



(11) PI 0909447-4 B1

República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria,
Comércio e Serviços

(22) Data do Depósito: 07/05/2009

(45) Data de Concessão: 11/02/2025

Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(54) Título: COMPOSIÇÃO PARA INIBIR O CRESCIMENTO DE MICRORGANISMOS GRAM-POSITIVOS E GRAM-NEGATIVOS E USO DE UMA COMPOSIÇÃO

(51) Int.Cl.: A61K 38/44; A61K 38/43; A61L 2/00.

(30) Prioridade Unionista: 09/05/2008 US 12/118586.

(73) Titular(es): EXOXEMIS, INC.

(72) Inventor(es): SOPHIE BECQUERELLE; WILLIAM HAAG; OBSIDIANA ABRIL-HORPEL; SHRI VALVANI.

(86) Pedido PCT: PCT US2009043172 de 07/05/2009

(87) Publicação PCT: WO 2009/137697 de 12/11/2009

(85) Data do Início da Fase Nacional: 27/09/2010

(57) Resumo: COMPOSIÇÃO, E, USO DE UMA COMPOSIÇÃO COMPREENDENDO MIELOPEROXIDASE E PELO MENOS DOIS AMINOÁCIDOS Métodos e composições são fornecidos para inibir o crescimento de microrganismos suscetíveis colocando os microrganismos, na presença de um peróxido e cloreto ou brometo, com mieloperoxidase e pelo menos dois aminoácidos do agente que melhora a atividade.

“COMPOSIÇÃO PARA INIBIR O CRESCIMENTO DE MICRORGANISMOS GRAM-POSITIVOS E GRAM-NEGATIVOS E USO DE UMA COMPOSIÇÃO”

FUNDAMENTOS

[0001] A presente invenção diz respeito a métodos e composições para a inibição ou tratamento de infecções microbianas. Mais particularmente, a presente invenção diz respeito a métodos e composições que usam uma combinação de aminoácidos e mieloperoxidase para melhorar propriedades microbicidas do sistema.

[0002] Conforme descrito nos pedidos de patente Nos. 5.888.505 e 6.294.168, mieloperoxidase pode ser usada para seletivamente se ligar a e, na presença de peróxido e haleto, inibir o crescimento de microrganismos alvo sem eliminar microrganismos desejáveis ou significativamente danificar outros componentes do meio, tais como células hospedeiras e flora normal, no ambiente do microrganismo alvo. Sabe-se previamente que mieloperoxidase apresenta atividade para matar microrganismo em sistemas naturais quando apresentadas com um cofator de haleto (X-) apropriado e peróxido de hidrogênio como substrato (Klebanoff, *J. Bacteriol.* 95:2131-2138, 1968). Entretanto, a natureza seletiva da ligação da mieloperoxidase e a utilidade destes sistemas para terapêutica, pesquisa e aplicações industriais foi reconhecida somente recentemente. Devido às propriedades de ligação seletiva recentemente descobertas da mieloperoxidase, quando um microrganismo alvo, tal como um microrganismo patogênico, tem uma capacidade de ligação a mieloperoxidase maior que a de um microrganismo desejado, tais como membros da flora normal, o microrganismo alvo seletivamente se liga à mieloperoxidase com pouca ou nenhuma ligação da mieloperoxidase pelo microrganismo desejado. Na presença de peróxido e haleto, a mieloperoxidase ligada alvo catalisa a oxidação de haleto e facilita a desproporcionalização do peróxido ao singleto de oxigênio molecular ($1O_2$) na superfície do microrganismo alvo, resultando na morte seletiva do microrganismo alvo com um mínimo de dano colateral ao microrganismo desejado ou meio fisiológico. Assim, conforme descrito nos pedidos de patente Nos. 5.888.505 e 6.294.168, mieloperoxidase pode ser empregada como um antisséptico no tratamento terapêutico ou profilático de indivíduos humanos ou animais para seletivamente se ligar e matar

microrganismos patogênicos com um mínimo de dano colateral às células hospedeiras e flora normal do hospedeiro.

[0003] O sistema também pode ser empregado como formulações desinfetantes ou esterilizantes para inibir o crescimento de microrganismos alvo *in vitro*, particularmente em aplicações onde dispositivos biomédicos, tais como bandagens, instrumentos cirúrgicos, dispositivos de sutura, catéteres, aplicações dentárias, lentes de contato, e similares são antissépticamente tratados para inibir o crescimento de microrganismos alvo sem danificar as células hospedeiras de um indivíduo quando o dispositivo biomédico é subsequentemente utilizado *in vivo*.

[0004] Conforme descrito nos pedidos de patente Nos. 5.389.369 e 5.451.402, embora tenha-se observado que o sistema antisséptico de mieloperoxidase descrito nas patentes U.S. Nos. 5.888.505 e 6.294.168 é altamente efetivo no tratamento de micróbios patogênicos, um agente que melhora a atividade antimicrobiana pode ser requerido para a morte eficaz de levedura e microrganismos que formam esporo. O estágio de esporo do ciclo de vida microbiano é caracterizado por dormência metabólica e resistência aos fatores ambientais que podem destruir o micróbio no seu estágio vegetativo. A fase mais inicial da germinação do esporo é caracterizada por intumescimento e uma transferência de dormência para metabolismo ativo. O crescimento vegetativo, por exemplo, germinação e, por último reprodução, se segue.

[0005] Germinação de endoesporos bacterianos e esporos de fungos é associada ao maior metabolismo e menor resistência ao calor e reagentes químicos. Para que a germinação ocorra, o esporo tem que sentir que o ambiente é adequado para suportar a vegetação e reprodução. O aminoácido l-alanina é reportado para estimular germinação de esporo bacteriano (Hills, *J. Gen. Microbiol.* 4:38, 1950; Halvorson e Church, *Bacteriol. Rev.* 21:112, 1957). l-Alanina e l-prolina também foram reportadas para iniciar germinação de esporo fúngico (Yanagita, *Arch. Mikrobiol.* 26:329, 1957).

[0006] α -Aminoácidos simples, tais como glicina e l-alanina, ocupam uma posição central no metabolismo. Transaminação ou desaminação de α -aminoácidos rende os carboidratos glicogênicos ou cetogênicos e o nitrogênio necessário para metabolismo e crescimento. Por exemplo, transaminação ou desaminação de l-alanina rende

piruvato, que é o produto final de metabolismo glicolítico (Embden-Meyerhof-Parnas Pathway). Oxidação de piruvato pelo complexo de piruvato desidrogenase rende acetil-CoA, NADH, H⁺, e CO₂. Acetil-CoA é o substrato iniciador para o ciclo do ácido tricarboxílico (ciclo de Krebs) que, por sua vez, alimenta a cadeia de transporte de elétron mitocondrial. Acetil-CoA também é a última fonte de carbono para síntese de ácido graxo, bem como para síntese de esteroide. α -aminoácidos simples podem fornecer o nitrogênio, CO₂, equivalentes glicogênicos e/ou cetogênicos requeridos para germinação e a atividade metabólica que se segue.

[0007] Desta forma, patentes U.S. Nos. 5.389.369 e 5.451.402 descrevem que a ação microbicida de mieloperoxidase contra levedura e formas esporulares de micróbios podem ser melhoradas tratando os microrganismos com mieloperoxidase em combinação com certos α -aminoácidos que fornecem um efeito estimulante no brotamento de levedura, germinação de micróbios esporulados, e possivelmente aceleração de metabolismo de micróbios vegetativos. α -aminoácidos representativos descritos para este propósito incluem glicina e o l- ou d-enantiômeros de alanina, valina, leucina, isoleucina, serina, treonina, lisina, fenilalanina, tirosina, e os alquil ésteres destes. Embora patentes U.S. Nos. 5.389.369 e 5.451.402 descrevam a melhora da atividade microbicida de mieloperoxidase contra levedura e formas esporulares de micróbios com α -aminoácidos, estas patentes não descrevem a melhora do sistema microbicida de mieloperoxidase contra bactérias não esporulares ou a melhora adicional de atividade antibacteriana pelo uso de mieloperoxidase e pelo menos dois aminoácidos, da forma aqui descrita.

SUMÁRIO

[0008] Este resumo é fornecido para introduzir uma seleção de conceitos em uma forma simplificada que são ainda descritos a seguir na descrição detalhada. Este resumo não é destinado para identificar características chave do problema em questão reivindicado, nem se destina a ser usado como um auxiliar na determinação do escopo do assunto em questão reivindicado.

[0009] A presente invenção é direcionada às composições e métodos para a morte ou inibição de infecções microbianas, tais como infecções bacterianas, colocando o

local de infecção em contato com uma composição compreendendo mieloperoxidase e pelo menos dois aminoácidos que funcionam em combinação para melhorar atividade microbicida da mieloperoxidase. Na prática da invenção, microrganismos suscetíveis são mortos ou inibidos colocando os microrganismos em contato com quantidades de mieloperoxidase e pelo menos dois aminoácidos que são efetivos na presença de um peróxido e brometo ou cloreto, para inibir o crescimento ou matar os microrganismos.

[0010] Assim, em uma modalidade, a invenção fornece composições para inibir o crescimento de microrganismos suscetíveis compreendendo mieloperoxidase e pelo menos dois aminoácidos que funcionam em combinação para melhorar a atividade microbicida da mieloperoxidase. Em algumas modalidades, pelo menos dois aminoácidos são selecionados do grupo que consiste em glicina, l-alanina, d-alanina, anidrido de L-alanina, l-glutamina, ácido l-glutâmico, anidrido de glicina, ácido hipúrico, l-histidina, l-leucina, d-leucina, l-isoleucina, d-isoleucina, l-lisina, l-ornitina, d-fenilalanina, l-fenilalanina, l-prolina, l-hidroxiprolina, l-serina, taurina, l-treonina, d-treonina, l-tirosina, l-valina, d-valina, beta aminoácidos, tais como beta alanina, l-beta-homoleucina, d-beta-homoleucina, ácido 3-aminobutanóico, ácido l-2,3-diaminopropiônico monoidrocloridrato, monoclórato de ácido d-2,3-diaminopropiônico, ácido l-3-aminoisobutírico, ácido d-3-aminoisobutírico, 3-aminobutirato de etila, cloridrato do éster sarcosina metílico e ácido nipecótico, ou um alquil éster ou sal farmaceuticamente aceitável do mesmo. Em outras modalidades, pelo menos dois aminoácidos são selecionados do grupo que consiste em glicina, l-alanina, d-alanina, l-alanina anidrido, l-glutamina, ácido l-glutâmico, anidrido de glicina, ácido hipúrico, l-histidina, l-leucina, d-leucina, l-isoleucina, d-isoleucina, l-lisina, l-ornitina, d-fenilalanina, l-fenilalanina, l-prolina, l-hidroxiprolina, l-serina, taurina, l-treonina, d-treonina, l-tirosina, l-valina, e d-valina, ou um alquil éster ou sal farmaceuticamente aceitável do mesmo.

[0011] Em outros aspectos, a invenção fornece composições para inibir o crescimento de microrganismos suscetíveis compreendendo mieloperoxidase e pelo menos três aminoácidos selecionados do grupo que consiste em glicina, l-alanina, d-

alanina, l-alanina anidrido, l-glutamina, ácido l-glutâmico, anidrido de glicina, ácido hipúrico, l-histidina, l-leucina, d-leucina, l-isoleucina, d-isoleucina, l-lisina, l-ornitina, d-fenilalanina, l-fenilalanina, l-prolina, l-hidroxiprolina, l-serina, taurina, l-treonina, d-treonina, l-tirosina, l-valina, d-valina, beta aminoácidos, tais como beta alanina, l-beta-homoleucina, d-beta-homoleucina, ácido 3-aminobutanóico, monoclórato do ácido l-2,3-diaminopropiônico monoclórato do ácido, d-2,3-diaminopropiônico, ácido l-3-aminoisobutírico, ácido d-3-aminoisobutírico, 3-aminobutirato de etila, cloridrato do éster sarcosina metílico e ácido nipecótico, ou um alquil éster ou sal farmacologicamente aceitável do mesmo. Em outros aspectos, pelo menos três aminoácidos são selecionados do grupo que consiste em glicina, l-alanina, d-alanina, l-alanina anidrido, l-glutamina, ácido l-glutâmico, anidrido de glicina, ácido hipúrico, l-histidina, l-leucina, d-leucina, l-isoleucina, d-isoleucina, l-lisina, l-ornitina, d-fenilalanina, l-fenilalanina, l-prolina, l-hidroxiprolina, l-serina, taurina, l-treonina, d-treonina, l-tirosina, l-valina, e d-valina, ou um alquil éster ou sal farmacologicamente aceitável do mesmo.

[0012] Em algumas modalidades, as composições da invenção ainda compreendem peróxido de hidrogênio ou uma fonte de peróxido de hidrogênio. Neste aspecto da invenção, as composições podem compreender um peróxido produzindo oxidase que produz peróxido de hidrogênio na presença de um substrato para a oxidase. Em algumas modalidades, as composições compreendem um peróxido que produz oxidase eficaz para gerar de 100 pmol a 50 µmol peróxido por mL por minuto quando na presença de um substrato para a oxidase.

[0013] Em uma modalidade, as composições da invenção compreendem de 1 a 50,000 µg/mL de mieloperoxidase. Em outras modalidades, as composições da invenção compreendem 0,1 a cerca de 500 mM de cada de pelo menos dois aminoácidos. Em uma modalidade representativa, as composições da invenção compreendem de 10 a 5.000 µg/mL de mieloperoxidase, de 0,3 a 50 mM de glicina, de 0,3 a 50 mM de l-alanina, de 0,3 a 50 mM de l-prolina, e de 1 a 500 U/mL de glicose oxidase.

[0014] Em outros aspectos, a invenção fornece métodos de tratar um indivíduo

humano ou animal em necessidade de tal tratamento compreendendo administrar a um local de infecção no indivíduo uma composição compreendendo mieloperoxidase e pelo menos dois aminoácidos que funcionam em combinação, na presença de peróxido de hidrogênio e cloreto ou brometo, para melhorar a atividade microbicida da mieloperoxidase. Em algumas modalidades deste aspecto da invenção, pelo menos dois aminoácidos são selecionados do grupo que consiste em glicina, l-alanina, d-alanina, l-alanina anidrido, l-glutamina, ácido l-glutâmico, anidrido de glicina, ácido hipúrico, l-histidina, l-leucina, d-leucina, l-isoleucina, d-isoleucina, l-lisina, l-ornitina, d-fenilalanina, l-fenilalanina, l-prolina, l-hidroxiprolina, l-serina, taurina, l-treonina, d-treonina, l-tirosina, l-valina, d-valina, beta aminoácidos, tais como beta alanina, l-beta-homoleucina, d-beta-homoleucina, ácido 3-aminobutanóico, monoclórato do ácido l-2,3-diaminopropiônico, monoclórato do ácido d-2,3-diaminopropiônico ácido, l-3-amino-isobutírico, ácido d-3-aminoisobutírico, 3-aminobutirato de etila, cloridrato do éster sarcosina metílico e ácido nipecótico, ou um alquil éster ou sal farmaceuticamente aceitável do mesmo. Em outras modalidades deste aspecto da invenção, pelo menos dois aminoácidos são selecionados do grupo que consiste em glicina, l-alanina, d-alanina, anidrido de L-alanina, l-glutamina, ácido l-glutâmico, anidrido de glicina, ácido hipúrico, l-histidina, l-leucina, d-leucina, l-isoleucina, d-isoleucina, l-lisina, l-ornitina, d-fenilalanina, l-fenilalanina, l-prolina, l-hidroxiprolina, l-serina, taurina, l-treonina, d-treonina, l-tirosina, l-valina, e d-valina, ou um alquil éster ou sal farmaceuticamente aceitável do mesmo.

[0015] Em outras modalidades, a invenção fornece métodos de tratar um indivíduo humano ou animal em necessidade de tal tratamento compreendendo administrar a um local de infecção no indivíduo uma composição compreendendo mieloperoxidase e pelo menos três aminoácidos que funcionam em combinação, na presença de peróxido de hidrogênio e cloreto ou brometo, para melhorar a atividade microbicida da mieloperoxidase. Em algumas modalidades, pelo menos três aminoácidos são selecionados do grupo que consiste em glicina, l-alanina, d-alanina, anidrido de L-alanina, l-glutamina, ácido l-glutâmico, anidrido de glicina, ácido hipúrico, l-histidina, l-leucina, d-leucina, l-isoleucina, d-isoleucina, l-lisina, l-ornitina, d-fenilalanina, l-

fenilalanina, l-prolina, l-hidroxiprolina, l-serina, taurina, l-treonina, d-treonina, l-tirosina, l-valina, d-valina, beta aminoácidos, tais como beta alanina, l-beta-homoleucina, d-beta-homoleucina, ácido 3-aminobutanóico, monoclóridrato do ácido l-2,3-diaminopropiônico, monoclóridrato do ácido d-2,3-diaminopropiônico, l ácido -3-aminoisobutírico, ácido d-3-aminoisobutírico, 3-aminobutirato de etila, cloridrato do éster sarcosina metílico e ácido nipecótico, ou um alquil éster ou sal farmaceuticamente aceitável do mesmo. Em outras modalidades, pelo menos três aminoácidos são selecionados do grupo que consiste em glicina, l-alanina, d-alanina, anidrido de L-alanina, l-glutamina, ácido l-glutâmico, anidrido de glicina, ácido hipúrico, l-histidina, l-leucina, d-leucina, l-isoleucina, d-isoleucina, l-lisina, l-ornitina, d-fenilalanina, l-fenilalanina, l-prolina, l-hidroxiprolina, l-serina, taurina, l-treonina, d-treonina, l-tirosina, l-valina, e d-valina, ou um alquil éster ou sal farmaceuticamente aceitável do mesmo.

[0016] Em outras modalidades, a composição administrada ao indivíduo humano ou animal pode adicionalmente compreender peróxido de hidrogênio ou uma fonte de peróxido de hidrogênio. Em algumas modalidades, a fonte de peróxido de hidrogênio compreende um oxidase produzindo peróxido que produz peróxido de hidrogênio na presença de um substrato para a oxidase. Por exemplo, a composição administrada ao indivíduo humano ou animal pode adicionalmente compreender um oxidase produzindo peróxido eficaz para gerar de 100 pmol a 50 µmol peróxido por mL por minuto quando na presença de um substrato para a oxidase.

[0017] Em algumas modalidades, a composição administrada ao indivíduo humano ou animal pode compreender de 1 a 50,000 µg/mL de mieloperoxidase. Em outras modalidades, a composição administrada ao indivíduo humano ou animal pode compreender de 0,1 a cerca de 500 mM de cada de pelo menos dois aminoácidos. Em uma modalidade representativa, a composição administrada ao indivíduo humano ou animal pode compreender de 10 a 5,000 µg/mL de mieloperoxidase, de 0,3 a 50 mM de glicina, de 0,3 a 50 mM de l-alanina, de 0,3 a 50 mM de l-prolina, de 1 a 500 U/mL de glicose oxidase e de 1 a 500 mM glicose.

[0018] Em alguns aspectos da invenção, o indivíduo humano ou animal a ser

tratado sofre de uma infecção microbiana das gengivas, olhos, ouvidos, pele, tecido mole, feridas, áreas vaginais, áreas da virilha, escaras, ou áreas de queimadura. Em algumas modalidades, a infecção é uma infecção polimicrobiana. Em outras modalidades, a infecção é causada, pelo menos em parte, por um microrganismo resistente a múltiplos medicamentos.

[0019] Em outros aspectos, a invenção fornece métodos para matar ou inibir o crescimento de microrganismos suscetíveis compreendendo colocar os microrganismos, na presença de peróxido de hidrogênio e cloreto ou brometo, em contato com uma composição compreendendo mieloperoxidase e pelo menos dois aminoácidos que funcionam em combinação para melhorar a atividade microbicida da mieloperoxidase.

DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[0020] Os aspectos anteriores e muitas das vantagens desta invenção ficarão mais prontamente apreciados à medida em que os mesmos se tornarem mais bem entendidos pela referência à seguinte descrição detalhada, quando tomados em conjunto com os desenhos que acompanham, em que:

[0021] FIGURA 1 é uma análise tempo-morte de *S. aureus* ATCC 6538 (FIGURA 1A) e *E. coli* ATCC 25922 (FIGURA 1B) tratados com uma solução MPO melhorada contendo 9 (□), 6 (◇), 3 (△), 1 (○), 0,3 (*), e 0,1 (+) µg MPO/mL, da forma descrita no exemplo 11. Atividade bactericida rápida (>3 Log da redução do inóculo inicial) foi demonstrada usando o método de neutralização de suspensão. A taxa de morte foi maior em concentrações de MPO superiores da solução de MPO melhorada e a extensão da morte aumentada com maior tempo de exposição. Em concentrações de 3 µg MPO/mL e acima, nenhum sobrevivente detectável foi observado em 5 minutos de exposição;

[0022] FIGURA 2 é uma análise tempo-morte de *S. aureus* ATCC 6538 (FIGURA 2A) e *P. aeruginosa* ATCC 27317 (FIGURA 2B) tratados com a solução de MPO melhorada contendo 200 (□), 100 (◇), e 50 (△) µg MPO/mL, da forma descrita no exemplo 11. Isolados foram testados na presença de 3 % de sangue humano total pelo método de neutralização de suspensão. O efeito da interferência do sangue na

atividade antimicrobiana da solução de MPO melhorada foi superado em concentrações de MPO superiores;

[0023] FIGURA 3 é uma análise tempo-morte de *S. aureus* ATCC 29213 (FIGURA 3A), *E. coli* ATCC 25922 (FIGURA 3B), *E. faecalis* ATCC 29212 (FIGURA 3C), e *P. aeruginosa* ATCC 27853 (FIGURA 3D) tratados com a solução de MPO melhorada contendo 256 (□), 64 (◇), 16 (△), 4 (×), 1 (*), 0,025 (○), e 0,06 (+) µg MPO/mL, da forma descrita no exemplo 11. Atividade bactericida (>3 Log da redução do inóculo inicial) foi demonstrada usando um método de microdiluição de caldo CLSI modificado. Padrões comparáveis de morte foram observados com todos os organismos com a taxa de morte maior em concentrações de MPO superiores da solução de MPO melhorada e a extensão de morte maior com maior tempo de exposição. Em concentrações de 256 e 16 µg MPO/mL, nenhum sobrevivente detectável foi observado para todos os organismos testados em 30 minutos e 4 hora, respectivamente;

[0024] FIGURA 4 é uma análise tempo-morte de *S. aureus* ATCC 6538 no modelo de ferida de espessura total em ratos tratados com a solução de MPO melhorada contendo 18,75 (◆), 75 GU/mL (■), e 150 (●) GU/mL, da forma descrita no exemplo 12. Recuperação de organismo de feridas não tratadas em 60 minutos (○). Este gráfico apresenta os sobreviventes de log₁₀ CFU médios isolados de cada grupo de tratamento em tempos de tratamento de 5-, 15-, 30-, e 60-minutos. O intervalo de confiança de 95 % de cada ponto de dados é mostrado para cada grupo de tratamento;

[0025] FIGURA 5 é uma comparação de atividade microbicida de uma solução MPO melhorada contra Methicillin Resistant *S. aureus* (MRSA) e *Methicillin Sensitive S. aureus* (MSSA) no modelo de ferida de espessura parcial em ratos, da forma descrita no exemplo 12. Este gráfico apresenta os sobreviventes de log₁₀ CFU médios isolados 15 minutos depois do tratamento; e

[0026] FIGURA 6 é uma análise tempo-morte de *E. coli* ATCC 25922 no modelo de ferida de espessura total em ratos tratados com uma solução MPO melhorada contendo 18,75 (◆), 75 GU/mL (■), e 150 (●) GU/mL, da forma descrita no exemplo 12. Recuperação de organismo de feridas não tratadas em 60 minutos (○). Este

gráfico apresenta os sobreviventes de log10 CFU médios isolados de cada grupo de tratamento em tempos de tratamento de 5-, 15-, 30-, e 60-minutos. O intervalo de confiança de 95 % de cada ponto de dados é mostrada para cada grupo de tratamento.

