVINDICAÇÕES

1. Uma composição com atividade bactericida, antibacteriana, anti-infecciosa, antimicrobiana, desinfetante, antifúngica, esporicida e antiviral compreendendo um N,N-dihaloaminoácido selecionado de entre o grupo consistindo de N,N-dicloro-2,2-dimetiltaurina, N,N-dicloro-1,1,2,2-tetrametiltaurina, N,N-dibromo-2,2-dimetiltaurina, N,N-dibromo-1,1,2,2-tetrametiltaurina, N,N-dicloro-3,3-dimetil-homotaurina, ou um derivado dos mesmos; os derivados mencionados sendo selecionados de entre o grupo consistindo de sais farmacologicamente aceitáveis e ésteres com alcanóis C1-C6.
2. A composição da reivindicação 1 em que a composição compreende um veículo farmacologicamente aceitável.
3. A composição da reivindicação 1 possuindo um intervalo de pH entre 2 a 7, ou 3,0 a 6,0, ou 3,0 a 5,0, ou 3,5.
4. A composição da reivindicação 1, a composição mencionada sendo isotônica e fisiologicamente equilibrada.
5. A composição da reivindicação 1 em que o N,N-dihaloaminoácido é selecionado de entre o grupo consistindo de N,N-dicloro-2,2-dimetiltaurina, N,N-dicloro-1,1,2,2-tetrametiltaurina, N,N-dibromo-2,2-dimetiltaurina, N,N-dibromo-1,1,2,2-tetrametiltaurina, e N,N-dicloro-3,3-dimetil-homotaurina.
6. Um N,N-dihaloaminoácido selecionado de entre o grupo consistindo de N,N-dicloro-2,2-dimetiltaurina, N,N-dicloro-1,1,2,2-tetrametiltaurina, N,N-dibromo-2,2-dimetiltaurina, N,N-dibromo-1,1,2,2-tetrametiltaurina, e N,N-dicloro-3,3-

dimetil-homotaurina, ou um derivado dos mesmos, em que o derivado é selecionado de entre o grupo consistindo de sais farmacologicamente aceitáveis e ésteres com alcanóis C₁-C₆.

7. O N,N-dihaloaminoácido da reivindicação 6 que é N,N-dicloro-2,2-dimetiltaurina, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo.

8. Uma composição compreendendo um N,N-dihaloaminoácido da reivindicação 6 ou um derivado do mesmo, o derivado mencionado sendo selecionado de entre o grupo consistindo de sais farmacologicamente aceitáveis e ésteres com alcanóis C₁-C₆, para uso em medicina.

9. O uso de um N,N-dihaloaminoácido de qualquer uma das reivindicações 6 a 8 na preparação de uma composição de atividade bactericida, antibacteriana, anti-infecciosa, antimicrobiana, esporicida, desinfetante, antifúngica e antiviral ou na preparação de uma composição de medicamento para uso bactericida, antibacteriano, anti-infeccioso, antimicrobiano, esporicida, desinfetante, antifúngico e antiviral.

10. Um método para desinfecção controlando ou prevenindo o crescimento de bactérias, micróbios, esporos, fungos ou vírus, o método mencionado compreendendo a aplicação de uma quantidade eficaz de uma composição de acordo com a reivindicação 1 a uma área, espaço ou material necessitando do controlo ou prevenção de crescimento ou proliferação mencionados com a condição de que o método não é usado como um método para tratamento do corpo humano ou animal por terapia.

11. O método da reivindicação 10, em que o pH da composição está entre 2 a 7, 3,0 a 6,8, ou 3,0 a 6,0, ou 3,0 a 5,0, ou 3,5.

12. O método da reivindicação 10, em que o N,N-dihaloaminoácido mencionado ou derivado do mesmo é preparado in situ.

13. O método da reivindicação 10, em que o material a ser tratado é selecionado de entre alimentos, rações animais, instrumentos cirúrgicos, equipamento cirúrgico, dispositivos médicos e equipamento usado para tais propósitos.

14. A composição da reivindicação 8 possuindo uma concentração do N,N-dihaloaminoácido ou o seu derivado entre 0,1 e 100 ou 0,3 a 50 mM e um intervalo de pH entre 2 a 7, 3 a 4,8, 3,0 a 4,5, ou 3,5 a 4,5, ou a 3,5.

15. A composição da reivindicação 8 na forma estabilizada, a composição mencionada possuindo uma concentração do N,N-dihaloaminoácido ou o seu derivado entre 0,1 e 100 ou 0,1 a 50 mM e um intervalo de pH entre 2 a 7, 3 a 6, 3 a 4,8, 3 a 4,5, ou 3,5 a 4,5, ou a 3,5.

RESUMO

AMINOÁCIDOS N,N-DIHALOGENADOS E SEUS DERIVADOS

A presente invenção refere-se a compostos e composições ativos bactericidas, antibacterianos, anti-infecciosos, antimicrobianos, esporicidas, desinfetantes, antifúngicos e antivirais e a novos usos destas composições em terapia. Esta descrição também descreve métodos de uso para os novos compostos e composições. A descrição descreve adicionalmente métodos para preparar estes compostos.