DESCRIÇÃO DETALHADA

[0027] A presente invenção é amplamente direcionada a composições e métodos para a morte ou inibição de infecções bacterianas usando mieloperoxidase e pelo menos dois aminoácidos que funcionam em combinação para melhorar a atividade microbicida de mieloperoxidase. Na prática da invenção, microrganismos suscetíveis são mortos ou inibidos colocando os microrganismos em contato com quantidades de mieloperoxidase e pelo menos dois aminoácidos, que são efetivos na presença de um peróxido e brometo ou cloreto, para inibir o crescimento de ou matar os microrganismos.

[0028] Em uma modalidade particularmente preferida, as composições e métodos da invenção são usadas como agentes antissépticos que apresentam melhor atividade antimicrobiana de mieloperoxidase contra uma ampla faixa de microrganismo patogênicos incluindo bactérias e fungos. Em um aspecto, as composições e métodos da invenção são altamente adequadas para o tratamento tópico de infecções suscetíveis em um indivíduo mamífero humano ou não humano em locais que permitem o contato direto das composições da invenção com a infecção microbiana, tais como, por exemplo, infecções da pele, olhos, ouvidos, boca, passagens nasais e dos sinus, locais de lesão traumática, locais cirúrgicos, e similares. Para uso em contato com tecido hospedeiro, os sistemas antissépticos são baseados no uso de dioxigenação de mieloperoxidase que apresenta afinidade seletiva para microrganismo patogênicos. Como tal, microbicida de ação de alta potência pode ser direcionado para os microrganismos alvo sem destruição ou rompimento do tecido hospedeiro associado da flora normal, isto é, a ação antisséptica é seletiva e confinada ao microrganismo alvo.

[0029] Assim, em uma modalidade, a invenção fornece composições para inibir o crescimento de microrganismos suscetíveis compreendendo mieloperoxidase e pelo menos dois aminoácidos que funcionam em combinação, na presença de peróxido e

cloreto ou brometo, para melhorar a atividade microbica da mieloperoxidase. As composições podem adicionalmente compreender peróxido de hidrogênio ou uma fonte de peróxido de hidrogênio e cloreto ou brometo quando não de outra maneira disponível em quantidades suficientes no local de uso das composições. Em uma modalidade relacionada, a invenção fornece métodos de tratar um indivíduo humano ou animal em necessidade de tal tratamento compreendendo administrar a um local de infecção no indivíduo uma composição compreendendo mieloperoxidase e pelo menos dois aminoácidos que funcionam em combinação para melhorar a atividade microbica da mieloperoxidase. Novamente, a composição pode adicionalmente compreender peróxido de hidrogênio ou uma fonte de peróxido de hidrogênio, e cloreto ou brometo, para suplementar quantidades que ocorrem naturalmente no local da infecção.

[0030] Em outras modalidades, a invenção fornece composições e métodos para inibir o crescimento de microrganismos suscetíveis *in vitro*, particularmente em aplicações onde dispositivos biomédicos, tais como bandagens, instrumentos cirúrgicos, dispositivos de sutura, catéteres, aplicações dentárias, lentes de contato, e similares requerem desinfecção ou esterilização e onde o dispositivo é para ser subsequentemente colocado em contato com o tecido hospedeiro. Assim, formulações de mieloperoxidase de alta potência da invenção podem servir como preparações de desinfecção ou esterilização *in vitro*. Limitando o período de tempo de disponibilidade de peróxido de hidrogênio, formulações melhoradas de mieloperoxidase podem ser preparadas suficientemente potentes para garantir desinfecção e mesmo esterilização de um material ou dispositivo antes de entrar em contato com o tecido hospedeiro. Qualquer toxicidade potencial para a flora normal e tecido hospedeiro associado ao uso destas formulações de alta potência cessa quando peróxido é exaurido e, como tal, o material ou dispositivo tratado com a formulação pode ser colocado em contato com tecido hospedeiro sem lavagem ou detoxificação adicional.

[0031] Assim, em uma modalidade, a invenção fornece métodos para matar ou inibir o crescimento de microrganismos suscetíveis *in vitro* compreendendo colocar os

microrganismos, na presença de peróxido de hidrogênio e cloreto ou brometo, em contato com uma composição compreendendo mieloperoxidase e pelo menos dois aminoácidos que funcionam em combinação para melhorar a atividade microbicida da mieloperoxidase.

[0032] Ainda em outros aspectos, a invenção fornece o uso de uma composição compreendendo mieloperoxidase e pelo menos dois aminoácidos na fabricação de um medicamento para o tratamento de uma infecção em um indivíduo humano ou animal, em que os aminoácidos funcionam em combinação, na presença de peróxido de hidrogênio e cloreto ou brometo, para melhorar a atividade microbicida da mieloperoxidase. Em algumas modalidades, a invenção fornece for o use de uma composição compreendendo mieloperoxidase e pelo menos dois aminoácidos na fabricação de um medicamento para matar ou inibir o crescimento de microrganismos suscetíveis, em que os aminoácidos funcionam em combinação para melhorar a atividade microbicida da mieloperoxidase.

[0033] Composições representativas da invenção compreendem (1) mieloperoxidase (MPO); (2) pelo menos dois aminoácidos que melhoram a atividade; e, opcionalmente, (3) peróxido de hidrogênio (H_2O_2) ou uma fonte de H_2O_2 ; e (4) cloreto ou brometo.

[0034] Mieloperoxidase usada na presente invenção é um haleto:peróxido de hidrogênio oxidoreductase (por exemplo, EC No. 1.11.1.7 e EC No. 1.11.1.10 na International Union of Biochemistry) para o qual haleto, isto é, cloreto ou brometo, é o doador ou redutor de elétron e peróxido é o receptor de elétron ou oxidante. A atividade enzimática de uma solução de mieloperoxidase pode ser determinada pela reação com guaiacol na presença de peróxido de hidrogênio em tampão de fosfato de sódio. A reação gera um produto com forte absorbância em 470 nm. A atividade é determinada a partir das cinéticas do aumento na absorbância comparadas com um padrão de referência. A atividade da mieloperoxidase é comumente expressa em unidades Guaiacol/mL (GU/mL), e também é expressa como microgramas de MPO por mililitro ($\mu g/mL$). A conversão de μg a GU de MPO é baseada em 0,375 GU por μg de MPO. A atividade específica é calculada a partir de sua atividade e a

concentração de proteína total é expressa em GU/mg de proteína. Quantidades de mieloperoxidase usadas empregadas nas composições da invenção variarão amplamente dependendo das condições nas quais as composições são empregadas, do ambiente de uso e do resultado desejado. Para a maioria dos propósitos, as composições da invenção geralmente compreenderão pelo menos cerca de 0,05 µg/mL (0,01875 GU/mL) de mieloperoxidase. Em algumas modalidades, as composições da invenção compreenderão de cerca de 1 a cerca de 50.000 µg/mL de mieloperoxidase (isto é, de cerca de 0,375 a cerca de 18.750 GU/mL), mais preferivelmente de cerca de 5 a cerca de 10.000 µg/mL de mieloperoxidase (isto é, de cerca de 1,875 a cerca de 3,750 GU/mL), e ainda mais preferivelmente de cerca de 10 a cerca de 5.000 µg/mL de mieloperoxidase (isto é, de cerca de 3,75 a cerca de 1.875 GU/mL).

[0035] A inclusão de pelo menos dois aminoácidos que melhoram a atividade, da forma descrita em detalhe aqui, aumenta enormemente a capacidade microbida do sistema oxidase-mieloperoxidase contra microrganismos suscetíveis. Aminoácidos usados na prática da invenção são os aminoácidos que, quando usados em combinação e na presença de peróxido e cloreto ou brometo, melhoram a atividade antimicrobiana do sistema antimicrobiano da mieloperoxidase contra microrganismos suscetíveis. Pelo menos dois aminoácidos são usados em concentrações que não produzem efeitos adversos na atividade do sistema de mieloperoxidase ou efeitos indesejáveis no ambiente de uso das composições e métodos.

[0036] Em algumas modalidades, as composições da invenção compreendem pelo menos dois aminoácidos selecionados do grupo que consiste em glicina, l-alanina, d-alanina, anidrido de L-alanina, l-glutamina, ácido l-glutâmico, anidrido de glicina, ácido hipúrico, l-histidina, l-leucina, d-leucina, l-isoleucina, d-isoleucina, l-lisina, l-ornitina, d-fenilalanina, l-fenilalanina, l-prolina, l-hidroxiprolina, l-serina, taurina, l-treonina, d-treonina, l-tirosina, l-valina, d-valina, beta aminoácidos, tais como beta alanina, l-beta-homoleucina, d-beta-homoleucina, ácido 3-aminobutanóico, monoclórato do ácido l-2,3-diaminopropiônico, monoclórato do ácido d-2,3-diaminopropiônico, ácido l-3-aminoisobutírico, ácido d-3-aminoisobutírico, e 3-

aminobutirato de etila, bem como os alquil ésteres e sais farmaceuticamente aceitáveis destes, tais como, por exemplo, éster metílico de L-alanina, éster metílico de D-alanina, dicloridrato de éster metílico de L-lisina, cloridrato de éster metílico de glicina, cloridrato de éster metílico de L-prolina, cloridrato do éster etílico de L-valina e 2-aminopropanoato de etila, e aminoácidos N-substituídos, tais como cloridrato do éster sarcosina metílico e ácido nipecótico.

[0037] Em outras modalidades, as composições da invenção compreendem pelo menos dois aminoácidos selecionados do grupo que consiste em glicina, L-alanina, D-alanina, anidrido de L-alanina, L-glutamina, ácido L-glutâmico, anidrido de glicina, ácido hipúrico, L-histidina, L-leucina, D-leucina, L-isoleucina, D-isoleucina, L-lisina, L-ornitina, D-fenilalanina, L-fenilalanina, L-prolina, L-hidroxiprolina, L-serina, taurina, L-treonina, D-treonina, L-tirosina, L-valina, e D-valina, bem como alquil ésteres e sais farmaceuticamente aceitáveis destes.

[0038] Em algumas modalidades, as composições da invenção compreendem mieloperoxidase e pelo menos três aminoácidos que funcionam em combinação para melhorar atividade microbicida da mieloperoxidase. Desta forma, em algumas modalidades, as composições da invenção compreendem pelo menos três aminoácidos selecionados do grupo que consiste em glicina, L-alanina, D-alanina, anidrido de L-alanina, L-glutamina, ácido L-glutâmico, anidrido de glicina, ácido hipúrico, L-histidina, L-leucina, D-leucina, L-isoleucina, D-isoleucina, L-lisina, L-ornitina, D-fenilalanina, L-fenilalanina, L-prolina, L-hidroxiprolina, L-serina, taurina, L-treonina, D-treonina, L-tirosina, L-valina, D-valina, beta aminoácidos, tais como beta alanina, L-beta-homoleucina, D-beta-homoleucina, ácido 3-aminobutanóico, monoclóridrato do ácido L-2,3-diaminopropiônico, monoclóridrato do ácido D-2,3-diaminopropiônico, ácido L-3-amino-isobutírico, ácido D-3-aminoisobutírico, e 3-aminobutirato de etila, bem como ésteres e sais farmaceuticamente aceitáveis destes, tais como, por exemplo, éster metílico de L-alanina, éster metílico de D-alanina, dicloridrato de éster metílico de L-lisina, cloridrato de éster metílico de glicina, cloridrato de éster metílico de L-prolina, cloridrato do éster etílico de L-valina, e 2-aminopropanoato de etila, e aminoácidos N-substituídos, tais como cloridrato do éster sarcosina metílico e ácido nipecótico.

[0039] Ainda em outras modalidades, as composições da invenção compreendem pelo menos três aminoácidos selecionados do grupo que consiste em glicina, l-alanina, d-alanina, anidrido de L-alanina, l-glutamina, ácido l-glutâmico, anidrido de glicina, ácido hipúrico, l-histidina, l-leucina, d-leucina, l-isoleucina, d-isoleucina, l-lisina, l-ornitina, d-fenilalanina, l-fenilalanina, l-prolina, l-hidroxiprolina, l-serina, taurina, l-treonina, d-treonina, l-tirosina, l-valina, e d-valina, bem como ésteres e sais farmaceuticamente aceitáveis destes. Em um exemplo representativo atualmente preferido deste aspecto da invenção, as composições da invenção compreendem mieloperoxidase e os aminoácidos glicina, l-alanina e l-prolina, em quantidades eficazes para melhorar a atividade antimicrobiana de mieloperoxidase.

[0040] Quantidades usadas dos aminoácidos empregados nas composições da invenção variarão dependendo da quantidade de mieloperoxidase nas composições e condições presentes no ambiente de uso. Para a maioria dos propósitos, as composições da invenção geralmente compreenderão de cerca de 0,1 a cerca de 500 mM, mais preferivelmente de cerca de 0,2 a cerca de 100 mM, e ainda mais preferivelmente de cerca de 0,3 a cerca de 50 mM de cada dos aminoácidos da invenção. Em uma modalidade representativa, por exemplo, as composições da invenção compreendem de 10 a 5,000 µg/mL de mieloperoxidase, de 0,3 a 50 mM de glicina, de 0,3 a 50 mM de l-alanina, de 0,3 a 50 mM de l-prolina, e de 1 a 500 U/mL de glicose oxidase.

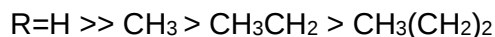
[0041] Uma vez que a atividade antisséptica das composições de mieloperoxidase da invenção envolve a reação de peróxido e cloreto ou brometo para formar hipoaleto e a reação de peróxido e hipoaleto para formar singleto de oxigênio molecular, a atividade das composições da invenção depende da presença, do local de atividade antimicrobiana, de um peróxido e haleto adequado. Em algumas situações, peróxido (por exemplo, peróxido de hidrogênio) pode estar presente no local de atividade antimicrobiana devido, por exemplo, à atividade da flora que ocorre naturalmente, e quantidades suficientes de cloreto podem estar presentes no ambiente fisiológico para agir como um cofator na reação de conversão. Nestas situações, nenhum peróxido ou haleto adicionais precisam ser administrados ou incluídos nas composições da

invenção. Em outras situações, pode ser necessário ou desejável adicionalmente fornecer peróxido de hidrogênio e/ou haleto no local de tratamento microbiano. Desta forma, as composições da invenção adicionalmente podem compreender, se desejado, um peróxido ou agente capaz de produzir peróxido *in vivo* ou *in vitro* e cloreto ou brometo.

[0042] Peróxidos usados nas composições e métodos da invenção incluem peróxido de hidrogênio, alquil hidroperóxidos da fórmula:



[0043] em que R é hidrogênio ou um grupo alquila de cadeia curta tendo de 1 a 3 átomos de carbono, e peróxidos inorgânicos, tais como boroperóxido ou ureaperóxido. A atividade oxidante dos peróxidos orgânicos geralmente diminui com o aumento do comprimento da cadeia R, como se segue:



[0044] O peróxido atualmente preferido para uso nas composições da invenção é peróxido de hidrogênio. Peróxido de hidrogênio também pode ser disponível no local da atividade antimicrobiana incluindo na composição um agente capaz de que produz peróxido de hidrogênio *in vivo* ou *in vitro*. Agentes particularmente usados para este propósito incluem, por exemplo, oxidases, tais como glicose oxidase, colesterol oxidase e galactose oxidase.

[0045] Quando peróxidos de hidrogênio estão diretamente incluídos nas composições da invenção para aplicações *in vivo*, as quantidades empregadas são preferivelmente designadas para fornecer atividade desinfetante máxima. O dano às células hospedeiras e tecido e à flora normal é evitado evitando o contato direto durante o período de alta exposição ao H₂O₂. Desta forma, as composições da invenção podem compreender de cerca de 1 nmol a cerca de 10 μmol de peróxido de hidrogênio por mL de composição, mais preferivelmente de cerca de 5 nmol a cerca de 5 μmol de peróxido de hidrogênio por mL de composição, e acima de tudo preferivelmente de cerca de 10 nmol a cerca de 1 μmol de peróxido de hidrogênio por mL de composição. Agentes capazes de produzir peróxido de hidrogênio *in vivo*, por exemplo, peróxido produzindo oxidase, são particularmente usados para o controle

dinâmico das quantidades de peróxido de hidrogênio presentes no local de atividade antimicrobiana. Tais agentes maximizam a atividade antimicrobiana da composição fornecendo e mantendo uma concentração estável, de baixo nível de H_2O_2 . Desta forma, a quantidade de tais agentes a ser empregada será altamente dependente da natureza do agente e do efeito desejado, mas preferivelmente será capaz de produzir um nível estável de cerca de 1 pmol a cerca de 1 μ mol de peróxido de hidrogênio por mL de líquido por minuto, dependendo do tipo e concentração de haleto disponível no local de atividade antimicrobiana. Quando a formulação é para ser usada como uma solução desinfetante-esterilizante, a oxidase e seu substrato podem ser ajustados para fornecer concentrações de H_2O_2 de estado estável relativamente alto que duram o período de esterilização requerido. A ação de desinfecção-esterilização é terminada com a exaustão do substrato de oxidase ou com relação à taxa de degradação da oxidase. Como um exemplo representativo, quando a oxidase é glicose oxidase e seu substrato é glicose (ou dextrose), as composições da invenção podem compreender de cerca de 0,05 a cerca de 3.000 U/mL, mais preferivelmente de cerca de 0,1 a cerca de 1.000 U/mL, e ainda mais preferivelmente de cerca de 1 a cerca de 500 U/mL de glicose oxidase, e de cerca de 0,1 a cerca de 1.000 mM, mais preferivelmente de cerca de 0,5 a cerca de 800 mM, e ainda mais preferivelmente de cerca de 1 a cerca de 500 mM glicose.

[0046] Quando brometo ou cloreto são incluídos nas composições da invenção, o uso, seleção e quantidade de brometo ou cloreto empregados em uma aplicação particular dependerão de vários fatores, tais como o efeito terapêutico desejado, a disponibilidade de peróxido e outros fatores. Uma vez que cloreto está presente na maioria dos meios fisiológicos em níveis suficientes para ser não limitantes como o cofator de haleto, uma fonte externa de cloreto geralmente não é requerida. Quando uma fonte externa de cloreto é desejada, a quantidade de cloreto empregada preferivelmente cairá na faixa de cerca de 10 μ mol de cloreto a cerca de 150 μ mol de cloreto por mL de solução para condições fisiológicas aproximadas. Quando incluídas, as composições da invenção podem compreender de cerca de 1 nmol de brometo a cerca de 20 μ mol de brometo por mL de composição líquida, mais preferivelmente de

cerca de 10 nmol de brometo a cerca de 10 μ mol de brometo por mL de composição líquida, e acima de tudo preferivelmente de cerca de 100 nmol de brometo a cerca de 1 μ mol de brometo por mL de composição líquida.

[0047] A razão de haleto para peróxido é uma importante consideração na formulação de um ambiente microbicida efetivo. Desta forma, além de garantir níveis efetivos de haleto e peróxido nos locais de ataque microbiano, da forma descrita anteriormente, é preferível praticar os métodos da invenção em razões de haleto:peróxido que fornecem atividade microbicida ideal. Por exemplo, quando o haleto é Cl⁻, a razão de Cl⁻ para peróxido é preferivelmente mantida na faixa de cerca de 1 a cerca de 40.000 no ambiente de atividade microbicida, mais preferivelmente de cerca de 50 a cerca de 40.000 e, acima de tudo preferivelmente, de cerca de 200 a cerca de 40.000. Quando o haleto é Br⁻, a razão de Br⁻ para peróxido é preferivelmente mantida na faixa de cerca de 0,1 a cerca de 4.000 no ambiente de atividade microbicida, mais preferivelmente, de cerca de 0,5 a cerca de 2.000 e acima de tudo preferivelmente de cerca de 1 a cerca de 1.000.

[0048] As composições e métodos da invenção podem ser usados para inibir o crescimento de um amplo espectro de microrganismos patológicos, preferivelmente com um mínimo de dano à flora normal. Conforme demonstrado nos exemplos, composições da invenção são altamente eficientes na inibição tanto de organismos Gram-positivos quanto Gram-negativos, tais como, por exemplo, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus agalactiae*, Grupo C de *Streptococcus*, Grupo F de *Streptococcus*, Grupo G de *Streptococcus*, *Streptococcus pyogenes*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Acinetobacter* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Aeromonas hydrophila*, e *Pasteurella multocida*. Além do mais, as composições da invenção são usadas na inibição de microrganismos que formam esporos tais como, por exemplo, bactérias, tais como *Bacillus* spp. e *Clostridium* spp. e fungos, tais como *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Trichophyton* spp., e similares. Devido ao seu amplo espectro de atividade, em algumas modalidades as composições da invenção podem ser vantajosamente

usadas no tratamento de infecções polimicrobianas. Doenças polimicrobianas envolvem múltiplos agentes infecciosos e são referidas como complexas, complicadas, mistas, duplas, secundárias, sinérgicas, concorrentes, polimicrobianas ou co-infecções. Doenças polimicrobianas incluem, por exemplo, infecções associadas a abscessos, infecções oportunistas relacionadas à AIDS, conjuntivite, gastroenterite, hepatite, esclerose múltipla, otite média, doenças periodontais, doenças respiratórias e infecções genitais. Além do mais, uma vez que as composições da invenção operam por um mecanismo de ação completamente diferente que as envolvidas na terapia de antibiótico convencional, em algumas modalidades as composições da invenção também são altamente usadas no tratamento de infecções causadas, pelo menos em parte, por patógenos resistentes a múltiplos medicamentos, tais como MRSA (*Staphylococcus aureus* resistente à meticilina), VRSA (*S. aureus* resistente à vancomicina), VRE (*Enterococcus* resistente à vancomicina), *Enterococcus* resistente à Penicilina, PRSP (*Streptococcus pneumoniae* resistente à penicilina), *Mycobacterium tuberculosis* resistente à isoniazid/rifampina, e outras cepas resistentes a antibióticos de *E. coli*, *Salmonella*, *Campylobacter*, e *Streptococci*. Tais bactérias são aqui referidas como “resistente a antibiótico” ou “resistente a medicamento” ou “resistente a múltiplos medicamentos,” ou por outros termos similares que são bem entendidos na tecnologia.

[0049] Da forma aqui usada, o termo “flora normal” significa bactérias que normalmente residem nas superfícies do corpo ou dentro delas de um hospedeiro saudável em níveis simbióticos. Flora normal inclui, por exemplo, a família de bactérias de ácido láctico na boca, intestino, ou vagina de indivíduos humanos, por exemplo, *Streptococcus* (viridans) na boca, e *Lactobacillus* sp. (por exemplo, bacilo de Tissier e bacilo de Doderlein) nos intestinos de crianças que se alimentam de leite, genitália externa, uretra anterior e vagina. Microrganismos que constituem a flora normal de um hospedeiro são bem conhecidos (por exemplo, ver *Principles and Practice of Infectious Diseases*, supra, New York, pp. 34-36 e 161). Observou-se que a mieloperoxidase da invenção seletivamente se liga a quaisquer bactérias e fungos patogênicos, de preferência na flora normal. Em aplicações *in vivo*, o hospedeiro é

preferivelmente tratado com uma quantidade de mieloperoxidase que é ineficaz para eliminar a flora normal do hospedeiro. Em aplicações *in vitro* para desinfecção-esterilização, concentrações suficientemente altas de mieloperoxidase podem ser empregadas para garantir a morte de todas as formas vegetativas e de levedura. Em tais condições, o dano ao tecido hospedeiro e flora normal é evitado pelo consumo de H₂O₂ ou do sistema que gera H₂O₂ antes do contato com o tecido hospedeiro.

[0050] As composições da invenção geralmente compreendem quantidades de uma mieloperoxidase e pelo menos dois aminoácidos que são eficazes, na presença de um peróxido e um haleto para matar ou inibir o crescimento de microrganismos suscetíveis. As composições podem adicionalmente compreender um carreador farmacologicamente aceitável. Em algumas modalidades, as composições podem ser convenientemente fornecidas em um carreador líquido. Qualquer carreador líquido pode ser geralmente usado para este propósito, desde que o carreador não significativamente interfira com as capacidades de ligação seletivas da mieloperoxidase ou com a atividade da enzima. Alternativamente, as composições podem ser fornecidas na forma sólida com ativação em solubilização em líquido.

[0051] Conforme apresentado anteriormente, as composições da invenção adicionalmente podem compreender peróxido ou um agente capaz de produzir peróxido, tais como uma oxidase, da forma descrita em detalhe anteriormente. O sistema oxidase-mieloperoxidase presta-se à construção como uma formulação binária em que os agentes ativos de composição são formulados em duas partes separadas para consolidação no tempo de uso. Por exemplo, uma parte da formulação binária pode compreender uma solução contendo a oxidase, a mieloperoxidase e pelo menos dois aminoácidos que melhoram a atividade, por exemplo, glicina, l-alanina e l-prolina. A segunda parte do binário pode compreender um substrato para a oxidase, por exemplo, glicose ou dextrose, no caso glicose oxidase ou oxigênio molecular, O₂. O substrato pode ser fornecido, por exemplo, na forma de uma pastilha sólida. Para a esterilização de um artigo, por exemplo, um instrumento cirúrgico ou lentes de contato, a pastilha do substrato pode ser colocada em uma câmara de esterilização junto com o item a ser esterilizado. A

mieloperoxidase, aminoácidos que melhoram a atividade e oxidase são adicionados para iniciar a esterilização. Em algumas modalidades, a composição de mieloperoxidase adicionalmente pode compreender álcool de maneira a facilitar a solubilização e utilização do substrato da oxidase pela oxidase. Este sistema produzirá ação microbida prolongada, desde que suficiente substrato esteja presente para acionar a reação.

[0052] As composições da invenção podem ser administradas sozinhas ou em combinação com um ou mais outros agentes terapêuticos. Agentes terapêuticos adicionais representativos que podem ser usados em combinação com as composições da invenção incluem, por exemplo, agentes antibióticos ou antissépticos, tais como agentes antibactericidas, agentes antifúngicas, antivirais e/ou agentes antiparasíticos. Em algumas modalidades, os agentes terapêuticos adicionais podem ser um ou mais penicilinas, cefalosporinas, carbacephems, cephamicinas, carbapenems, monobactams, aminoglicosídeos, glicopeptídeos, quinolonas, tetraciclina, macrolídeos, e/ou fluorquinolonas. Em algumas modalidades, os agentes terapêuticos adicionais podem ser iodo, prata, cobre, clorexidina, poliexanida, biguanidas, quitosana, e/ou ácido acético. Um ou mais agentes terapêuticos adicionais da invenção podem ser incorporados como parte da mesma composição ou podem ser administrados separadamente.

[0053] Para aplicações *in vivo*, as composições antissépticas podem ser administradas em qualquer forma farmacêuticamente aceitável eficaz para aquecer animais de sangue quente, incluindo indivíduos humanos e animais, por exemplo, em formas de dosagem tópica, lavagem, oral, vaginal, ou supositório, como um jato, aerossol tópico, bucal, nasal para inalação ou de qualquer outra maneira eficaz para distribuir mieloperoxidase ativa a um local de infecção por microrganismo. A via de administração preferivelmente será designada para obter contato direto das composições antissépticas com os microrganismos infectantes. Em um aspecto da invenção, as composições da invenção são distribuídas ou administradas topicamente às áreas de um indivíduo humano ou animal que são suscetíveis à infecção, tais como, por exemplo, nas gengivas, olhos, ouvidos, pele, feridas, áreas vaginais, áreas da

virilha, escaras, queimadas, áreas debaixo de curativos médicos, fraldas, ou outras coberturas que são igualmente úmidas e similares.

[0054] Para aplicações tópicas, o carreador farmacêuticamente aceitável pode ter a forma de líquidos, cremes, espumas, loções, unguentos, suspensões, supositórios, ou géis e pode adicionalmente compreender solventes aquosos ou orgânicos, agentes de tamponamento, emulsificantes, agentes gelificantes, umidificantes, estabilizantes, agentes tensoativos, agentes umectantes, conservantes, agentes de liberação com o tempo, e menores quantidades de umectantes, agentes sequestrantes, corantes, perfumes, e outros componentes comumente empregados em composições farmacêuticas para administração tópica. Além do mais, as composições da invenção podem ser impregnadas em curativos ou coberturas para aplicação a um indivíduo.

[0055] Em uma outra modalidade da invenção, as composições da invenção podem ser especificamente designadas para aplicações *in vitro*, tais como desinfecção ou esterilização de dispositivos médicos, lentes de contato e similares, particularmente onde os dispositivos ou lentes se destinam a ser usados em contato com um paciente ou usuário. Para aplicações deste tipo, as composições podem ser convenientemente fornecidas na forma de um líquido, creme, espuma, loção, ou gel e podem ser fornecidas com emulsificantes, agentes tensoativos, agentes de tamponamento, agentes umectantes, conservantes, e outros componentes comumente encontrados em composições deste tipo. Composições da invenção podem ser impregnadas em materiais absorbtivos, tais como suturas, bandagens, e gaze, ou revestidas na superfície de materiais de fase sólida, tais como grampos, zíperes e catéteres para distribuir as composições a um local para a prevenção de infecção microbiana. Outros sistemas de distribuição deste tipo serão prontamente evidentes para os versados na tecnologia.

[0056] Outros componentes, tais como uma oxidase para a geração de peróxido, substrato para a oxidase e haleto podem ser incluídos, conforme desejado, da forma descrita em detalhe anteriormente. Além do mais, os componentes podem ser formulados em uma única formulação, ou podem ser separados em formulações binárias para posterior mistura durante o uso, conforme pode ser desejado para uma

aplicação particular. Para formulações únicas, um componente de sistema requerido que é disponível no local de aplicação, tais como haleto, oxidase, grupo prostético para a oxidase, reduzindo o substrato para a oxidase, ou oxigênio molecular é preferivelmente deixado de fora da formulação para precluir a reação prematura e exaustão dos componentes do sistema.

[0057] Conforme um exemplo ilustrativo, uma composição adequada para uso como uma solução antimicrobiana (ou anti-infecciosa) pode compreender de cerca de 1 a 50.000 µg/mL (isto é, de cerca de 0,375 a cerca de 18,750 GU/mL) de mieloperoxidase, de 0,1 a 500 µmol/mL (isto é, de 0,1 a 500 mM) de glicina, de 0,1 a 500 µmol/mL (isto é, de 0,1 a 500 mM) de L-prolina, de 0 a 100 µmol/mL (isto é, de 0 a 100 mM) de L-alanina, de 0,01 a 500 unidades por mL de glicose oxidase, e de 10 a 150 µmol/mL de cloreto. A composição anterior é combinada com de 1 a 500 µmol/mL (isto é, de 1 a 500 mM) de glicose ou dextrose e usada como um líquido desinfetante ou solução esterilização.

[0058] O exposto anteriormente pode ser mais bem entendido em conjunto com os seguintes exemplos representativos, que são apresentados para os propósitos de ilustração e não a título de limitação.

Exemplos

Exemplo 1

O efeito de L-Lisina na atividade antimicrobiana do sistema de mieloperoxidase contra *Staphylococcus aureus* na presença de sangue

[0059] O efeito de L-lisina na atividade do sistema de mieloperoxidase contra *Staphylococcus aureus* foi demonstrado como se segue.

Materiais

[0060] Suspensões de bactérias, especificamente *Staphylococcus aureus* neste exemplo, foram preparadas pelo método de agitação do frasco para alcançar crescimento de fase tardia log a precoce estacionária. Bactérias cresceram 24 hora em caldo de soja de tripticase (TSB) a 35 °C. As culturas foram centrifugadas a 4.000 rpm por 10 minutos e os sobrenadantes removidos. O precipitado foi coletado e lavado duas vezes com salina normal 0,9 % estéril (NS). Os microrganismos lavados foram

suspensos e diluídos com salina normal a um padrão de 3 McFarland, isto é, aproximadamente 10^9 unidades formadoras de colônia de bactérias (CFU) por mL. Contagens de colônia reais são confirmadas por diluições em série (10^{-1} a 10^{-5} ou 10^{-6}) plaqueadas em TSA e incubadas durante toda a noite a 35 °C. Para obter um inóculo alvo que funciona próximo do final de 10^7 CFU/mL, 15 microlitros de organismos por mL de mistura de reação final são usados.

[0061] Glicose oxidase (GO) de *Aspergillus Niger* foi adquirido da Biozyme, Inc., Reino Unido, Catálogo # GO3A, 270 U/mg). Mieloperoxidase de porco (p-MPO) (Exoxemis, Inc., Little Rock, Arkansas, U.S.A., 375 U/mg). Soluções de estoque estéreis de d-glicose e cloreto de sódio foram preparadas e usadas em uma concentração final de 150 mM cada. Cloridrato de l-lisina (Spectrum Chemical Catalog # L1142) foi preparado como uma solução estoque 10 mM. Catalase (Sigma, Catálogo # C-40) foi preparada como uma solução estoque 1 % em salina normal 0,9 % estéril. Sangue foi coletado por venipunção e usado como sangue total no mesmo dia.

Metodologia

[0062] Usando técnicas estéreis, p-MPO e soluções de glicose oxidase foram preparadas em concentrações indicadas na tabela 1 de tampão fosfato 20 mM a pH 6,5 contendo 0,02 % de Tween-80, 150 mEq/L de cloreto e l-lisina tanto em 0, 1,25, 5 quanto 20 μ mol/mL. *Staphylococcus aureus* foi usado para dar uma concentração alvo final de $2-3 \times 10^7$ CFU ($7,4 \log 10$) por mL e sangue total venoso foi usado para dar uma concentração final de 3 %. Glicose foi adicionada às misturas de reação a uma concentração final de 150 mM, que iniciou a reação microbiana. O volume final das misturas de reação foi 1 mL. As reações correram naturalmente de 30 minutos a 2 hora, conforme necessário, a temperatura ambiente ou a 37 °C em um banho seco. Nos pontos de tempo especificados as misturas de reação foram tratadas com 100 microlitros de uma solução de catalase, contendo um mínimo de 100 unidades/ μ L, para consumir o restante do peróxido e terminar a morte oxidativa. Contagens de placa de diluição em série foram realizadas a partir dos conteúdos de cada frasco em salina estéril e inoculadas em ágar de soja de tripticase (TSA) para cultura quantitativa. Placas foram então incubadas a 37 °C e contagens tomadas em 24 hora. Depois da

incubação, as unidades formadoras de colônia (CFU) foram contadas como uma medição da viabilidade dos organismos e os resultados comparados a um controle de inóculo. Os resultados são mostrados na tabela 1, como a média de 2 replicatas.

Tabela 1

Efeito de L-Lisina na atividade microbicida do sistema de mieloperoxidase contra *Staphylococcus aureus* na presença de sangue

Concentração de L-Lisina mM	MPO U/mL	GO U/mL	Viabilidade média CFU/mL 30 min	Viabilidade média CFU/mL 60 min	Log da redução 30 min	Log da redução 60 min
0	38	3.3	6300000		0,6	
0	38	3.3		700000		1,5
5	38	3.3	6050		3,6	
5	38	3.3		770		4,5
20	38	3.3	6450		3,6	
20	38	3.3		620		4,6
0	38	33.3	435000		1,8	
0	38	33.3		4650		3,7
5	38	33.3	7		6,5	
5	38	33.3		3		6,8
20	38	33.3	5		6,6	
20	38	33.3		5		6,6
0	9	0,833	8550000		0,5	
0	9	0,833		6350000		0,6
1.25	9	0,833	5050000		0,7	
1.25	9	0,833		620000		1,6
5	9	0,833	775000		1,5	
5	9	0,833		53000		2,7
0	9	8,33	6150000		0,6	
0	9	8,33		5050000		0,7
1.25	9	8,33	6200000		0,6	
1.25	9	8,33		4950		3,7
5	9	8,33	675000		1,6	
5	9	8,33		47		5,7
01	0	0		25050000		0,0

¹ Controle realizado na ausência de sangue, aminoácido, glicose, MPO, e glicose oxidase.

[0063] Conforme mostrado na tabela 1, MPO mais glicose oxidase apresenta atividade microbicida potente na presença do aminoácido (AA) L-lisina. Esta combinação matou 10 (7) *Staphylococcus aureus* na presença de 3 % de sangue, enquanto que a combinação idêntica sem L-lisina deu significativamente menos morte.

Exemplo 2

O efeito de aminoácidos como agentes que melhoram o potencial para a atividade antimicrobiana do sistema de mieloperoxidase contra *Staphylococcus aureus* na presença de sangue

[0064] O efeito de vários aminoácidos e homólogos de aminoácido, como agentes que melhoram o potencial para ação microbicida de MPO na presença de sangue, foi demonstrado pelo seguinte procedimento geral do exemplo 1, exceto que cada aminoácido testado usou uma única concentração de p-MPO (714 pmol/mL, que é equivalente a 100 µg/mL ou 38 U/mL) e uma única concentração de glicose oxidase (33,3 U/mL). Os aminoácidos individuais, indicados na tabelas 2-6 a seguir, foram testados em uma única concentração de 5 µmol/mL e foram comparados ao sistema de MPO sem aminoácidos. O aminoácidos somente, na ausência de MPO foi testado para excluir sua atividade microbicida. Os resultados são mostrados na tabela 2 a tabela 6, como a média de 2 replicatas.

Tabela 2

Tipo de aminoácido: Efeito na atividade microbicida do sistema de mieloperoxidase contra *Staphylococcus aureus* na presença de sangue

Aminoácido nome	Concentração de aminoácido mM	MPO U/mL	GO U/mL	Viabilidade média CFU/mL 60 min	Log 10 (CFU+1) Sobreviventes 60 min	Log da redução 60 min
I-Alanina	5	38	33,3	7	0,9	6,5
I-Arginina	5	38	33,3	5450000	6,7	0,6
I-Cisteína	5	38	33,3	17400000	7,2	0,1
I-Glutâmico ácido	5	38	33,3	236	2,4	5,0
I-Glutamina	5	38	33,3	286	2,5	4,9
Glicina	5	38	33,3	0	0,0	7,4
I-Histidina	5	38	33,3	48000	4,7	2,7
I-Lisina	5	38	33,3	0	0,0	7,4
I-Metionina	5	38	33,3	6600000	6,8	0,6
I-Fenilalanina	5	38	33,3	0	0,0	7,4
I-Prolina	5	38	33,3	4850	3,7	3,7
I-Serina	5	38	33,3	0	0,0	7,4
I-Treonina	5	38	33,3	630000	5,8	1,6
I-Triptofano	5	38	33,3	21150000	7,3	0,1
I-Valina	5	38	33,3	0	0,0	7,4
nenhum	0	38	33,3	5200000	6,7	0,7
nenhum 1	0	0	0	23950000	7,4	0,0

¹ Controle realizado na ausência de sangue, aminoácido, glicose, MPO e glicose oxidase.

Tabela 3

Tipo de aminoácido: Efeito na atividade microbicida do sistema de mieloperoxidase
contra *Staphylococcus aureus* na presença de sangue

Aminoácido	Concentração de aminoácido	MPO	GO	Viabilidade média CFU/mL	Log 10 (CFU+1) Sobreviventes	Log da redução
nome	mM	U/mL	U/mL	60 min	60 min	60 min
I-Leucina	5	38	33,3	0	0,0	7,3
I-Isoleucina	5	38	33,3	0	0,0	7,3
ácido I- Aspártico	5	38	33,3	620000	5,8	1,5
I-Asparagina	5	38	33,3	5950000	6,8	0,6
I- Hidroxiprolina	5	38	33,3	0	0,0	7,3
I-Ornitina	5	38	33,3	0	0,0	7,3
I-Tirosina	5	38	33,3	630000	5,8	1,5
d-Alanina	5	38	33,3	0	0,0	7,3
Anidrido de alanina	5	38	33,3	845000	5,9	1,4
Anidrido de glicina	5	38	33,3	830000	5,9	1,4
Taurina	5	38	33,3	830000	5,9	1,4
d-Treonina	5	38	33,3	815000	5,9	1,4
Ácido pirúvico	5	38	33,3	4900000	6,7	0,6
Ácido hipúrico	5	38	33,3	865000	5,9	1,4
Ácido nicotínico	5	38	33,3	4150000	6,6	0,7
nenhum	0	38	33,3	5550000	6,7	0,6
nenhum ¹	0	0	0	22000000	7,3	0,0

¹ Controle realizado na ausência de sangue, aminoácido, glicose, MPO e glicose oxidase.

Tabela 4

Tipo de aminoácido: Efeito na atividade microbicida do sistema de mieloperoxidase
contra *Staphylococcus aureus* na presença de sangue

Aminoácido	Concentração de aminoácido	MPO	GO	Viabilidade média CFU/mL	Log da redução
nome	mM	U/mL	U/mL	60 min	60 min
Beta alanina	5	38	33,3	0	7,4
éster metílico de I-Ala	5	38	33,3	0	7,4
I-Ala-I-ala	5	38	33,3	238500	2,0
Ácido glicoxílico	5	38	33,3	610000	1,6
d-Prolina	5	38	33,3	830	4,5

Aminoácido	Concentração de aminoácido	MPO	GO	Viabilidade média CFU/mL	Log da redução
nome	mM	U/mL	U/mL	60 min	60 min
d-Leucina	5	38	33,3	66550	2,6
d-Lisina	5	38	33,3	5050000	0,7
ácido d-Glutâmico	5	38	33,3	955000	1,4
d-Triptofano	5	38	33,3	19700000	0,1
nenhum	0	38	33,3	665000	1,6
nenhum1	0	0	0	26150000	0,0

¹ Controle realizado na ausência de sangue, aminoácido, glicose, MPO, e glicose oxidase.

Tabela 5

Tipo de aminoácido: Efeito na atividade microbicida do sistema de mieloperoxidase contra *Staphylococcus aureus* na presença de sangue

Aminoácido 1	concentração de AA 1	MPO	GO	Viabilidade média CFU/mL	Log da redução
nome	mM	U/mL	U/mL	60 min	60 min
d-Glutamina	5	38	33,3	18	6,1
d-Isoleucina	5	38	33,3	0	7,4
d-Ornitina	5	38	33,3	0	7,4
d-Fenilalanina	5	38	33,3	0	7,4
d-Serina	5	38	33,3	0	7,4
d-Valina	5	38	33,3	0	7,4
d-Arginina	5	38	33,3	0	7,4
ácido d-Aspártico	5	38	33,3	570000	1,6
d-Metionina	5	38	33,3	9400000	0,4
d-Histidina	5	38	33,3	10900	3,4
d-Tirosina	5	38	33,3	9400	3,4
nenhum	0	38	33,3	400000	1,8
nenhum	0	0	0	24700000	0,0

[0065] Como um controle para determinar a atividade microbicida dos aminoácidos sozinhos, o procedimento do exemplo 2 foi seguido sem replicação, exceto na ausência de glicose, MPO, e glicose oxidase. Os resultados são mostrados na tabela 6.

Tabela 6

Tipo de aminoácido: Atividade microbicida do aminoácido sozinho contra

Staphylococcus aureus na presença de sangue

Aminoácido	concentração de aminoácido	MPO	GO	viabilidade média CFU/mL	Log da redução
nome	mM	U/mL	U/mL	60 min	60 min
I-Alanina	5	0	0	24100000	0,0
I-Arginina	5	0	0	23600000	0,0
I-Cisteína	5	0	0	22400000	0,0
ácido I-Glutâmico	5	0	0	23700000	0,0
I-Glutamina	5	0	0	24100000	0,0
Glicina	5	0	0	25300000	0,0
I-Histidina	5	0	0	22700000	0,0
I-Lisina	5	0	0	21400000	0,0
I-Metionina	5	0	0	19800000	0,1
I-Fenilalanina	5	0	0	22400000	0,0
I-Prolina	5	0	0	21600000	0,0
I-Serina	5	0	0	24100000	0,0
I-Treonina	5	0	0	23300000	0,0
I-Triptofano	5	0	0	21600000	0,0
I-Valina	5	0	0	23100000	0,0
I-Leucina	5	0	0	18700000	0,1
I-Isoleucina	5	0	0	20500000	0,0
I-Aspártico ácido	5	0	0	18600000	0,1
I-Asparagina	5	0	0	21800000	0,0
I-Hidroxiprolina	5	0	0	20400000	0,0
I-Ornitina	5	0	0	19200000	0,1
I-Tirosina	5	0	0	21600000	0,0
d-Alanina	5	0	0	19600000	0,0
Anidrido de alanina	5	0	0	21900000	0,0
Anidrido de glicina	5	0	0	20100000	0,0
Taurina	5	0	0	21600000	0,0
d-Treonina	5	0	0	20700000	0,0
Ácido pirúvico	5	0	0	22100000	0,0
Ácido hipúrico	5	0	0	19700000	0,0
Ácido nicotínico	5	0	0	23200000	0,0
Beta alanina	5	0	0	25500000	0,0
éster metílico de I-Ala	5	0	0	24300000	0,0
I-Ala-I-ala	5	0	0	26100000	0,0

Aminoácido	concentração de aminoácido	MPO	GO	viabilidade média CFU/mL	Log da redução
nome	mM	U/mL	U/mL	60 min	60 min
Ácido glicoxílico	5	0	0	22200000	0,1
d-prolina	5	0	0	21400000	0,1
d-Leucina	5	0	0	24400000	0,0
d-Lisina	5	0	0	25100000	0,0
ácido d-Glutâmico	5	0	0	26200000	0,0
d-Triptofano	5	0	0	22600000	0,1
d-Glutamina	5	0	0	20500000	0,1
d-Isoleucina	5	0	0	21300000	0,1
d-Ornitina	5	0	0	20600000	0,1
d-Fenilalanina	5	0	0	24200000	0,0
d-Serina	5	0	0	23100000	0,0
d-Valina	5	0	0	20900000	0,1
d-Arginina	5	0	0	21500000	0,1
ácido d-Aspártico	5	0	0	20900000	0,1
d-Metionina	5	0	0	21100000	0,1
d-Histidina	5	0	0	22300000	0,0
d-Tirosina	5	0	0	23200000	0,0

[0066] Tabelas 2 a 5 mostram o desempenho do sistema de MPO com e sem aminoácidos adicionados. Tabela 6 mostra que nem aminoácidos, nem homólogos são microbicidas em si na ausência de MPO.

[0067] A magnitude da melhora mediada por aminoácido depende do aminoácido usado e varia de zero a pelo menos 6 logs de melhoria nas condições de teste.

[0068] Na tabela 2, testes com l-aminoácidos representativos demonstram a maior atividade do sistema de MPO quando usados com aminoácidos. As exceções notáveis são cisteína, metionina, e triptofano, que são aminoácidos que espera-se que reajam quimicamente com os intermediários oxidativos produzidos pelo sistema de MPO, gerando compostos inativos. A limitada atividade melhorada de histidina pode ser explicada pelo fato de que pode-se esperar que seja altamente reativa a oxigênio singlete e seja consumida pelo produto do sistema de MPO.

[0069] Tabelas 3 e 4 têm l-aminoácidos adicionais e mostram que ésteres e outros

homólogos de aminoácidos próximos têm atividade igualmente demonstrável.

[0070] Na tabelas 3, 4, e 5, inúmeros d-aminoácidos foram testados e como é o caso para os l-aminoácidos, muitos são capazes de fornecer melhora significativa para a atividade microbica da formulação. Note que d-arginina, mostrado na tabela 5, é altamente ativo ao contrário de l-arginina essencialmente inativa mostrada na tabela 2.

[0071] No geral, os aminoácidos alifáticos, especialmente os que têm cadeias ramificadas são altamente ativos.

[0072] Na tabela 6, todos os aminoácidos foram testados sozinhos, na ausência de MPO para excluir sua atividade microbica.

Exemplo 3

O efeito dos análogos de aminoácido como agentes que melhoram o potencial para a atividade antimicrobiana do sistema de mieloperoxidase contra *Staphylococcus aureus* na presença de sangue

[0073] O efeito de vários beta aminoácidos, derivados de éster, e aminoácidos N-substituídos, como agentes que melhoram o potencial para ação microbica de MPO na presença de sangue, foi demonstrado pelo seguinte procedimento geral do exemplo 2. Os análogos de aminoácido sozinhos, na ausência de MPO, foram testados para eliminar sua atividade microbica.

[0074] Os resultados são mostrados na tabela 7 e tabela 8 a seguir.

Tabela 7

Tipo de análogo de aminoácido: Efeito na atividade microbica do sistema de mieloperoxidase contra *Staphylococcus aureus* na presença de sangue

Aminoácido nome	Concentração de amino-ácido mM	MPO U/mL	GO U/mL	Viabilidade média CFU/mL 60 min	Log da redução 60 min
Beta Aminoácidos					
dl-Beta-homoleucina	5	38	33,3	0	7,4
ácido 3-Aminobutanóico	5	38	33,3	9	6,4
monocloridrato do ácido dl-2,3-Diaminopropiônico	5	38	33,3	0	7,4
ácido dl-3-Aminoisobutírico	5	38	33,3	0	7,4
cloridrato do éster etílico de Beta-Alanina	5	38	33,3	1195000	1,3
3-aminobutirato de etila	5	38	33,3	0	7,4

Aminoácido nome	Concentração de amino-ácido mM	MPO U/mL	GO U/mL	Viabilidade média CFU/mL 60 min	Log da redução 60 min
Aminoácidos de éster					
dicloridrato de éster metílico de L-Lisina	5	38	33,3	0	7,4
cloridrato de éster metílico de L-Tirosina	5	38	33,3	87000	2,4
cloridrato de éster metílico de Glicina	5	38	33,3	0	7,4
cloridrato do éster etílico de L-Valina	5	38	33,3	0	7,4
2-aminopropanoato de etila	5	38	33,3	0	7,4
Aminoácidos N-Substituídos					
Cloridrato do éster sarcosina metílico	5	38	33,3	0	7,4
cloridrato de éster metílico de L-Prolina	5	38	33,3	0	7,4
Ácido nipecótico	5	38	33,3	0	7,4
nenhum ¹	0	0	0	23150000	0,0

¹ Controle realizado na ausência de sangue, aminoácido, glicose, MPO, e glicose oxidase.

[0075] Como um controle para determinar o atividade microbicida dos aminoácidos sozinhos, o procedimento anterior foi seguido sem replicação, exceto na ausência de glicose, MPO, e glicose oxidase. Os resultados são mostrados na tabela 8.

Tabela 8

Tipo de análogo de aminoácido: Atividade microbicida do análogo de aminoácido sozinho contra *Staphylococcus aureus* na presença de sangue

Aminoácido nome	concentração de aminoácido mM	MPO U/mL	GO U/mL	Viabilidade média CFU/mL 60 min	Log da redução 60 min
Beta Aminoácidos					
dl-Beta-homoleucina	5	0	0	20500000	0,0
ácido 3-Aminobutanóico	5	0	0	21300000	0,0
monocloridrato do ácido dl-2,3-Diaminopropiônico	5	0	0	20600000	0,0
ácido dl-3-Aminoisobutírico	5	0	0	24200000	0,0
cloridrato do éster etílico de Beta-Alanina	5	0	0	23100000	0,0
3-aminobutirato de etila	5	0	0	20900000	0,0
Ester Aminoácidos					
dicloridrato de éster metílico de L-Lisina	5	0	0	21500000	0,0
cloridrato de éster metílico de L-Tirosina	5	0	0	20900000	0,0

Aminoácido	concentração de aminoácido	MPO	GO	Viabilidade média	Log da
nome	mM	U/mL	U/mL	CFU/mL 60 min	redução 60 min
cloridrato de éster metílico de Glicina	5	0	0	21100000	0,0
cloridrato do éster etílico de L-Valina	5	0	0	22300000	0,0
2-aminopropanoato de etila	5	0	0	23200000	0,0
Aminoácidos N-Substituídos					
Cloridrato do éster sarcosina metílico	5	0	0	23200000	0,0
cloridrato de éster metílico de L-Prolina	5	0	0	23200000	0,0
Ácido nipecótico	5	0	0	23200000	0,0

[0076] Conforme mostrado na tabela 7 e tabela 8, o sistema de MPO apresenta atividade microbicida potente na presença da maioria dos aminoácidos homólogos testados. A maioria dos compostos selecionados para representar beta aminoácido, aminoácido de éster, e homólogos de aminoácido N-substituídos alcançaram 107 CFU mortos de *Staphylococcus aureus* na presença de 3 % de sangue, enquanto que condições de teste idênticas sem aminoácidos deu menos que 1,5 Log da redução, conforme mostrado na tabela 2 a tabela 5. Aminoácidos sozinhos não apresentam nenhuma atividade microbicida conforme mostrado na tabela 8.

Exemplo 4

[0077] O procedimento geral do exemplo 2 foi seguido por vários aminoácidos usando MPO em concentrações de 25 ou 100 µg/mL e os aminoácidos em concentrações de 1,25, 5, ou 20 µmol/mL (mM) por períodos de tempo de 30 ou 60 minutos antes da reação finalizar com catalase. O Log 10 (CFU+1) de organismos sobreviventes para cada um dos aminoácidos e condições é mostrado na seguinte tabela 9 classificada em ordem de efetividade decrescente dos resultados médios das condições de teste.

Tabela 9

Efeito de aminoácidos na atividade microbicida do sistema de mieloperoxidase contra *Staphylococcus aureus* em concentrações e condições de tempo variadas

Condições de teste:	A	B	C	D	E	F	G	H
MPO (µg/mL)	100	100	100	100	25	25	25	25
AA (mM)	20	20	5	5	5	5	1,25	1,25

	tempo (min)	30	60	30	60	30	60	30	60	
Aminoácido:	Log 10 (CFU+1) Sobreviventes								Classificação média	
	A	B	C	D	E	F	G	H		
Beta alanina	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1.000	
éster metílico de d-										
Alanina	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1.000	
I-Isoleucina	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,1	0,0	1.250	
I-Leucina	0,0	0,0	0,0	0,0	4,1	0,0	3,9	0,0	2.000	
I-Valina	0,0	0,0	0,0	0,0	4,7	0,0	4,8	0,0	2.375	
d-Valina	0,0	0,0	0,0	0,0	4,1	0,0	6,7	0,0	2.625	
d-Isoleucina	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	6,0	1,1	2.625	
d-Fenilalanina	0,0	0,0	0,0	0,0	5,1	0,0	7,2	4,9	6.500	
I-Fenilalanina	0,0	0,0	0,0	0,0	7,1	0,0	7,0	4,9	7.500	
I-Serina	5,8	0,0	5,0	0,0	5,0	0,0	6,8	1,8	8.000	
éster metílico de I-										
Alanina	0,0	0,0	0,0	0,0	7,3	0,0	7,3	0,0	8,625	
I-Ornitina	6,9	0,0	6,7	0,0	7,2	0,0	7,3	0,0	12.375	
I-Alanina	6,1	0,0	5,1	0,0	6,9	4,1	7,0	4,7	12.875	
d-Leucina	1,8	1,9	2,7	2,0	3,8	2,2	6,7	2,1	13.625	
I-Prolina	5,8	0,0	4,9	0,0	7,1	3,9	7,0	6,8	14.000	
I-Lisina 261	0,8	0,8	0,9	0,5	5,8	1,6	6,8	3,7	14.125	
d-Ornitina	6,8	0,0	5,1	0,0	7,3	3,9	7,3	5,7	15.500	
d-Serina	6,0	3,9	6,0	0,0	6,8	6,5	6,7	6,0	15.625	
d-Prolina	4,8	0,0	5,7	2,7	6,9	2,4	7,3	3,7	16.125	
d-Tirosina	5,8	0,0	6,7	5,0	6,8	5,9	6,7	7,0	18,125	
Glicina	7,0	0,0	6,0	0,0	7,2	6,8	7,3	6,9	19.625	
d-Arginina	7,0	6,8	6,9	0,0	6,9	6,7	7,0	5,9	20.000	
d-Histidina	6,8	3,9	5,1	4,1	7,0	6,0	6,9	5,8	20,125	
d-Glutamina	6,8	4,0	5,0	0,0	7,3	7,0	7,2	7,0	21.375	
d-Alanina	7,3	0,0	6,8	0,6	7,3	3,7	7,3	6,7	22.500	
Ácido hipúrico	6,8	5,0	7,3	5,9	7,3	5,9	6,7	5,8	24.875	
I-Glutamina	7,0	5,2	7,2	0,0	7,3	7,1	6,8	7,0	25.000	
ácido I-Aspártico	7,0	6,8	7,0	5,8	7,1	7,0	7,0	6,9	26.375	
ácido I-Glutâmico	7,3	6,0	6,9	2,8	7,1	7,0	7,3	6,7	26.875	
I-Treonina	7,3	7,3	7,1	5,5	7,3	7,1	7,3	6,7	29.625	
d-Treonina	7,4	5,0	7,1	5,1	7,3	6,8	7,3	6,7	29.750	
anidrido de L-alanina	7,1	6,0	7,2	5,8	7,2	7,3	7,2	7,2	30,250	
I-Hidroxiprolina	7,2	7,3	7,2	0,9	7,3	7,3	7,4	6,1	30,625	
I-Histidina	7,3	7,3	6,8	4,7	7,3	7,3	7,3	7,3	32.125	
Taurina	7,3	5,1	7,3	5,0	7,3	7,0	7,3	7,1	32.625	
Anidrido de glicina	7,0	6,9	7,3	5,9	7,4	7,2	7,3	7,0	33.000	
I-Tirosina	7,3	7,2	7,3	5,8	7,3	7,1	7,3	7,0	33.250	

Exemplo 5

O efeito das combinações de duas maneiras dos aminoácidos na atividade antimicrobiana do sistema de mieloperoxidase contra *Staphylococcus aureus* na presença de sangue

[0078] O efeito das combinações de duas maneiras de aminoácidos, como agentes que melhoram o potencial para ação microbicida de p-MPO na presença de sangue, foi demonstrado pelo seguinte procedimento geral do exemplo 2, exceto que cada teste continha uma concentração baixa única de MPO (12,5 µg/mL ou 4,7 U/mL) e glicose oxidase (4,2 U/mL), e dois ativadores de aminoácido, da forma indicada na tabelas 9 a 13 a seguir, cada um adicionado às misturas em uma concentração final de 1,25 µmol/mL. Quando os melhoradores de aminoácido são testados individualmente para comparação, eles são adicionados às misturas em uma concentração final de 2,5 µmol/mL.

[0079] Os resultados são mostrados a seguir.

Tabela 10

Efeito de Combinações de duas maneiras de aminoácidos na atividade microbicida do sistema de mieloperoxidase contra *Staphylococcus aureus* na presença de sangue

AminoÁcido 1	AA 1	AminoÁcido 2	Concentração de AA 2	MPO	GO	Viabilidade média CFU/mL	Log da redução
nome	mM	nome	mM	U/mL	U/mL	50 min	50 min
d-Tirosina	1,25	I-Leucina	1,25	4,7	4,2	5050000	0,7
d-Tirosina	1,25	d-Glutamina	1,25	4,7	4,2	11050000	0,3
d-Tirosina	1,25	I-Serina	1,25	4,7	4,2	11250000	0,3
d-Valina	1,25	I-Prolina	1,25	4,7	4,2	10100000	0,4
d-Valina	1,25	I-Histidina	1,25	4,7	4,2	12600000	0,3
Glicina	1,25	d-Fenilalanina	1,25	4,7	4,2	4250000	0,8
éster metílico de I-Ala	1,25	d-Fenilalanina	1,25	4,7	4,2	11900000	0,3
ácido I-Aspártico	1,25	I-Alanina	1,25	4,7	4,2	11350000	0,3
I-Aspártico ácido	1,25	ácido I-Glutâmico	1,25	4,7	4,2	13150000	0,3

AminoÁcido 1	AA 1 Conc	AminoÁcido 2	Concentração de AA 2	MPO	GO	Viabilidade média CFU/mL	Log da redução
nome	mM	nome	mM	U/mL	U/mL	50 min	50 min
ácido Glutâmico	I- 1,25	d-Arginina	1,25	4,7	4,2	12500000	0,3
I-Glutamina	1,25	I-Valina	1,25	4,7	4,2	11800000	0,3
I-Glutamina	1,25	éster metílico de I-Ala	1,25	4,7	4,2	12500000	0,3
I-Glutamina	1,25	d-Valina	1,25	4,7	4,2	14850000	0,2
Glicina	1,25	I-Valina	1,25	4,7	4,2	910	4,4
I-Histidina	1,25	I-Ornitina	1,25	4,7	4,2	12250000	0,3
I-	1,25	d-Glutamina	1,25	4,7	4,2	13750000	0,3
Hidroxiprolina							
I-Isoleucina	1,25	d-Fenil- alanina	1,25	4,7	4,2	4850000	0,7
I-Leucina	1,25	ácido I- Glutâmico	1,25	4,7	4,2	8200000	0,5
I-Lisina	1,25	ácido I- Glutâmico	1,25	4,7	4,2	12050000	0,3
I-Ornitina	1,25	I-Fenilalanina	1,25	4,7	4,2	5950000	0,6
nenhum	0	d-Tirosina	2,5	4,7	4,2	1320000	1,3
nenhum	0	I-Leucina	2,5	4,7	4,2	214500	2,1
nenhum	0	d-Glutamina	2,5	4,7	4,2	14750000	0,2
nenhum	0	I-Serina	2,5	4,7	4,2	1175000	1,3
nenhum	0	d-Valina	2,5	4,7	4,2	630000	1,6
nenhum	0	I-Prolina	2,5	4,7	4,2	1235000	1,3
nenhum	0	I-Histidina	2,5	4,7	4,2	7000000	0,5
nenhum	0	Glicina	2,5	4,7	4,2	9100	3,4
nenhum	0	d-	2,5	4,7	4,2	7950000	0,5
		Fenilalanina					
nenhum	0	éster metílico de I-Ala	2,5	4,7	4,2	7250000	0,5
nenhum	0	ácido I- Aspártico	2,5	4,7	4,2	6900000	0,6
nenhum	0	I-Alanina	2,5	4,7	4,2	9750000	0,4
nenhum	0	ácido I- Glutâmico	2,5	4,7	4,2	10850000	0,4
nenhum	0	d-Arginina	2,5	4,7	4,2	14200000	0,2
nenhum	0	I-Glutamina	2,5	4,7	4,2	14350000	0,2
nenhum	0	I-Valina	2,5	4,7	4,2	104500	2,4
nenhum	0	I-Ornitina	2,5	4,7	4,2	18250000	0,1
nenhum	0	I-	2,5	4,7	4,2	13100000	0,3
		Hidroxiprolina					
nenhum	0	I-Isoleucina	2,5	4,7	4,2	159500	2,2

AminoÁcido 1	AA 1 Conc	AminoÁcido 2	Concentração de AA 2	MPO	GO	Viabilidade média CFU/mL	Log da redução
nome	mM	nome	mM	U/mL	U/mL	50 min	50 min
nenhum	0	L-Lisina	2,5	4,7	4,2	16200000	0,2
nenhum	0	L-Fenilalanina	2,5	4,7	4,2	10550000	0,4
nenhum ¹	0	nenhum	0	0	0	25050000	0,0

¹ Controle realizado na ausência de sangue, aminoácido, glicose, MPO e glicose oxidase.

Tabela 11

Efeito de combinações de duas maneiras de aminoácidos na atividade microbicida do sistema de mieloperoxidase contra *Staphylococcus aureus* na presença de sangue

Aminoácido 1	concentração de AA 1	Aminoácido 2	concentração de AA 2	MPO	GO	Viabilidade média CFU/mL	Log da redução
nome	mM	nome	mM	U/mL	U/mL	50 min	50 min
d-Arginina	1,25	L-Fenilalanina	1,25	4,7	4,2	6650000	0,6
d-Arginina	1,25	d-Glutamina	1,25	4,7	4,2	10850000	0,4
d-Arginina	1,25	d-Histidina	1,25	4,7	4,2	6050000	0,6
d-Glutamina	1,25	d-Isoleucina	1,25	4,7	4,2	8950000	0,5
d-Histidina	1,25	d-Prolina	1,25	4,7	4,2	5100000	0,7
d-Histidina	1,25	L-Histidina	1,25	4,7	4,2	11250000	0,4
d-Isoleucina	1,25	L-Leucina	1,25	4,7	4,2	7750000	0,5
d-Isoleucina	1,25	d-Fenilalanina	1,25	4,7	4,2	4100000	0,8
d-Leucina	1,25	L-Histidina	1,25	4,7	4,2	10200000	0,4
d-Leucina	1,25	éster metílico de d-Ala	1,25	4,7	4,2	7100000	0,6
d-Ornitina	1,25	L-Isoleucina	1,25	4,7	4,2	11850000	0,4
d-Ornitina	1,25	L-Ornitina	1,25	4,7	4,2	12850000	0,3
d-Fenilalanina	1,25	L-Lisina	1,25	4,7	4,2	8300000	0,5
d-Prolina	1,25	L-Lisina	1,25	4,7	4,2	12350000	0,3
d-Prolina	1,25	d-Isoleucina	1,25	4,7	4,2	10500000	0,4
d-Prolina	1,25	d-Leucina	1,25	4,7	4,2	11600000	0,4
d-Serina	1,25	d-Treonina	1,25	4,7	4,2	12300000	0,3
d-Serina	1,25	d-Glutamina	1,25	4,7	4,2	12000000	0,4
d-Treonina	1,25	L-Lisina	1,25	4,7	4,2	11900000	0,4
nenhum	0	d-Arginina	2,5	4,7	4,2	14650000	0,3
nenhum	0	L-Fenilalanina	2,5	4,7	4,2	11100000	0,4
nenhum	0	d-Glutamina	2,5	4,7	4,2	15500000	0,2
nenhum	0	d-Histidina	2,5	4,7	4,2	8000000	0,5
nenhum	0	d-Isoleucina	2,5	4,7	4,2	196000	2,1
nenhum	0	d-Prolina	2,5	4,7	4,2	1890000	1,2
nenhum	0	L-Histidina	2,5	4,7	4,2	7000000	0,6

Aminoácido 1	concentração de AA 1	Aminoácido 2	concentração de AA 2	MPO	GO	Viabilidade média CFU/mL	Log da redução
nome	mM	nome	mM	U/mL	U/mL	50 min	50 min
nenhum	0	I-Leucina	2,5	4,7	4,2	200500	2,1
nenhum	0	d-Fenilalanina	2,5	4,7	4,2	9300000	0,5
nenhum	0	d-Leucina	2,5	4,7	4,2	313000	1,9
nenhum	0	éster metílico de d-Ala	2,5	4,7	4,2	9500000	0,5
nenhum	0	d-Ornitina	2,5	4,7	4,2	17950000	0,2
nenhum	0	I-Isoleucina	2,5	4,7	4,2	155500	2,2
nenhum	0	I-Ornitina	2,5	4,7	4,2	17400000	0,2
nenhum	0	I-Lisina	2,5	4,7	4,2	18900000	0,2
nenhum	0	d-Serina	2,5	4,7	4,2	945000	1,5
nenhum	0	d-Treonina	2,5	4,7	4,2	2020000	1,1
nenhum	0	nenhum	0	0	0	26850000	0,0

Exemplo 6

O efeito de combinações de aminoácido de duas maneiras contendo glicina na atividade antimicrobiana do sistema de mieloperoxidase contra *Staphylococcus aureus* na presença de sangue

[0080] Usando o procedimento geral do exemplo 5, em que um dos dois aminoácidos é glicina, rendeu os resultados mostrados nas tabelas 12 e 13.

Tabela 12

Efeito de combinações de duas maneiras de aminoácidos com Glicina na atividade microbica do sistema de mieloperoxidase contra *Staphylococcus aureus* na presença de sangue

Aminoácido 1	Concentração de AA 1	AminoÁcido 2	Concentração de AA 2	MPO	GO	Viabilidade média CFU/mL	Log da redução
Nome	mM	Nome	mM	U/m L	U/m L	50 min	50 min
Glicina	1,25	Beta-alanina	1,25	4,7	4,2	6800	3,5
Glicina	1,25	I-Valina	1,25	4,7	4,2	910	4,4
Glicina	1,25	I-Leucina	1,25	4,7	4,2	6900	3,5
Glicina	1,25	I-Isoleucina	1,25	4,7	4,2	975	4,4
Glicina	1,25	d-Valina	1,25	4,7	4,2	3330	3,8
Glicina	1,25	d-Isoleucina	1,25	4,7	4,2	0	7,4
Glicina	1,25	éster metílico de d-Ala	1,25	4,7	4,2	125500	2,3
Glicina	2,5	nenhum	0	4,7	4,2	7050	3,5

Aminoácido 1	Concentração de AA 1	AminoÁcido 2	Concentração de AA 2	MPO	GO	Viabilidade média CFU/mL 50 min	Log da redução 50 min
Nome	mM	Nome	mM	U/m L	U/m L		
nenhum	0	Beta-alanina	2,5	4,7	4,2	505000	1,7
nenhum	0	I-Valina	2,5	4,7	4,2	104500	2,4
nenhum	0	I-Leucina	2,5	4,7	4,2	200500	2,1
nenhum	0	I-Isoleucina	2,5	4,7	4,2	73000	2,5
nenhum	0	d-Valina	2,5	4,7	4,2	630000	1,6
nenhum	0	d-Isoleucina	2,5	4,7	4,2	196000	2,1
nenhum	0	éster metílico de d-Ala-nenhum	2,5	4,7	4,2	5450000	0,6
nenhum	0	nenhum	0	0	0		0,0

Tabela 13

Efeito de combinações de duas maneiras de aminoácidos com Glicina na atividade microbica do sistema de mieloperoxidase contra *Staphylococcus aureus* na presença de sangue

AminoÁcido 1	concentração de AA 1	AminoÁcido 2	concentração de AA 2	MPO	GO	viabilidade média CFU/mL 50 min	Log da redução 50 min
Nome	mM	Nome	mM	U/mL	U/mL		
Glicina	1,25	I-Alanina	1,25	4,7	4,2	209500	2,1
Glicina	1,25	d-Alanina	1,25	4,7	4,2	162500	2,2
Glicina	1,25	ácido I-Aspártico	1,25	4,7	4,2	51000	2,7
Glicina	1,25	ácido I-Glutâmico	1,25	4,7	4,2	1100000	1,3
Glicina	1,25	I-Glutamina	1,25	4,7	4,2	765000	1,5
Glicina	1,25	I-Histidina	1,25	4,7	4,2	495000	1,7
Glicina	1,25	I-Hidroxi-prolina	1,25	4,7	4,2	4900000	0,7
Glicina	1,25	d-Leucina	1,25	4,7	4,2	90000	2,4
Glicina	1,25	I-Lisina	1,25	4,7	4,2	680000	1,6
Glicina	1,25	I-Ornitina	1,25	4,7	4,2	4600000	0,7
Glicina	1,25	I-Prolina	1,25	4,7	4,2	162500	2,2
Glicina	1,25	I-Serina	1,25	4,7	4,2	99500	2,4
Glicina	1,25	I-Treonina	1,25	4,7	4,2	515000	1,7
Glicina	1,25	I-Tirosina	1,25	4,7	4,2	565	4,6
Glicina	1,25	d-Fenilalanina	1,25	4,7	4,2	4250000	0,8
Glicina	2,5	nenhum	0	4,7	4,2	10050	3,4
nenhum	0	I-Alanina	2,5	4,7	4,2	2230000	1,0
nenhum	0	d-Alanina	2,5	4,7	4,2	1900000	1,1

AminoÁcido 1	concentração de AA 1	AminoÁcido 2	concentração de AA 2	MPO	GO	viabilidade média CFU/mL 50 min	Log da redução 50 min
Nome	mM	Nome	mM	U/mL	U/mL		
nenhum	0	ácido L-Aspártico	2,5	4,7	4,2	4700000	0,7
nenhum	0	ácido L-Glutâmico	2,5	4,7	4,2	11800000	0,3
nenhum	0	L-Glutamina	2,5	4,7	4,2	12550000	0,3
nenhum	0	L-Histidina	2,5	4,7	4,2	4750000	0,7
nenhum	0	L-Hidroxi-prolina	2,5	4,7	4,2	11450000	0,3
nenhum	0	d-Leucina	2,5	4,7	4,2	119000	2,3
nenhum	0	L-Lisina	2,5	4,7	4,2	11400000	0,3
nenhum	0	L-Ornitina	2,5	4,7	4,2	12650000	0,3
nenhum	0	L-Prolina	2,5	4,7	4,2	1500000	1,2
nenhum	0	L-Serina	2,5	4,7	4,2	835000	1,5
nenhum	0	L-Treonina	2,5	4,7	4,2	1415000	1,2
nenhum	0	L-Tirosina	2,5	4,7	4,2	890000	1,4
nenhum	0	d-Fenilalanina	2,5	4,7	4,2	8850000	0,4
nenhum	0	nenhum	0	0	0	25000000	0,0

Exemplo 7

O efeito de combinações de duas maneiras de aminoácido contendo L-Isoleucina na atividade antimicrobiana do sistema de mieloperoxidase contra *Staphylococcus aureus* na presença de sangue

[0081] O aminoácido L-isoleucina foi identificado no exemplo 2 como um forte melhorador da atividade do sistema de MPO contra *Staphylococcus aureus*. O efeito de combinações de duas maneiras de aminoácidos individuais com L-isoleucina, como agentes que melhoram o potencial, para ação microbicida de MPO na presença de sangue, foi desta forma examinado pelo seguinte procedimento do exemplo 5. Os resultados são mostrados na seguinte tabela 14 a seguir.

Tabela 14

Efeito de combinações de duas maneiras de aminoácidos com L-Isoleucina na atividade microbicida do sistema de mieloperoxidase Contra *Staphylococcus aureus* na presença de sangue

AminoÁcido 1	Concentração de AA 1	AminoÁcido 2	Concentração de AA 2	MPO	GO	Média de Viabilidade CFU/mL	Log da redução
Nome	mM	Nome	mM	U/mL	U/mL	50 min	50 min
I-Isoleucina	1,25	Beta-alanina	1,25	4,7	4,2	13850000	0,3
I-Isoleucina	1,25	éster metílico de d-Ala	1,25	4,7	4,2	14700000	0,3
I-Isoleucina	1,25	I-Fenilalanina	1,25	4,7	4,2	7900000	0,5
I-Isoleucina	1,25	ácido I-Glutâmico	1,25	4,7	4,2	13950000	0,3
I-Isoleucina	1,25	d-Glutamina	1,25	4,7	4,2	13700000	0,3
I-Isoleucina	1,25	I-Alanina	1,25	4,7	4,2	16400000	0,2
I-Isoleucina	1,25	I-Hidroxiprolina	1,25	4,7	4,2	12850000	0,3
I-Isoleucina	1,25	d-Leucina	1,25	4,7	4,2	12600000	0,3
I-Isoleucina	1,25	I-Lisina	1,25	4,7	4,2	13350000	0,3
I-Isoleucina	1,25	d-Ornitina	1,25	4,7	4,2	11850000	0,4
I-Isoleucina	1,25	I-Ornitina	1,25	4,7	4,2	14700000	0,3
I-Isoleucina	1,25	d-Fenilalanina	1,25	4,7	4,2	4850000	0,7
I-Isoleucina	1,25	I-Prolina	1,25	4,7	4,2	15950000	0,2
I-Isoleucina	1,25	I-Serina	1,25	4,7	4,2	13250000	0,3
I-Isoleucina	1,25	d-Arginina	1,25	4,7	4,2	12400000	0,3
I-Isoleucina	1,25	I-Tirosina	1,25	4,7	4,2	8450000	0,5
I-Isoleucina	2,5	nenhum	0	4,7	4,2	117000	2,4
nenhum	0	Beta-Alanina	2,5	4,7	4,2	6000000	0,7
nenhum	0	éster metílico de d-Ala	2,5	4,7	4,2	8850000	0,5
nenhum	0	I-Fenilalanina	2,5	4,7	4,2	12050000	0,3
nenhum	0	ácido I-Glutâmico	2,5	4,7	4,2	13700000	0,3
nenhum	0	d-Glutamina	2,5	4,7	4,2	15050000	0,3
nenhum	0	I-Alanina	2,5	4,7	4,2	2215000	1,1
nenhum	0	I-Hidroxiprolina	2,5	4,7	4,2	11550000	0,4
nenhum	0	d-Leucina	2,5	4,7	4,2	163500	2,2
nenhum	0	I-Lisina	2,5	4,7	4,2	16950000	0,2
nenhum	0	I-Ornitina	2,5	4,7	4,2	19200000	0,1
nenhum	0	I-Prolina	2,5	4,7	4,2	1835000	1,2
nenhum	0	I-Serina	2,5	4,7	4,2	940000	1,5
nenhum	0	d-Arginina	2,5	4,7	4,2	15000000	0,3
nenhum	0	I-Tirosina	2,5	4,7	4,2	1450000	1,3
nenhum	0	d-Fenilalanina	2,5	4,7	4,2	7950000	0,5
nenhum	0	d-Ornitina	2,5	4,7	4,2	17950000	0,2
nenhum	0	nenhum	0	0	0	27400000	0,0

[0082] Uma análise dos dados, contidos na tabela 10 a tabela 14, comparando o efeito no desempenho de todas as formulações de dois aminoácidos combinados para o efeito de cada único aminoácido foi conduzida para identificar possível sinergia ou antagonismo.

[0083] Trinta e sete aminoácidos ou derivados destes foram examinados sozinhos. Setenta e quatro pares de aminoácidos foram testados nas condições de

teste descritas anteriormente.

Método de determinação da sinergia

[0084] Cálculos para sinergismo ou antagonismo foram feitos como se segue:

[0085] Para cada par testado de aminoácidos, o CFU previsto foi calculado como a média dos CFU sobreviventes encontrados para os dois resultados de aminoácidos individuais que agem sozinhos nas condições padrão. Considerar, por exemplo, a primeira combinação sinérgica com d-isoleucina e glicina mostrada na tabela 11. O CFU para cada um dos aminoácidos que age separadamente, tomados da tabela 11 anterior é 196000 e 9300, respectivamente. A média destes dois números é 102650, mostrada como os CFU sobreviventes previstos na linha a da tabela 16 a seguir. O CFU real observado para o par é então dividido pelo CFU previsto e multiplicado por 100 para calcular a % do valor previsto. Este valor é então comparado ao valor limiar, discutido na seção seguinte, para determinar se os pares são sinérgicos, antagonísticos ou aditivos.

Cálculo do valor limiar

[0086] O cálculo dos valores limiares apropriados para a determinação do sinergismo e antagonismo foi baseado na variabilidade de medições de sobreviventes de CFU replicados. A maioria das medições foi feita em duplicata. A soma agrupada dos quadrados para todos os dados duplicados, depois da transformação do log 10 (CFU+1), dividida pelo número de graus de liberdade dá a variância do erro dos dados log-transformados. A partir deste Coeficiente de Variação (CV) é calculado e mostrado na tabela 15.

Tabela 15

Cálculo de uma estimativa agrupada do coeficiente de variação de CFU

df	SS agrupado	variância	desvio padrão	~ CV
709	5,6859	0,0080	0,0896	23 %

[0087] Este CV é calculado sobre a faixa total de respostas de CFU. Para a resposta, desta forma, variação normal é em dois desvios padrão ou aproximadamente 50 % a 200 %. Um fator conservativo de um adicional de duas

vezes foi usado aqui para garantir que o sinergismo e antagonismo real fossem identificados. Desta forma, o corte foi ajustado a 25 % para sinergismo e 400 % para antagonismo. Aplicando este limiar ao exemplo anterior dá a conclusão óbvia que há uma ação sinérgica de d-isoleucina e glicina, uma vez que o CFU real para este par foi 0 CFU, ou 0 % do valor previsto.

Tabelas de resultados

[0088] Os resultados de cada combinação testada são divididos em três tabelas. A tabela 16 mostra as combinações sinérgicas com respostas menores que 25 % do valor previsto, Tabela 17 mostra as combinações antagonistas com respostas maiores que 400 % do valor previsto, e Tabela 18 mostra as combinações aditivas, com respostas entre 25 % e 400 % do valor previsto.

Tabela 16

Combinações sinérgicas

Aminoácido 1	Aminoácido 2	CFU real	Média prevista de aminoácidos	Previstos, Real
d-Isoleucina	Glicina	0	102650	0,0 %
I-Tirosina	Glicina	565	589650	0,1 %
Beta-Alanina	Glicina	6800	1630900	0,4 %
d-Valina	Glicina	3330	319650	1,0 %
I-Isoleucina	Glicina	975	69317	1,4 %
I-Valina	Glicina	910	56900	1,6 %
ácido I-Aspártico	Glicina	51000	3121317	1,6 %
éster metílico de d-Ala	Glicina	125500	3834650	3,3 %
I-Leucina	Glicina	6900	106650	6,5 %
I-Alanina	Glicina	209500	2370483	8,8 %
I-Glutamina	Glicina	765000	6704650	11,4 %
I-Lisina	Glicina	680000	5704650	11,9 %
I-Histidina	Glicina	495000	2942150	16,8 %
d-Alanina	Glicina	162500	954650	17,0 %
ácido I-Glutâmico	Glicina	1100000	6124650	18,0 %
I-Serina	Glicina	99500	492650	20,2 %
I-Prolina	Glicina	162500	739650	22,0 %

Tabela 17

Combinações antagonísticas

Aminoácido 1	Aminoácido 2	Real CFU	Média prevista de aminoácidos	Previstos, Real
I-Leucina	d-Tirosina	5050000	762000	662,7 %
I-Isoleucina	I-Alanina	16400000	2430500	674,8 %
I-Isoleucina	d-Alanina	13850000	1690917	819,1 %
d-Treonina	d-Serina	12300000	1482500	829,7 %
I-Prolina	d-Valina	10100000	1050000	961,9 %
I-Serina	d-Tirosina	11250000	1148000	980,0 %
d-Prolina	d-Isoleucina	10500000	1043000	1006,7 %
d-Prolina	d-Leucina	11600000	1052500	1102,1 %
I-Tirosina	I-Isoleucina	8450000	649667	1300,7 %
I-Prolina	I-Isoleucina	15950000	799667	1994,6 %
I-Serina	I-Isoleucina	13250000	552667	2397,5 %
I-Leucina	d-Isoleucina	7750000	200000	3875,0 %
I-Isoleucina	d-Leucina	12600000	172167	7318,5 %

Tabela 18

Combinações aditivas

Aminoácido 1	Aminoácido 2	CFU Real	Média prevista de aminoácidos	Previstos, Real
I-Fenilalanina	I-Ornitina	5950000	13800000	43,1 %
I-Fenilalanina	d-Arginina	6650000	12900000	51,6 %
d-Histidina	d-Arginina	6050000	11300000	53,5 %
I-Ornitina	Glicina	4600000	8204650	56,1 %
I-Lisina	d-Fenilalanina	8300000	13087500	63,4 %
I-Treonina	Glicina	515000	712150	72,3 %
d-Glutamina	d-Arginina	10850000	14700000	73,8 %
I-Ornitina	d-Ornitina	12850000	17175000	74,8 %
Glicina	d-Leucina	90000	112150	80,2 %
I-Lisina	ácido I-Glutâmico	12050000	14857500	81,1 %
I-Hidroxiprolina	Glicina	4900000	5934650	82,6 %
d-Fenilalanina	d-Isoleucina	4100000	4448000	92,2 %
ácido I-Glutâmico	d-Arginina	12500000	13420000	93,1 %
Glicina	d-Fenilalanina	4250000	4354650	97,6 %
I-Hidroxiprolina	d-Glutamina	13750000	13330000	103,2 %
I-Isoleucina	d-Fenilalanina	4850000	4414667	109,9 %
I-Ornitina	I-Histidina	12250000	11137500	110,0 %
d-Isoleucina	d-Glutamina	8950000	7498000	119,4 %
I-Glutamina	éster metílico de I-Ala	12500000	10325000	121,1 %
I-Lisina	d-Treonina	11900000	9747500	122,1 %
I-Lisina	d-Prolina	12350000	9682500	127,5 %
I-Isoleucina	d-Ornitina	11850000	9039667	131,1 %

Aminoácido 1	Aminoácido 2	CFU Real	Média prevista de aminoácidos	Previstos, Real
I-Leucina	ácido I-Glutâmico	8200000	6222000	131,8 %
d-Tirosina	d-Glutamina	11050000	8060000	137,1 %
I-Fenilalanina	I-Isoleucina	7900000	5664667	139,5 %
ácido I-Glutâmico	ácido I-Aspártico	13150000	9236667	142,4 %
éster metílico de I-Ala	d-Fenilalanina	11900000	7975000	149,2 %
I-Lisina	I-Isoleucina	13350000	8802167	151,7 %
d-Serina	d-Glutamina	12000000	7872500	152,4 %
I-Histidina	d-Histidina	11250000	6937500	162,2 %
I-Isoleucina	d-Arginina	12400000	7364667	168,4 %
I-Valina	I-Glutamina	11800000	6752250	174,8 %
I-Ornitina	I-Isoleucina	14700000	8264667	177,9 %
d-Leucina	éster metílico de d-Ala	7100000	3937500	180,3 %
I-Isoleucina	d-Glutamina	13700000	7464667	183,5 %
ácido I-Aspártico	I-Alanina	11350000	5482500	207,0 %
I-Glutamina	d-Valina	14850000	7015000	211,7 %
I-Isoleucina	I-Hidroxiprolina	12850000	5994667	214,4 %
I-Isoleucina	ácido I-Glutâmico	13950000	6184667	225,6 %
r-Isoleucina	Glicina	94500	36650	257,8 %
I-Histidina	d-Leucina	10200000	3045000	335,0 %
I-Isoleucina	éster metílico de d-Ala	14700000	3894667	377,4 %
I-Histidina	d-Valina	12600000	3252500	387,4 %

Combinações de aminoácidos racêmicos

[0089] Aminoácidos racêmicos podem ser considerados como uma mistura 1:1 dos isômeros d e l. Assim, algumas misturas racêmicas foram testadas como combinações para identificar misturas antagonísticas, aditivas ou sinérgicas a base do desempenho dos d- e l-enantiômeros individuais. Os resultados para formas d-, l-, e racêmicas de quatro aminoácidos são mostrados na tabela 19.

Tabela 19

Misturas racêmicas

Aminoácido 1	Concentração de AA 1	MPO	GO	Viabilidade média CFU/mL	Log da redução
Nome	mM	U/mL	U/mL	50 min	50 min
d,l-Isoleucina	2,5	4,7	4,2	64000	2,7

Aminoácido 1	Concentração de AA 1	MPO	GO	Viabilidade média CFU/mL	Log da redução
Nome	mM	U/mL	U/mL	50 min	50 min
d,l-Leucina	2,5	4,7	4,2	650000	1,6
d,l-Fenilalanina	2,5	4,7	4,2	900000	1,4
d,l-Valina	2,5	4,7	4,2	685000	1,5
l-Isoleucina	3,5	4,7	4,2	129333	2,3
l-Leucina	3,5	4,7	4,2	204000	2,1
l-Fenilalanina	3,5	4,7	4,2	11200000	0,4
l-Valina	2,5	4,7	4,2	104500	2,4
d-Isoleucina	2,5	4,7	4,2	196000	2,1
d-Leucina	2,5	4,7	4,2	215000	2,1
d-Fenilalanina	2,5	4,7	4,2	8700000	0,5
d-Valina	2,5	4,7	4,2	630000	1,6

[0090] Com base nos valores previstos nas tabela a seguir, misturas racêmicas parecem ser aditivas exceto para r-fenilalanina que parece ser sinérgica.

Tabela 20

Resultados das misturas racêmicas

Aminoácido	real CFU	Média prevista de aminoácidos	Previsto vs. Real
D,l-isoleucina	64000	162667	39%
D,l-leucina	650000	209500	310%
D,l-fenilalanina	900000	9950000	9%
D,l-valina	685000	367250	187%

Exemplo 8

O efeito da combinação de beta alanina e l-alanina na atividade antimicrobiana do sistema de mieloperoxidase contra esporos de *Bacillus subtilis* na presença de sangue

[0091] O efeito de uma combinação de duas maneiras de beta alanina e l-alanina, como agentes que melhoram o potencial, para ação microbicida de MPO contra esporos de *Bacillus subtilis* na presença de sangue, foi determinado seguindo o procedimento do exemplo 2. Entretanto, neste caso, cada teste continha uma concentração baixa única de MPO (25 µg/mL ou 9.4 U/mL) e glicose oxidase (8,3 U/mL). Suspensões de *Bacillus subtilis* contendo 100 % de esporos, conforme confirmado por microscopia, foram obtidas lavando com 50 % de etanol para eliminar

as formas vegetativas de *Bacillus subtilis*. O efeito tanto de l-alanina quanto de beta alanina sozinho na atividade antimicrobiana da mieloperoxidase contra esporos de *Bacillus subtilis* foi testado para comparação. Os resultados são mostrados na seguinte tabela 21 a seguir.

Tabela 21

O efeito da combinação de beta alanina e l-alanina na atividade antimicrobiana do sistema de mieloperoxidase contra esporos de *Bacillus subtilis* na presença de sangue

Amino Ácido 1	concentração de AA 1	Amino Ácido 2	concentração de AA 2	MPO	GO	Média de Viabilidade CFU/ mL	Média de Viabilidade CFU/ mL	Log da Redução	Log da Redução
nome	mM	Nome		U/mL	U/mL	1 h	2 h	1 h	2 h
Beta alanina	5	l-Alanina	0,2	9,4	8,3	80000		2,3	
Beta alanina	5	l-Alanina	0,2	9,4	8,3		70000		2,4
Beta alanina	5	l-Alanina	0	9,4	8,3		3100000		0,7
nenhum	0	l-Alanina	0,2	9,4	8,3	1200000		1,1	
nenhum	0	l-Alanina	0,2	9,4	8,3		520000		1,5
nenhum	0	nenhum	0	9,4	8,3		3700000		0,6

[0092] Conforme pode-se ver na tabela 21, a interação de duas maneiras dos aminoácidos beta alanina e l-alanina significativamente melhorou a morte por mieloperoxidase dos esporos de *Bacillus subtilis* comparado ao desempenho do sistema de MPO com l-alanina sozinha ou na ausência de aminoácidos. Em 2 hora, a formulação contendo beta alanina/l-alanina demonstrou 2,4 Log da redução enquanto que a formulação somente de l-alanina forneceu 1,5 Log da redução.

[0093] A natureza da relação entre beta alanina e l-alanina foi examinada seguindo o método de determinação da sinergia descrito anteriormente. Em 2 horas, beta alanina sozinha apresenta 3100000 CFU sobreviventes e l-alanina que age sozinha mostra 520000 CFU. A média destes números é 1810000 CFU, que é o valor previsto para a combinação dos dois aminoácidos. O CFU real observado para o par beta alanina/l-alanina é 70000 CFU, que representa somente 3,9 % do valor previsto

indicando uma combinação sinérgica.

Exemplo 9

O efeito de combinações de duas maneiras e aminoácidos individuais na atividade antimicrobiana do sistema de mieloperoxidase contra organismos Gram-negativos, Gram-positivos e levedura na presença de sangue

[0094] O efeito de combinações de duas maneiras de aminoácidos glicina e valina, e individualmente beta alanina, como agentes que melhoram o potencial para ação microbida de MPO contra *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, e *Candida albicans*, na presença de sangue, foi determinado seguindo o procedimento do exemplo 2. Cada organismo foi testado contra uma concentração baixa única de MPO (25 µg/mL ou 9,4 U/mL) e glicose oxidase (8,3 U/mL). Os dois ativadores de aminoácido foram cada um adicionado em uma concentração final de 2,5 µmol/mL e o aminoácido individual, beta alanina, foi testado em uma única concentração de 5 µmol/mL. O efeito de formulações que não contêm nenhum aminoácido na atividade antimicrobiana da mieloperoxidase contra estes organismos foi testado para comparação. Os resultados são mostrados na tabela 22, a seguir.

Tabela 22

O efeito de combinações de duas maneiras e aminoácidos individuais na atividade antimicrobiana do sistema de mieloperoxidase contra organismos Gram-negativos, Gram-positivos e levedura na presença de sangue

Organismo	Aminoácido 1	Concentração de AA 1	Aminoácido 2	Concentração de AA 2	Aminoácido 3	concentração de AA 3	MPO	GO	Inóculo de partida log 10	Viabilidade média CFU/mL 30 min	Viabilidade média CFU/mL 60 min	Log da redução 30 min	Log da redução 60 min
nome	nome	mM	nome		nome	mM	U/mL	U/mL					
P. aeruginosa	Glicina	2,5	I-Valina	2,5	Beta alanina	0	9,4	8,3	7,5	885000		1,5	
P. aeruginosa	Glicina	2,5	I-Valina	2,5	Beta alanina	0	9,4	8,3	7,5		2070		4.1
P. aeruginosa	Glicina	0	I-Valina	0	Beta alanina	5	9,4	8,3	7,5	52		5,7	
P. aeruginosa	Glicina	0	I-Valina	0	Beta alanina	5	9,4	8,3	7,5		6		6.6
P. aeruginosa	Glicina	0	I-Valina	0	Beta alanina	0	9,4	8,3	7,5	210000		2,1	
P. aeruginosa	Glicina	0	I-Valina	0	Beta alanina	0	9,4	8,3	7,5		301500		2.0
C. albicans	Glicina	2,5	I-Valina	2,5	Beta alanina	0	9,4	8,3	6,2	68500		1,3	
C. albicans	Glicina	2,5	I-Valina	2,5	Beta alanina	0	9,4	8,3	6,2		5000		2.5
C. albicans	Glicina	0	I-Valina	0	Beta alanina	5	9,4	8,3	6,2	8500		2,2	
C. albicans	Glicina	0	I-Valina	0	Beta alanina	5	9,4	8,3	6,2		965		3.2
C. albicans	Glicina	0	I-Valina	0	Beta alanina	0	9,4	8,3	6,2	151000		1,0	
C. albicans	Glicina	0	I-Valina	0	Beta alanina	0	9,4	8,3	6,2		73500		1.3
S. aureus	Glicina	0	I-Valina	0	Beta alanina	5	9,4	8,3	7,4	0		7,4	
S. aureus	Glicina	0	I-Valina	0	Beta alanina	5	9,4	8,3	7,4		0		7.4
S. aureus	Glicina	0	I-Valina	0	Beta alanina	0	9,4	8,3	7,4	6150000		0,6	
S. aureus	Glicina	0	I-Valina	0	Beta alanina	0	9,4	8,3	7,4		5050000		0,7

Organismo	Aminoácido 1	Concentração de AA 1	Aminoácido 2	Concentração de AA 2	Aminoácido 3	concentração de AA 3	MPO	GO	Inóculo de partida log 10	Viabilidade média CFU/mL 30 min	Viabilidade média CFU/mL 60 min	Log da redução 30 min	Log da redução 60 min
nome <i>S. aureus</i>	nome Glicina	mM 0	nome l-Valina	0	nome Beta alanina	mM 2,5	U/mL 4,7	U/mL 4,2	7,4	8100000		0,5	
<i>S. aureus</i>	Glicina	0	l-Valina	0	Beta alanina	2,5	4,7	4,2	7,4		0		7.4
<i>S. aureus</i>	Glicina	1,25	l-Valina	1,25	Beta alanina	0	4,7	4,2	7,4		0		7.4
P. aeruginosa	nenhum	0	nenhum	0	nenhum	0	0	0	7,5	28650000	28650000	0	0
C. albicans	nenhum	0	nenhum	0	nenhum	0	0	0	6,2	1400000	1455000	0	0
<i>S. aureus</i>	nenhum	0	nenhum	0	nenhum	0	0	0	7,4	23800000	23800000	0	0

[0095] Conforme mostrado na tabela 22, tanto a combinação de duas maneiras de l-valina e glicina quanto o aminoácido individual beta alanina significativamente melhoraram a atividade microbica do sistema de MPO na presença de sangue contra todos os organismos testados comparado ao desempenho do sistema de MPO na ausência de aminoácidos. No caso de *P. aeruginosa*, o efeito de melhora da combinação l-valina/glicina foi 2,1 logs em 60 minutos e a adição de beta alanina 5 mM sozinha ao sistema de MPO aumentou as atividades antibacterianas em 4,6 logs em 60 minutos. Contra *C. albicans*, a melhora na atividade microbica fornecida por l-valina/glicina foi 1,2 logs e 1,9 logs para beta alanina. A melhora mais drástica pode ser vista contra *S. aureus* do efeito de beta alanina no sistema de MPO, com um maior desempenho de 6,8 logs em 30 minutos. Adicionalmente, conforme pode-se ver na tabela 21, o aminoácido simples beta alanina e a combinação de dois aminoácidos de l-valina e glicina tanto em menores concentrações de aminoácido quanto de MPO, rendeu morte completa de *S. aureus* em 60 minutos.

Exemplo 10

Dados de teste *in vivo* para formulações MPO contendo várias combinações de aminoácidos e aditivos

[0096] Um modelo *in vivo* foi usado para testar a efetividade de várias combinações de aminoácidos na melhora da efetividade do sistema antimicrobiano MPO, como se segue:

[0097] Ratos Sprague-Dawley adultos machos foram usados em todos os estudos. Os ratos foram anestesiados e o cabelo das costas de cada animal foi removido com grampos elétricos e a pele foi preparada. Dois locais de ferida foram preparados nas costas de cada rato. O cabelo nas costas de cada animal foi removido com grampos elétricos e os animais anestesiados antes da pele foram preparados. Feridas de pele de espessura completa foram criadas levantando a pele e excisando uma área elíptica com tesouras usando técnica estéril, expondo a fáscia.

[0098] Um cilindro de poliestireno aberto (2,5 cm de diâmetro) foi colado a cada local de tratamento com cimento QuickTite® (Loctite Corp.). Cada cilindro formou uma câmara de teste de líquido apertado, cuja base foi a ferida. A fáscia exposta foi então

inoculada com 200 µL contendo cerca de 10^7 CFU de *S. aureus*. Quinze minutos depois a fásia inoculada foi tratada. Onde maior desafio biológico foi desejado, 30 µL de sangue de rato fresco total foram adicionados neste momento. Em seguida, 800 µL de uma formulação de teste foram adicionados no local resultando em um volume total de 1,0 mL por local de teste. As formulações de teste continham mieloperoxidase, vários aminoácidos, glicose oxidase e glicose nas quantidades apresentadas nas seguintes tabelas. Locais de controle não tinham nenhum p-MPO administrado e foram tratados com 800 µL de 0,9 % de salina estéril ou tampão. Ambos os locais em um único rato receberam o mesmo tratamento.

[0099] Seguindo um tempo de tratamento predeterminado com formulação p-MPO, um grande excesso de catalase foi adicionado a cada local de tratamento para interromper ainda a atividade microbicida. Isto destruiu qualquer peróxido de hidrogênio remanescente e/ou subsequentemente gerado pela formulação.

[0100] Os fluidos remanescentes no cilindro foram recuperados separadamente e a fásia subjacente foi assepticamente excisada, pesada e homogeneizada. Contagens de bactérias sobreviventes de amostras líquidas e tecidos excisados foram estimadas por cultura quantitativa. Resultados são reportados como Log da redução do inóculo inicial.

[0101] Usando os procedimentos anteriores, a efetividade *in vivo* na inibição de *S. aureus* (inóculo contendo 2×10^7 CFU de *S. aureus*) de uma exposição de 5 minutos a uma formulação de teste de mieloperoxidase melhorada da invenção compreendendo os aminoácidos l-alanina, l-prolina, e glicina foi determinada na presença de 3 % de sangue e sem sangue como uma média de 8 replicatas. Os resultados são mostrados na seguinte tabela 23.

Tabela 23

sangue %	AlamM	PromM	GlymM	GlumM	MPOµg/ mL	GOU/ mL	razão MPO/GO	Média de Viabilidade e CFU/mL	Log 10 (CFU+1)so- breviventes	Log da redução
0	1,4	1,5	1,5	150	200	13,3	15	11620	3,9	3,4
3	1,4	1,5	1,5	150	200	13,3	15	10290	4,0	3,3

[0102] Conforme mostrado na tabela 23, a formulação de teste de mieloperoxidase

melhorada de aminoácido desenvolve de uma maneira similar com e sem a presença de sangue adicionado em 5 minutos de exposição.

[0103] Usando o procedimento anterior, o efeito *in vivo* da concentração de glicose nas formulações de teste contendo concentrações variadas de l-alanina, l-prolina, e glicina foi determinado com um inóculo contendo 2×10^7 CFU de *S. aureus*, conforme mostrado na seguinte tabela 24 como uma média de 6 replicatas.

Tabela 24

sangue %	AlamM	PromM	GlymM	GlumM	MPO µg/mL	GOU/ mL	razão MPO/ GO	Média de Viabilidade CFU/mL	Log (CFU+1) sobreviventes	Log da Redução
0 %	4	5	5	150	200	13,3	15	1261	2,9	3,4
0 %	4	5	5	60	200	13,3	15	3952	3,2	3,0
0 %	0,4	0,5	0,5	150	200	13,3	15	4872	3,6	2,7
0 %	0,4	0,5	0,5	60	200	13,3	15	1313	3,0	3,2

[0104] Conforme mostrado, as diferenças observadas entre médias de desempenho não são estatisticamente diferentes para as condições testadas.

[0105] Seguindo os procedimentos anteriores, o efeito *in vivo* de variar concentrações l-alanina, l-prolina, e glicina na atividade microbica de formulações de teste contendo mieloperoxidase em 200 ou 400 µg/mL na presença de 6 % de sangue ou sem sangue foi determinado. Os resultados são mostrados na tabela 25.

Tabela 25

Organismo	Sangue	Pra	Gy	Glu	MPO	GO	MPO para GO	Log do inóculo de partida	Tempo de exposição ao organismo	N	Viabilidade média CFU/ml	Sobre-viventes Log 10 (CFU+1)	Log da redução
		mM	mM	mM	ug/ml	U/ml	razão		min		5 min	5 min	5 min
S.aureus	0%	5	5	150	200	13,3	15	6,3	15	4	3373	2,7	3,7
S.aureus	0%	10	10	150	200	13,3	15	6,3	15	8	3053	3,1	3,4
S.aureus	0%	5	5	150	400	26,7	15	6,3	15	4	3390	3,4	2,9
S.aureus	0%	20	20	150	400	26,7	15	6,3	15	8	416	2,4	3,9
S.aureus	6%	5	5	150	200	13,3	15	6,3	15	8	41309	4,0	2,7
S.aureus	6%	10	10	150	200	13,3	15	6,3	15	8	131082	4,5	1,9
S.aureus	6%	5	5	150	400	26,7	15	6,3	15	8	89595	5,0	1,3
S.aureus	6%	20	20	150	400	26,7	15	6,3	15	8	49079	4,6	1,9

[0106] Seguindo os procedimentos anteriores, o efeito *in vivo* da escalada das concentrações de l-alanina, l-prolina, e glicina em função da não escalada na atividade microbica de formulações de teste contendo mieloperoxidase em 200 ou 400 µg/mL foi determinado. Neste contexto, escalada refere-se à mudança proporcional da

concentração de aminoácido com relação à concentração de MPO. Os resultados são mostrados na tabela 26.

Tabela 26

Organismo	sangue	Ala	Pro	Gly	Glu	MPO	MPO para GO	Log do inóculo de partida	Tempo de exposição ao organismo	N	Viabilidade média CFU/ml	Sobre-viventes 10 (CFU+1)	Log da redução
		mM	mM	mM	mM	ug/ml	ratio		min		5 min	5 min	5 min
<i>S. aureus</i>	0	80	10,0	10,0	150	200	15	6,3	15	6	120167	5,1	12
<i>S. aureus</i>	0	40	5,0	5,0	150	200	15	6,3	15	6	11700	4,1	23
<i>S. aureus</i>	0	160	20,0	20,0	150	400	15	6,3	15	6	49162	4,7	17
<i>S. aureus</i>	0	4,0	5,0	5,0	150	400	15	6,3	15	6	4810	3,7	26

[0107] Conforme mostrado na tabela 26, a formulação contendo a menor concentração total de aminoácidos (4 mM de l-alanina, 4 mM de l-prolina, e 5 mM de glicina) desenvolve as melhores concentrações de mieloperoxidase tanto de 200 quanto de 400 µg/mL.

[0108] Seguindo os procedimentos anteriores, o efeito *in vivo* de formulações de teste contendo l-prolina, l-lisina e glicina, ou l-prolina e glicina, foi determinado e observou-se ser altamente efetivo na inibição de *S. aureus*, conforme mostrado na tabela 27.

Tabela 27

Organismo	sangue	Ala	Pro	Gly	Glu	MPO	MPO para GO	Log do inóculo de partida	Tempo de exposição ao organismo	N	Viabilidade média CFU/ml	Sobreviventes Log 10 (CFU+1)	Log da redução
		mM	mM	mM	mM	ug/ml	ratio		min		5 min	5 min	5 min
<i>S. aureus</i>	0	8,2	11,4	24,0	150	200	15	6,2	15	6	8	0,6	5,6
<i>S. aureus</i>	0	0,0	9,6	10,0	150	200	15	6,2	15	6	0	0	6,2

[0109] Conforme mostrado na tabela 27, formulações de teste contendo tanto l-prolina, l-lisina e glicina, quanto l-prolina e glicina melhoram o desempenho do sistema antimicrobiano da mieloperoxidase. Estas duas formulações em 200 µg/mL de MPO e uma razão de 15:1 MPO:GO deu morte completa em 30 minutos. Elas superam o desempenho das formulações tendo duas vezes o MPO e 20 vezes o GO na presença do então melhor aditivo de desempenho, 2 % de Triton X-200. Ver tabela 28 a seguir.

[0110] Seguindo os procedimentos anteriores, o efeito *in vivo* de uma formulação de teste contendo o único aminoácido l-alanina e 2 % de Triton X-200 em uma razão

1.5:1 de MPO:GO foi determinado. Os resultados são mostrados na tabela 28.

Tabela 28

Organismo	sangue	Ala	Pro	Gly	MPO	MPO para GO	Log do inóculo de partida	Tempo de exposição ao organismo	N	Viabilidade média CFU/ml	Sobreviventes Log 10 (CFU+1)	Log da redução
		mM	mM	mM	ug/ml	ratio		min		5 min	5 min	5 min
<i>S. aureus</i>	0	2%	90	0.2	400	1,5	5,9	15	6	313	2,2	3,7
<i>S. aureus</i>	3%	2%	90	0.2	400	1,5	5,9	15	6	356	2,5	3,4

[0111] A formulação contendo 2 % de Triton X-200 desempenha-se comparavelmente com e sem 3 % de sangue adicionado, mas com o único aminoácido l-alanina, a formulação de teste foi significativamente menos eficaz na inibição de *S. aureus* que as formulações contendo dois ou mais aminoácidos, conforme mostrado anteriormente. Este resultado é confirmado na tabelas 28 e 29 a seguir.

[0112] Seguindo os procedimentos anteriores, o efeito *in vivo* de uma formulação de teste contendo o único aminoácido l-alanina, 1 % de Triton X-200, uma razão 3:1 de MPO:GO, e uma concentração de glicose de 90 mM foi determinado. Os resultados, mostrados como a média de 6 replicatas, são mostrados na tabela 29.

Tabela 29

Aditivo	Ala	MPO	Log Inóculo de partida	Viabilidade de média CFU/mL	Log (CFU+1) Sobreviventes	Log da redução
Triton	mM	µg/mL	log 10	30 min	30 min	30 min
1 %	0,2	400	5,9	513	2,15	3,65

[0113] Seguindo os procedimentos anteriores, o efeito *in vivo* de uma formulação de teste contendo o único aminoácido l-alanina em uma razão 3:1 de MPO:GO foi determinado para três concentrações de MPO. Os resultados, mostrados como a média de 4 replicatas, são mostrados na tabela 30.

Tabela 30

Concentração de alanina	Glu	MPO	GO	MPO para GO	Log Inóculo de partida	Viabilidade média CFU/mL	Log 10 (CFU+1) Sobreviventes	Log da redução
mM	mM	µg/m	U/m	ratio	log 10	30 min	30 min	30 min
0,2	90	400	133	3	5,8	90	2,0	3,8

0,2	90	200	67	3	5,8	1112	3,0	2,8
0,2	90	100	33	3	5,8	13440	4,1	1,7
0	0	0	0	0	5,8	670000	5,8	0

[0114] Esta formulação rendeu um máximo de 3,8 Log da redução em 30 minutos a 400 µg/mL. Sem nenhum aditivo, o desempenho desta formulação de teste contendo o único aminoácido l-alanina é claramente limitado na presença de interferências biológicas.

[0115] O efeito do tempo *in vivo* de uma formulação de teste contendo l-prolina, glicina, e l-alanina em uma razão 15:1 de MPO:GO foi determinado para três concentrações de MPO. Os resultados de estudos tempo-morte são apresentados na figura 4. Os dados são apresentados como Log da redução₁₀ em CFU/mL em pontos de tempo designados. A solução de MPO melhorada demonstrou atividade bactericida contra *S. aureus* em todas as concentrações testadas. Neste teste o inóculo foi aumentado para 107 CFU. Os resultados, mostrados como uma média de 6 replicatas, são mostrados na tabela 31.

Tabela 31

Pro	Gly	Ala	MPO	GO	MPO /GO	Viabilidade média CFU/mL			Log 10 (CFU+1) Sobreviventes			Log da redução		
mM	mM	mM	µg/mL	U/mL	taxa	5 min	15 min	30 min	5 min	15 min	30 min	5 min	15 min	30 min
3,6	3,6	2,8	400	27	15	548	68	12	2,7	1,8	1,1	4,6	5,5	6,2
1,8	1,8	1,4	200	13	15	647	179	91	2,8	2,3	2,0	4,6	5,1	5,4
0,5	0,5	0,4	50	3	15	182	371							
						86	3	1284	4,3	3,6	3,1	3,1	3,7	4,2
			0	0	0			2210						
								0000			7,3			
			0	0	0			2335			7,4			
								0000						
			0	0	0			2000			7,3			
								0000						

[0116] Conforme mostrado na tabela 31, a formulação melhorada com aminoácido resultou em 3,1 Log da redução em 5 minutos usando 8 vezes menos MPO (50 µg/mL)

que a formulação com único aminoácido contendo l-alanina em 400 µg/mL a partir da tabela 30. A formulação melhorada com aminoácido rende atividade microbicida *in vivo* maior e mais rápida.

Exemplo 11

Dados de teste *in vitro* para formulações MPO contendo várias combinações de aminoácidos e aditivos

Cepas bacterianas.

[0117] Os organismos (530 cepas) selecionados para determinar o espectro de atividade de uma modalidade ilustrativa de uma composição da invenção tendo melhor atividade (“a solução de MPO melhorada”) para teste de MIC e MBC incluíram 140 estafilococosi (dos quais 70 resistentes à oxacilina, 5 resistentes vancomicina-intermediário, 4 Panton Valentine Leukocidin [PVL] positivo), 95 cepas de estreptococos β-hemolíticos, 55 enterococos (33 suscetíveis à vancomicina, 22 resistentes à vancomicina), 148 de Enterobacteriasceae (das quais 51 resistentes à ceftazidima), e 92 espécies não-Enterobacteriasceae (das quais 54 resistentes à ceftazidima). Todos os isolados clínicos foram obtidos a partir de coleta de cultura de Eurofins Medinet Anti-Infective Services (Herndon, Virginia, U.S.A.), e representam regiões geográficas diversas. Eles foram originalmente derivados de corpos de prova clínicos e identificados usando métodos microbiológicos padrão (ver tabela 33 a seguir para detalhes). *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *S. aureus* ATCC 29213, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, e *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 foram usados como cepas de controle de qualidade para a solução de MPO melhorada e agentes comparadores para validar o método de microdiluição de caldo do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, formally NCCLS) modificado.

Agentes antimicrobianos.

[0118] A solução de MPO melhorada é fornecida como duas soluções aquosas separadas, empacotadas em diferentes frascos, nomeadas Concentrado e Diluente. O concentrado contém p-MPO, glicose oxidase (GO), e aminoácidos em um veículo de formulação aquoso, que consiste em cloreto de sódio, polissorbato-80 (Tween-80)

em tampão de fosfato de sódio em água para injeção. O diluente contém dextrose (glicose) no mesmo veículo de formulação aquoso que o concentrado. Concentrado e diluente são misturados juntos para produzir o produto medicamentoso, a solução de MPO melhorada.

[0119] A composição quantitativa da solução de MPO melhorada é mostrada na tabela 32 em três concentrações de MPO. Conforme pode-se ver nesta tabela, a atividade da glicose oxidase e as concentrações de aminoácidos são diretamente proporcionais à concentração MPO. A concentração de dextrose é mantida entre 280 e 336 mM. Os ingredientes remanescentes são mantidos em concentrações constantes.

Tabela 32

Composição quantitativa da solução de MPO melhorada em três concentrações

MPO (GU/mL)	GO (U/mL)	L-Alanina (mM)	L-Prolina (mM)	Glicina (mM)	Dextros e (mM)	Cloreto de sódio (mM)	Polissorbato 80 (% w/v)	Tampão de pH fosfato de sódio (mM)	
150	26,67	2,8	3,6	3,6	300	150	0,02	20	6,5
75	13,33	1,4	1,8	1,8	280	150	0,02	20	6,5
37,5	6,67	0,7	0,9	0,9	308	150	0,02	20	6,5

Note: concentração MPO é expressa como unidades guaiacol (GU) por mL

[0120] A solução de MPO melhorada é composta de duas soluções aquosas designadas como solução de concentrado e solução de diluente que são misturadas antes do uso. A solução de concentrado contém MPO, GO, cloreto de sódio, e agente específico que melhora as atividades antimicrobiana em um veículo de formulação aquoso. A solução diluente contém glicose (dextrose) no mesmo veículo de formulação aquoso que a solução de concentrado. As soluções de concentrado e diluente são misturadas juntas em proporções variadas antes do uso para produzir o produto medicamentoso, a solução de MPO melhorada, em uma concentração desejada. A concentração da solução de MPO melhorada é expressa como microgramas de MPO por mililitro ($\mu\text{g/mL}$) e também é expressa como unidades Guaiacol de atividade de MPO por mililitro (GU/mL). A conversão de μg para GU de MPO é baseada em 0,375 GU/ μg de MPO. Agentes de controle de qualidade incluíram

cefazolina e gentamicina obtidos da Sigma Chemical (St. Louis, Missouri, U.S.A.) e comparadores selecionados usados foram gentamicina (Sigma Chemical) e mupirocina lítio da GlaxoSmithKline, Inc. (Philadelphia, Pennsylvania, U.S.A.). Todas as soluções de estoque foram preparadas imediatamente antes do teste. As faixas de concentração foram 0,004 a 8 µg/mL para a solução de MPO melhorada, 0,06 a 64 µg/mL para cefazolina, 0,25 a 16 µg/mL para gentamicina, e 0,12 a 16 µg/mL para mupirocina. Antimicrobianos usados para estudos de interação medicamentosa foram como se segue: cefazolina, ceftriaxona, ceftazidima, ciprofloxacina, doxiciclina, gentamicina, imipenem, e vancomicina da GlaxoSmithKline, Inc. (Philadelphia, Pennsylvania, U.S.A.).

Teste de suscetibilidade antimicrobiana.

[0121] Microdiluições de caldo e métodos para determinar a atividade bactericida foram desenvolvidos usando os procedimentos recomendados pelo CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute, "Methods for Determining Bactericide Activity of Antimicrobial Agents; linha de base aprovada, documento CLSI M26-A, CLSI, Wayne, Pennsylvania, U.S.A., Setembro 1999; Clinical and Laboratory Standards Institute, Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacterias that Grow Aerobically; padrão aprovado, 7ª ed., documento CLSI M7-A7, CLSI, Wayne, Pennsylvania, U.S.A. Janeiro 2006). Modificações foram feitas para o método de microdiluição de caldo padrão para acomodar a atividade *in vitro* rápida da solução de MPO melhorada da forma descrita a seguir. Cada agente antimicrobiano e solução de concentrado foi diluída em concentração em dobro de caldo de Mueller-Hinton ajustado para o cátion (CAMHB) e dispensado em bandejas de microdiluição. Todos os estreptococos β-hemolíticos foram testados em concentração em dobro de CAMHB suplementado com 5 % de sangue de cavalo lisado. Isolados foram preparados suspendendo várias colônias (quatro a seis) de uma cultura de toda a noite em ágar de soja de tripticase (TSA) com 5 % de sangue de ovelha em salina estéril e a densidade ajustada para um padrão 0,5 McFarland ($\sim 10^8$ CFU/mL). Suspensões de bactérias padronizadas foram ainda diluídas em solução diluente de concentração dobrada de maneira tal que aproximadamente 5×10^5 CFU/mL fosse misturado com

diluições de medicamento em série. A adição da solução diluente à solução de concentrado ativa o sistema enzimático que, por sua vez, exerce seu rápido modo de ação. As bandejas de microdiluição foram incubadas em ar ambiente a 35 °C por 18 a 24 hora. O MIC foi determinado observando a menor concentração de agente antimicrobiano que completamente inibiu o crescimento do organismo.

[0122] Concentrações bactericidas mínimas (MBCs) foram determinadas primeiramente realizando o método de microdiluição de caldo modificado descrito anteriormente para a solução de MPO melhorada MIC. A partir da bandeja de microdiluição, o último medicamento contendo poço com crescimento visível e cada poço claro daí em diante foram amostrados. Uma amostra de 10 µL por poço foi plaqueada em TSA com 5 % de sangue de ovelha e incubada em ar ambiente por 24 hora e examinada para o crescimento e contagens de colônia. O MBC foi determinado como a menor concentração antimicrobiana que demonstrou uma redução > 99,9 % nas unidades formadoras de colônia relativas ao tamanho do inóculo de partida.

Parâmetros de controle de qualidade.

[0123] Faixas de MIC foram estabilizadas para a solução de MPO melhorada testando mais de 20 replicatas de um lote da solução de MPO melhorada contra *S. aureus* ATCC 29213 e *E. coli* ATCC 25922. Parâmetros de controle de qualidade foram então determinados para a solução de MPO melhorada testando três lotes da solução de concentrado usada para a preparação da solução final de formulação de MPO melhorada. O teste foi realizado em duplicata contra *S. aureus* ATCC 29213 e *E. coli* ATCC 25922. Os efeitos de modificar o teste de microdiluição de caldo padrão também foram avaliados com antibióticos com limites de controle de qualidade conhecidos para validar o método de microdiluição de caldo de CLSI.

[0124] Os resultados são conhecidos na seguinte tabela 33, onde a solução de formulação de MPO melhorada é designada “E-MPO.”

TABELA 33

Atividade *in vitro* da solução de MPO melhorada e outros antimicrobianos comparadores contra um painel de isolados clínicos que consiste em 530 enterococos, estafilococos, estreptococos, enterobactérias, espécies não

enterobactérias

Organismo(no, de isolados testados)	Composto	MIC µg/mL		Faixa ^a
		50 %	90 %	
Enterococcus faecalis(33)	E-MPO	0,5	0,5	0,12-0,5
	Mupirocina	32	>32	8->32
Enterococcus faecium(22)	E-MPO	0,12	0,12	0,06-0,12
	Mupirocina	0,25	0,25	0,06-0,5
<i>Staphylococcus aureus</i> (109)	E-MPO	0,015	0,03	0,008-0,06
	Mupirocina	0,06	0,12	<0,03->32
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (31)	E-MPO	0,03	0,03	0,015-0,06
	Mupirocina	0,12	>32	<0,03->32
<i>Streptococcus agalactiae</i> (34)	E-MPO	0,5	0,5	0,12-1
	Mupirocina	0,5	0,5	0,12-2
<i>Streptococcus</i> GrupoC(8)	E-MPO	n/a ^b	n/a	0,5-1
	Mupirocina	n/a	n/a	0,06-0,5
<i>Streptococcus</i> GrupoF(2)	E-MPO	n/a	n/a	1-1
	Mupirocina	n/a	n/a	0,25-0,25
<i>Streptococcus</i> GrupoG(18)	E-MPO	0,5	0,5	0,25-1
	Mupirocina	0,12	0,12	0,06-0,5
<i>Streptococcus pyogenes</i> (33)	E-MPO	0,5	0,5	0,12-0,5
	Mupirocina	0,12	0,25	0,06-0,5
<i>Citrobacter freundii</i> (20)	E-MPO	0,6	0,12	0,03-0,12
	Gentamicina	2	4	2->32
<i>Enterobacter cloacae</i> (21)	E-MPO	0,12	0,12	0,06-0,12
	Gentamicina	2	8	1->32
<i>Escherichia coli</i> (52)	E-MPO	0,25	0,25	0,12-0,5
	Gentamicina	4	>32	2->32
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (31)	E-MPO	0,25	0,25	0,06-0,25
	Gentamicina	4	>32	2->32
<i>Proteus mirabilis</i> (24)	E-MPO	0,06	0,06	0,03-0,06
	Gentamicina	8	8	2->32
<i>Acinetobacter</i> spp,(29)	E-MPO	0,12	0,12	0,06-0,12
	Gentamicina	8	>32	0,5->32
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (53)	E-MPO	0,06	0,06	0,03-0,12
	Gentamicina	4	16	1->32
<i>Aeromonas hydrophila</i> (5)	E-MPO	n/a	n/a	0,015-0,03
	Gentamicina	n/a	n/a	1-4
<i>Pasteurella multocida</i> (5)	E-MPO	n/a	n/a	<0,004
	Gentamicina	n/a	n/a	2-16

^a Faixa de valores MIC para todas as cepas testadas

^b n/a, não aplicável, número total de isolados menor que 10

[0125] A modificação do método de microdiluição de caldo CLSI para testar a solução de MPO melhorada fornece um procedimento eficiente para a caracterização e determinação do produto do espectro de atividade. Os resultados de teste da

solução de MPO melhorada e medicamentos comparadores tópicos selecionados contra 530 isolados clínicos de bactéria mostrados na tabela 33 demonstraram que a solução de MPO melhorada apresenta potente atividade de amplo espectro contra espécies Gram-positivas e Gram-negativas testadas. Entre os enterococos, os MICs da solução de MPO melhorada nos quais 50 % e 90 % de isolados foram inibidos (valores MIC₅₀ e MIC₉₀) foram 0,5 µg/mL para *E. faecalis* e 0,12 µg/mL para *E. faecium*. Nenhuma diferença foi notada na atividade da solução de MPO melhorada contra enterococos suscetíveis à vancomicina ou resistentes à vancomicina (VRE). Com base nos MIC₉₀, a solução de MPO melhorada foi > 64 vezes mais ativa contra *E. faecalis* que mupirocina. Entre os cocos Gram-positivos, a solução de MPO melhorada foi mais ativa contra o estafilococos. Todos os MICs para *S. aureus* e *S. epidermidis*, incluindo MRSA e MRSE, foram < 0,06 µg/mL, com um MIC₉₀ de 0,0 µg/mL. A potência da solução de MPO melhorada foi comparável para cepas tanto resistentes à oxacilina quanto suscetíveis à oxacilina. A solução de MPO melhorada foi altamente ativa contra cepas PVL positivas e VISA/VRSA que demonstram atividade equivalente comparada aos tipos selvagem. Os valores MIC para isolados PVL positivos foram na faixa de todas as cepas de *S. aureus* testadas. Entre os estreptococos, a solução de MPO melhorada foi altamente ativa mesmo na presença de CAMHB suplementado com 5 % de sangue de cavalo lisado. O MIC₉₀ para *S. agalactiae* e *S. pyogenes* foram ambos 0,5 µg/mL. Para os grupos C, F, e G de estreptococos, os MICs foram < 1 µg/mL com uma faixa MIC de 0,25 a 1 µg/mL. Com a exceção de *S. agalactiae* e *S. pyogenes*, a solução de MPO melhorada demonstrou maior potência *in vitro* que mupirocina por MIC₉₀. As faixas de MIC para mupirocina contra *E. faecalis*, *S. aureus*, e *S. epidermidis* se estenderam para > 32 µg/mL.

[0126] No geral, a solução de MPO melhorada foi altamente ativa contra as espécies de Enterobacteriaceae (Tabela 33) com um MIC₉₀ de 0,25 µg/mL e uma faixa de MIC de 0,03 a 0,25 µg/mL. Entre os organismos Gram-negativos não fermentativos, os MICs foram < 0,12 µg/mL e apresentaram uma faixa de atividade estreita (< 0,004 a 0,12 µg/mL). A solução de MPO melhorada apresentou excelente atividade contra *P. aeruginosa* (MIC₉₀, 0,06 µg/mL) e espécies de *Acinetobacter*

(MIC₉₀, 0,12 µg/mL), que são frequentemente organismos difíceis de tratar. Nenhuma diferença foi notada na atividade da solução de MPO melhorada contra cepas suscetíveis à ceftazidima e resistentes à ceftazidima. Com base no MIC₉₀, a solução de MPO melhorada foi 32 a > 256 vezes mais ativa que gentamicina para todos os organismos gram negativos testados.

[0127] Os resultados de teste MIC e MBC de isolados clínicos de patógenos comumente associados à pele e infecções da estrutura da pele são resumidos na tabela 34.

TABELA 34

Concentrações inibitórias e bactericidas mínimas da solução de MPO melhorada contra isolados clínicos associados à pele e infecções da estrutura da pele

Isolado(no. testado)	MIC µg/mL ^a			MBC µg/mL		
	MIC ₅₀	MIC ₉₀	Faixa ^a	MBC ₅₀	MBC ₉₀	Faixa
<i>E. faecalis</i> (7)	n/a ^b	n/a	0,12-0,5	n/a	n/a	0,5-2
<i>S. aureus</i> (16)	0,015	0,03	0,015-0,03	0,015	0,03	0,015-0,03
<i>S. agalactiae</i> (13)	0,5	0,5	0,12-0,5	0,5	0,5	0,12-1
<i>S. pyogenes</i> (20)	0,5		0,5 0,12-0,5	0,5	1	0,12-1
<i>E. coli</i> (5)	n/a	n/a	0,12-0,25	n/a	n/a	0,12-1
<i>P. aeruginosa</i> (5)	n/a	n/a	0,03-0,06	n/a	n/a	0,06-0,5

^a Faixa de valores MIC para todas as cepas testadas

^b n/a, não aplicável, número total de isolados menor que 10

[0128] A potente atividade bactericida da solução de MPO melhorada foi confirmada pela faixa de MBCs (0,015 a 2 µg/mL). A solução de MPO melhorada foi mais ativa contra todos os isolados de *S. aureus* com valores MIC e MBC idênticos (MIC₅₀ e MBC₅₀ = 0,015 µg/mL; MIC₉₀ e MBC₉₀ = 0,03 µg/mL).

[0129] Métodos a base de ágar não foram aplicáveis para comparação em virtude das propriedades interferentes potenciais do meio. Entretanto, o efeito de mudar as condições de teste de suscetibilidade de caldo padronizadas nos MICs de cefazolina, gentamicina, e mupirocina foi estimado e validado comparando os resultados, tal como o método de microdiluição de caldo referência de CLSI. Os parâmetros de teste *in vitro* de métodos de MIC tanto modificado quanto referência foram similares com

relação ao meio (CAMHB), pH (7,2), inóculo final (5×10^5 CFU/mL), e ambiente de incubação (35 °C, ar ambiente). Mudando para uma preparação de inóculo em solução diluente não mostrou nenhum efeito significativo nos resultados esperados MIC para antibióticos comparadores (Clinical Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; seventeenth informational supplement. Documento CLSI M100-S17. Wayne, Pennsylvania, U.S.A., Janeiro 2007). MICs de cefazolina e mupirocina para *S. aureus* ATCC 29213 e MICs de cefazolina e gentamicina para *E. coli* ATCC 25922 foram nas faixas de controle de qualidade previamente publicadas (documento CLSI M100-S17, supra). A faixa de controle de qualidade determinada para a solução de MPO melhorada para *S. aureus* ATCC 29212 e *E. coli* ATCC 25922 foi 0,010 a 0,03 µg/mL e 0,15 a 0,5 µg/mL, respectivamente. Mais de 20 replicatas foram desenvolvidas com estes organismos e os resultados foram na faixa de controle de qualidade estabelecida. Os resultados do teste de três lotes de solução de concentrado em duplicata demonstraram que todos os valores MIC estão na faixa de controle de qualidade estabelecida.

[0130] Conforme mostrado anteriormente, a atividade *in vitro* comparativa para a solução de MPO melhorada foi equivalente ou maior que a de mupirocina contra organismos Gram-positivos e foi várias vezes maior que a de gentamicina para organismos Gram-negativos. Nenhuma diferença foi observada na suscetibilidade à solução de MPO melhorada entre cepas resistentes e suscetíveis estudadas. De importância, estudos MBC mostraram que a solução de MPO melhorada apresenta atividade bactericida contra *S. aureus* e *S. pyogenes*, dois dos patógenos mais comuns associados à infecções de pele sérias.

Estudos tempo-morte.

[0131] O efeito bactericida da solução de MPO melhorada foi estimado por dois métodos: um método de neutralização de suspensão, A.M., et al., e o EBGA Network 2005. Teste *in vitro* da atividade fungicida de biocidas contra *Aspergillus fumigatus*. J. Med. Microbiol. 54:955-957) e por uma adaptação do ensaio tempo-morte de microdiluição CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for determining bactericide activity of antimicrobials agents; linha de base aprovada;

documento CLSI M26-A, CLSI, Wayne, Pennsylvania, U.S.A., Setembro 1999). O método de neutralização de suspensão foi usado para estimar a taxa rápida de atividade bactericida da solução de MPO melhorada e o efeito na sua atividade biológica por sangue como um exemplo de material de interferência. O método CLSI também foi usado para estimar a atividade microbicida da solução de MPO melhorada por uma adaptação de teste padronizado.

[0132] Os organismos de teste usados para os estudos de tempo-morte de neutralização de suspensão foram *S. aureus* ATCC 6538 e *E. coli* ATCC 25922. Suspensões de bactérias foram preparadas pelo método de agitação do frasco para alcançar crescimento de fase tardia log a precoce estacionária. Um volume de 1,0 mL de cultura foi precipitado e ressuspenso em salina estéril para $\sim 10^9$ CFU/mL. O ensaio *in vitro* foi conduzido em frascos de cintilação de vidro de 20 mL estéreis. Os frascos de reação de tempo-morte foram preparados para conter 1,0 mL da quantidade apropriada de solução diluente mais 15 mL de inóculo seguido pela adição de solução de concentrado. A suspensão final continha $\sim 10^7$ CFU/mL e as contagens de colônia reais foram confirmadas por diluições em série. Concentrações da solução de MPO melhorada, mais suspensão do organismo, em uma concentração final de 0,1, 0,3, 1, 3, 6, e 9 µg/mL foram testadas (ver figuras 1A e 1B). Frascos de tratamento foram incubados a temperatura ambiente. A reação enzimática foi então interrompida imediatamente antes da quantificação de bactérias pela adição de 100 µL de uma solução 1 % de catalase estéril a 1, 2, 5, 15, 30, 60, e 120 minutos. Uma cultura de controle sem nenhuma solução de concentrado adicionada foi incubada por 30 minutos a temperatura ambiente e culturas quantitativas realizadas. Uma amostra de 100 µL foi removida de cada frasco de reação em cada ponto de tempo especificado e diluições em série preparadas em salina estéril. Um volume de 100 µL de cada diluição foi aplicado para duplicar TSA com 5 % de placas de sangue de ovelha e espalhados sobre a superfície com um laço de inoculação estéril. Depois da incubação durante toda a noite a 35 °C, as colônias foram contadas e as contagens viáveis foram calculadas. O efeito bactericida da solução de MPO melhorada foi definida como uma redução de contagens viáveis com relação ao controle de crescimento maior que 99,9

% ou 3 log₁₀ CFU/mL.

[0133] De maneira a estimar o potencial do material de interferência na atividade da solução de MPO melhorada, estudos tempo-morte foram realizados na presença de sangue total humano e rato, recém coletado em tubos heparinizados no dia do experimento, usando o método de neutralização de suspensão previamente descrito. A solução de MPO melhorada a 50, 100, e 200 µg/mL foi testada contra ~10⁷ CFU/mL de inóculo de *S. aureus* ATCC 6538 e *P. aeruginosa* ATCC 27317 na presença de 3 % de sangue humano e a atividade bactericida interrompida a 5, 15, 30, e 60 minutos (ver figuras 2A e 2B). A solução de MPO melhorada a 400, 800, e 1,600 µg/mL também foi testada contra ~10⁷ CFU/mL de inóculo de *S. aureus* ATCC 6538 na presença de 6, 12, e 24 % de sangue de rato e a atividade microbicida interrompida a 2, 5, e 15 minutos, da forma descrita anteriormente. Duas ou 3 replicatas foram obtidas para cada condição de teste.

[0134] Organismos de teste usados para os estudos tempo-morte pelo método CLSI modificado incluíram *S. aureus* ATCC 29213, *E. faecalis* ATCC 29212, *E. coli* ATCC 25922, e *P. aeruginosa* ATCC 27853. Várias colônias (quatro a seis), cresceram em TSA com 5 % de sangue de ovelha durante toda a noite, foram suspensas em 3 mL de água deionizada e suspensões foram ajustadas para um padrão 0,5 McFarland (~1 X 10⁸ CFU/mL). Esta suspensão foi então diluída 1:10 em CAMHB pré-aquecido e incubada 1-4 horas em um incubador agitador a 37 °C. Quando a cultura alcançou sua fase de crescimento logarítmica e a turbidez aproximada de um padrão 0,5 McFarland, 100 µL foi removido e adicionado a 10 mL de solução diluente para atingir uma concentração resultante de ~5 X 10⁶ CFU/mL. Esta suspensão constituiu o inóculo para os estudos tempo-morte. Os poços de reação tempo-morte foram preparados para conter 100 µL de solução de concentrado preparada em CAMHB e inóculo (50 µL de solução de concentrado e 50 µL de inóculo preparado em solução diluente). As concentrações finais de MPO na solução de concentrado foram diluições de quatro vezes da maior concentração--0, 0,06, 0,25, 1, 4, 16, 64, e 256 µg/mL. Um poço de reação idêntico contendo caldo e inóculo, mas nenhuma solução de concentrado constituiu o controle de crescimento de cultura. A concentração celular

de bactérias final foi $\sim 5 \times 10^5$ CFU/mL. As bandejas de microdiluição foram incubadas a 35 °C em ar ambiente e 10 µL de uma solução 1 % de catalase foram adicionados a cada poço tempo-morte a 0, 2, 5, 15, 30, e 60 minutos e 4 e 24 hora para interromper a ação antimicrobiana da solução de MPO melhorada. Amostras em série foram obtidas para quantificação. Uma amostra de 100 µL foi removida de cada poço em cada ponto de tempo e diluições em série preparadas em salina estéril. Um volume de 100 µL de cada diluição foi aplicado para duplicar TSA com 5 % de placas de sangue de ovelha e espalhado sobre a superfície com um laço de inoculação estéril. As placas no tempo zero funcionaram como as placas de pureza. Depois da incubação durante toda a noite a 35 °C, colônias foram manualmente contadas e contagens viáveis calculadas. A atividade bactericida foi definida como uma redução de 99,9 % ou 3 log₁₀ CFU/mL na contagem de colônias do inóculo inicial.

[0135] Os resultados dos estudos tempo-morte pelo método de neutralização de suspensão são apresentados na figura 1. Os dados são apresentados como Log da redução₁₀ em CFU com relação ao inóculo inicial em pontos de tempo predeterminados para concentrações escaladas da solução de MPO melhorada testada. A solução de MPO melhorada demonstrou atividade bactericida muito rápida tanto contra *S. aureus* quanto *E. coli*. A taxa de morte foi maior nas maiores concentrações da solução de MPO melhorada e a extensão de morte maior com maior tempo de exposição. Para *S. aureus*, a solução de MPO melhorada foi bactericida rendendo mais que 3 log₁₀ de redução no inóculo inicial (7,2 log₁₀ CFU/mL) depois de 2 minutos de exposição a 6 e 9 µg/mL. Nenhum crescimento detectável foi observado em 5 minutos de exposição a 3, 6, e 9 µg/mL e a 1 µg/mL, mais que 3 log₁₀ de redução foi alcançada em 5 minutos sem nenhum crescimento detectável a 15 minutos de exposição. Nenhum crescimento detectável foi observado depois de 30 e 120 minutos de exposição à solução de MPO melhorada a 0,3 e 0,1 µg/mL, respectivamente. A solução de MPO melhorada demonstrou um padrão de tempo-morte similar para *E. coli*. Nenhum crescimento detectável foi observado em 2 minutos de exposição à concentrações de solução de MPO melhorada maior ou igual a 3 µg/mL. Depois de 2 minutos de exposição à solução de MPO melhorada a 1 µg/mL, mais que 3 log₁₀ de

redução no inóculo inicial ($6,8 \log_{10}$ CFU/mL) foi alcançada. Nenhum crescimento detectável foi observado a $1,0 \mu\text{g/mL}$ em 5 minutos de tratamento. Nas menores concentrações de solução de MPO melhorada, $0,3$ e $0,1 \mu\text{g/mL}$, nenhum crescimento detectável foi observado depois de 15 e 60 minutos de exposição, respectivamente.

[0136] A dependência tempo e concentração da atividade microbica da solução de MPO melhorada ainda foi presente na presença de 3 % de sangue humano ou rato total. Nenhuma diferença significativa foi observada entre ambas as fontes de sangue. A solução de MPO melhorada em $200 \mu\text{g/mL}$, a maior concentração de MPO testada na presença de 3 % de sangue humano, não rendeu nenhum sobrevivente detectável de *S. aureus* e *P. aeruginosa* em um inóculo inicial de $7,15 \log_{10}$ CFU/mL em menos que 5 minutos. A solução de MPO melhorada em uma concentração de $100 \mu\text{g/mL}$ alcançou mais que $4 \log_{10}$ de redução e $5 \log_{10}$ de redução em 5 minutos para *P. aeruginosa* e *S. aureus*, respectivamente. Em $50 \mu\text{g/mL}$, a menor concentração da solução de MPO melhorada testada, atividade bactericida foi observada em todos os pontos de tempo para ambos os organismos (FIGURA 2).

[0137] O efeito da interferência de sangue na atividade antimicrobiana da solução de MPO melhorada foi superado aumentando a concentração de MPO. Em concentrações de solução de MPO melhorada de 400 e $800 \mu\text{g/mL}$, uma redução de $7,10 \log_{10}$ CFU/mL de *S. aureus* foi alcançada sem nenhum crescimento detectável em 2 minutos na presença de 6 e 12 % de sangue de rato. Na presença de 24 % de sangue de rato, a solução de MPO melhorada rendeu mais que $4 \log_{10}$ de redução a 400 e $800 \mu\text{g/mL}$, e nenhum sobrevivente detectável a $1.600 \mu\text{g/mL}$ em 2 minutos.

[0138] Os resultados de estudos tempo-morte pelo método de microdiluição de caldo CLSI modificado são apresentados nas figuras 3A-3D. Os dados são apresentados como $\log_{10}$ de redução em CFU/mL em pontos de tempo designados. A solução de MPO melhorada demonstrou atividade bactericida contra *S. aureus* em todas as concentrações testadas. Contra *E. coli*, a solução de MPO melhorada foi bactericida em todas as concentrações testadas exceto $0,06 \mu\text{g/mL}$, que é 4 vezes abaixo de seu MIC. Igualmente para *E. faecalis* e *P. aeruginosa*, a solução de MPO melhorada foi bactericida quando testada em concentrações acima da MIC. As MICs

para *E. faecalis* e *P. aeruginosa* foram 0,5 e 0,06 µg/mL, respectivamente. Padrões comparáveis de atividade microbicida foram observados com todos os quatro organismos; a taxa de morte foi maior em maiores concentrações da solução de MPO melhorada e a extensão de morte maior com maior tempo de exposição. Em concentrações de solução de MPO melhorada de 256 e 16 µg/mL, nenhum crescimento detectável foi observado para todos os organismos em 30 minutos e 4 horas, respectivamente. Depois de 4 hora de exposição à solução de MPO melhorada, mais que 3 log₁₀ de redução foi alcançada a 16 µg/mL para *E. faecalis*, a 4,0 µg/mL para *S. aureus*, e a 1,0 µg/mL para *E. coli* e *P. aeruginosa*. A atividade microbicida mais rápida observada usando o método de neutralização de suspensão pode ser atribuída a um efeito do meio usado no método de microdiluição de caldo CLSI.

[0139] Estudos de tempo-morte realizados pelo método de neutralização de suspensão demonstraram a taxa e a extensão da atividade bactericida da solução de MPO melhorada. Dependendo da concentração, a atividade de morte foi rápida resultando na redução de 6 a 7 log₁₀ CFU/mL tanto de *S. aureus* quanto de *E. coli* em 1 minuto. A atividade bactericida rápida em conjunto com estudos de quimioluminescência mostrando produção de oxigênio singlete (dados não mostrados) suporta o modo proposto de ação em que oxigênio singlete é o principal agente de morte. A natureza altamente eletrofílica do oxigênio singlete possibilita que ele oxide regiões de alta densidade de elétron em moléculas biológicas alvo que resultam na destruição da integridade da membrana e/ou a inibição oxidativa das enzimas requeridas para a função metabólica. Ao contrário dos antibióticos tradicionais, a solução de MPO melhorada não parece depender do metabolismo celular do microrganismo para inibição do crescimento celular ou morte celular.

[0140] Uma vez que nenhuma metodologia padronizada para teste de tempo-morte da solução de MPO melhorada existiu, tanto o método de neutralização de suspensão quanto de microdiluição de caldo CLSI foram usados para confirmar que independente do organismo testado a atividade microbicida da solução de MPO melhorada depende do tempo e concentração. Estudos de tempo-morte pelo método de neutralização de suspensão contra membros ou o gênero *Candida*, *Aspergillus*,

Bacillus e *Mycobacterium* com formulações protótipo também demonstraram atividade microbicida dependente do tempo e concentração, sem nenhum sobrevivente detectável observado com o tempo.

Interações antimicrobianas.

[0141] Três cepas clínicas resistentes a múltiplos medicamentos foram usadas para testar a solução de MPO melhorada e combinações de antibióticos por um método de titulação de tabuleiro usando bandejas de microdiluição de 96 poços (Moody, J., "Synergism Testing: Broth Microdilution Checkerboard and Broth Macrodilution Methods," pp. 5.12.1-5.12.23, em H.D. Isenberg (ed.), *Clinical Microbiology Procedures Handbook*, 2ª ed., 2004, ASM Press, Washington, DC., U.S.A.). Os organismos de teste incluíram cepa Mu50 de *S. aureus* intermediária à vancomicina (NARSA isolado NRS1) (Hiramatsu, K.H., et al., "Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Clinical Strain With Reduced Vancomycin Susceptibility," *J. Antimicrob. Chemother.* 40:135-136, 1997), *E. coli* (Eurofins 1075701), e *P. aeruginosa* (Eurofins 1445536). Solução de concentrado e antibióticos selecionados foram testados pelo método de microdiluição de caldo com CAMHB e diluídos em série (duas vezes) sozinho e em combinação. Cada poço do tabuleiro continha uma única combinação das duas concentrações de medicamento e duas linhas continham um medicamento sozinho. Faixas de concentração de medicamento para a solução de MPO melhorada foram 0,0005 a 0,5 µg/mL contra *S. aureus*, 0,008 a 8 µg/mL contra *E. coli*, e 0,001 a 1,0 µg/mL contra *P. aeruginosa*. Faixas de concentração de antibióticos foram uma-quatro ou menos as duas vezes seu respectivo MIC contra o isolado testado. O inóculo foi preparado em solução diluente da forma descrita anteriormente, adicionado a cada poço das bandejas de microdiluição e incubados em ar ambiente a 35 °C. A MIC de cada agente antimicrobiano sozinho e em combinação foi determinada como a menor concentração(s) sem nenhum crescimento visivelmente detectável depois de 18 a 24 hora. Os índices de concentração inibitórios fracionários (FICI) foram interpretados como se segue: <0,5, sinergia; >0,5 a 4,0, nenhuma interação; e >4,0, antagonismo (Odds, F.C., "Synergy, Antagonism, and What the Checkerboard Puts Between Them," *J. Antimicrob. Chemother.* 52:1,

2003).

[0142] Nos estudos de desenvolvimento de resistência pelo método de microdiluição de caldo, os resultados de MIC para *S. aureus*, *E. faecalis*, e *P. aeruginosa* permaneceram inalterados depois da passagem em concentrações sub-inibitórias da solução de MPO melhorada por 21 dias. As MICs para três cepas clínicas de *E. coli* mostraram um aumento de >4 diluições em dobro depois de somente uma passagem do dia 1 a dia 2, e as MICs permaneceram elevadas por 21 dias. A alteração em MICs sobre o intervalo do estudo foi 0,12 a 8 µg/mL, 0,25 a 8 µg/mL, e 0,5 a 8 µg/mL para cada respectiva cepa. Depois de três passagens de cada uma destas cepas nas placas de ágar sem medicamento, as MICs no reteste não foram estáveis e diminuíram de volta para <2 diluições em dobro da MIC da linha de base inicial.

Desenvolvimento de resistência.

[0143] Taxas mutacionais de múltiplas etapas foram determinadas por dois métodos *in vitro*. Cepas passadas diariamente em concentrações sub-inibitórias de uma formulação protótipo foram testadas pelo método de neutralização de suspensão (Millichap, J., et al., "Selection of Enterococcus faecium Strains With Stabela and Unstabela Resistance to the Streptogramin RP 59500 Using Stepwise *In vitro* Exposition," Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 25:15-20, 1996; Tortorano, A. M., et al., "*In vitro* Testing of Fungicidal Activity of Biocides Against *Aspergillus fumigatus*," J. Med. Microbiol. 54:955-957, 2005) e a solução de MPO melhorada foi testada em painéis de microdiluição de caldo (Prataman, J. A., et al., "Resistance Studies With Daptomicina," Antimicrob. Agents Chemother. 45:1799-1802, 2001). Três cepas de teste usadas pelo método de neutralização de suspensão incluíram *S. aureus* ATCC 6538, *P. aeruginosa* ATCC 15442, e uma cepa clínica de *E. faecium*, resistente à vancomicina. Suspensões de organismo foram preparadas conforme previamente descrito para uma concentração alvo final de 10^7 CFU/mL. Para o tratamento inicial, um volume de 1,0 mL da solução de MPO melhorada, a 0,1 ou 0,3 µg/mL, mais suspensão de organismo foram adicionados a cada frasco de tratamento. Os frascos foram incubados a 37 °C em um banho seco. Depois de 60 minutos, 100 µL de catalase foram então adicionados cada frasco para interromper a reação e os

conteúdos totais de cada frasco foram cultivados no meio de isolamento. Em uma tentativa de induzir resistência estável, sobreviventes da placa de isolamento tratada com solução de MPO melhorada de maior concentração depois de 48 hora de incubação foram usados para preparar o inóculo para a passagem seguinte. Cada experimento sequencial foi realizado na solução de MPO melhorada de maior concentração anterior que suporta o crescimento e em aproximadamente duas vezes a concentração. Passagens continuaram por 25 a 30 dias consecutivos usando todas as três cepas.

[0144] Para determinar se repetidas exposições de organismos a concentrações sub-inibitórias da solução de MPO melhorada resultaram no rápido desenvolvimento de resistência, um método de passagem em série foi usado nas bandejas de microdiluição (Prataman, J.A., et al., "Resistance Studies With Daptomicyn," Antimicrob. Agents Chemother. 45:1799-1802, 2001). Dez cepas de teste incluíram *S. aureus* (ATCC 29213, Eurofins 1288199), *E. faecalis* (ATCC 29212, ATCC 51299), *E. coli* (ATCC 25922, Eurofins 1075701, Eurofins 1337451, Eurofins 1337019), e *P. aeruginosa* (ATCC 27853, Eurofins 1077561). MICs de linha de base para a solução de MPO melhorada foram determinados da forma descrita anteriormente. Inóculo para testes de MIC subsequentes foram preparados a partir do poço que contém a maior concentração da solução de MPO melhorada que permitiu o crescimento. Um painel fresco contendo solução de concentrado serialmente diluída em CAMHB foi reinoculado com a suspensão nova preparada na solução diluente. Passagens continuaram por 21 dias consecutivos e as MICs da solução de MPO melhorada foram determinadas seguindo cada passagem de série. Subsequentemente, se as MICs mostraram uma maior estabilidade, estudos foram realizados por três passagens em série nas placas de ágar sem medicamento (TSA) nas quais MICs foram novamente determinadas.

[0145] Nos estudos de desenvolvimento de resistência pelo método de microdiluição de caldo, os resultados de MIC para *S. aureus*, *E. faecalis*, e *P. aeruginosa* permaneceram inalterados depois da passagem em concentrações sub-inibitórias da solução de MPO melhorada por 21 dias. As MICs para três cepas clínicas

de *E. coli* mostraram um aumento de > 4 diluições dobradas depois de somente uma passagem do dia 1 ao dia 2, e as MICs permaneceram elevadas por 21 dias. A mudança nas MICs sobre o intervalo do estudo foi 0,12 a 8 µg/mL, 0,25 a 8 µg/mL, e 0,5 a 8 µg/mL para cada respectiva cepa. Depois de três passagens de cada uma destas cepas nas placas de ágar sem medicamento, as MICs no reteste não foram estáveis e diminuíram novamente para < 2 diluições dobradas da MIC de linha de base inicial.

[0146] Os estudos de desenvolvimento de resistência mostraram que a solução de MPO melhorada e uma formulação de protótipo similar não seleciona para resistência em *S. aureus*, espécies de enterococos, *P. aeruginosa*, e *E. coli*. Embora três cepas clínicas de *E. coli* tenham demonstrado MICs elevadas quando expostas à solução de MPO melhorada, o aumento nas MICs não foram estáveis e foi perdido mediante subsequente passagem no meio sem antibiótico. Estas descobertas, juntamente com rápida taxa de morte e modo de ação da solução de MPO melhorada, sugerem que a exposição ao produto medicamentoso tem um potencial muito baixo para desenvolvimento de resistência.

[0147] Os estudos de interação medicamentosa não demonstraram nenhum antagonismo na atividade dos antibióticos convencionais testados. Isto é importante para aplicações em que a solução de MPO melhorada pode ser usada em conjunto com terapias de antibiótico convencionais. A solução de MPO melhorada também exerce sua atividade microbida potente na presença de sangue total, um atributo requerido e no tratamento de feridas cirúrgicas e traumáticas.

[0148] Conforme mostrado anteriormente, as composições de mieloperoxidase da invenção melhoradas fornecem atividade bactericida rápida potente e de amplo espectro e contra organismos clínicos e de referência incluindo cepas suscetíveis ao medicamento, resistentes ao medicamento e resistentes a múltiplos medicamentos. Sua baixa propensão de selecionar resistência e falta de interação medicamento-medimento torna as composições melhoradas da invenção ideais para uso anti-infeccioso local/tópico para o tratamento e prevenção de infecções em uma ampla variedade de aplicações *in vivo*.

Exemplo 12

Teste *in vivo* de formulações de MPO melhoradas

[0149] De maneira a avaliar a solução de MPO melhorada do exemplo 11 em um ajuste *in vivo*, três modelos de ferida distintos foram empregados. Estes modelos incluíram uma ferida de excisão de espessura completa, uma ferida de espessura parcial e ferida de incisão de profundidade.

Agente antibacteriano.

[0150] A solução de MPO melhorada é composta de duas soluções aquosas designadas como solução de concentrado e solução diluente que são misturadas antes do uso. A solução de concentrado contém MPO, GO, cloreto de sódio, e agentes que melhoram a atividade antimicrobiana específicos em um veículo de formulação aquoso. A solução diluente contém glicose (dextrose) no mesmo veículo de formulação aquoso que a solução de concentrado. As soluções de concentrado e diluente são misturadas junto em proporções variadas antes do uso para produzir a solução de MPO melhorada de produto medicamentosos em uma concentração desejada. A concentração da solução de MPO melhorada é expressa como unidades de Guaiacol de MPO por mililitro (GU/mL) e também é expressa como microgramas de MPO por mililitro. A conversão de GU a µg de MPO é baseada em 0,375 GU/µg de MPO.

Cepas bacterianas

[0151] *Staphylococcus aureus* ® 136, uma cepa clínica de MRSA, *S. aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27317 foram obtidos da Ricerca LLC, (Concord, Ohio, U.S.A.) ou da American Type Culture Collection.

Modelos de ferida animal experimentais

[0152] Ratos Sprague-Dawley machos adultos (aproximadamente 250 gramas) obtidos da Charles River Laboratories, Portage, Michigan, U.S.A., foram usados em cada modelo de ferida. Animais foram alojados em gaiolas individuais e a eles dado alimento e água *ad libitum* durante todo o estudo. Para todos os modelos de ferida, dois locais de ferida foram preparados em cada rato. Antes da ferida, o cabelo do local

relevante foi retirado com grampos elétricos. Os animais foram anestesiados usando isoflurano (1-5 % em O₂ ou meio de máscara facial). Buprenorfina (0,05 a 0,25 mg/kg IP) foi administrado para dor pós-operatória a cada 12 horas quando os animais não foram mantidos em anestesia para a duração do estudo (mais que 5 horas). Todos os procedimentos em animal experimentais foram realizados de acordo com as bases do Institutional Animal Care and Use Committees at Ricerca LLC.

(i) Modelo de ferida de excisão de espessura completa

[0153] Feridas experimentais foram induzidas por uma modificação do método reportado por Saymen, G.D., et al., "Infected Surface Wound: A Experimental Model and a Method for the Quantitation of Bacterias in Infected Tissues," Applied Microbiology 23(3):509-514, 1972. *S. aureus* ® 136, *S. aureus* ATCC 6538, ou *E. coli* ATCC 25922 resistentes à metilicina foram usados como organismos de desafio. Os organismos foram preparados como uma suspensão de crescimento log tardio crescida em caldo de soja de tripticase. Células foram coletadas a partir de um frasco de agitação, centrifugadas e ressuspensas em salina tamponada para render uma suspensão 9 log₁₀ CFU/mL. Este estoque foi subsequentemente diluído em tampão para dar uma suspensão de trabalho de aproximadamente 7,5 log₁₀ CFU/mL e usado como o inóculo. Duas feridas de pele foram criadas em cada rato levantando a pele frouxa e excisando uma área elíptica de pele com extratores usando técnica estéril e expondo aproximadamente 1 a 2 cm² de fáscia. Três ratos com duas feridas cada foram usados em todos os grupos de tratamento. Um cilindro de poliestireno de 2,5 cm de diâmetro aberto foi colado na pele em volta de cada local excisado com cimento Quick Tite® (Loctite Corp.) similar ao procedimento reportado por Breuing, et. al. (Breuing, K., "Wound Fluid Bacterial Levels Exceed Tissue Bacterial Counts in Controlled Porcine Partial-Thickness Burn Infections," Plast. Reconstr. Surg. 111:781-788, 2003). Cada cilindro formou uma câmara de teste de líquido, cuja base foi a fáscia exposta. A ferida exposta foi inoculada depositando 200 µL contendo 10⁷ CFU da suspensão de bactérias diretamente na fáscia. Este volume de inóculo foi suficiente para completamente cobrir a fáscia exposta. Depois da aplicação, permitiu-se que o inóculo permanecesse na fáscia por 15 minutos antes do tratamento. Um volume de

800 µL da solução de MPO melhorada foi adicionado ao local resultando em um volume total de 1 mL por local de teste. Locais de controle, onde 800 µL de 0,9 % de salina estéril ou tampão foram adicionados, não tiveram nenhuma solução de MPO melhorada administrada. Ambos os locais da ferida em um único rato receberam o tratamento idêntico. Depois de 5-, 15-, 30-, ou 60-minutos de tratamento com a solução de MPO melhorada, um grande excesso de solução catalase foi adicionado a cada local para destruir qualquer enzima remanescente e/ou peróxido de hidrogênio subsequentemente gerado, inibindo assim atividade microbicida adicional. O líquido no cilindro foi recuperado e a fáscia adjacente asépticamente foi excisada, pesada e homogeneizada. Contagem de bactérias sobreviventes na amostra de líquido recuperado e homogenato de tecido para cada local foram separadamente estimadas por cultura quantitativa usando diluições de 10 vezes em série plaqueadas em ágar de soja de tripticase (TSA) e incubadas a 37 °C durante toda a noite. O desempenho de tratamento foi calculado como a soma de contagens do líquido recuperado e homogenato de tecido para cada ferida é reportado como a média de todas as amostras em cada grupo de tratamento.

[0154] Para o modelo de ferida de espessura completa, sobreviventes $\log_{10}(\text{CFU}+1)$ foram calculados a partir dos dados brutos. Os intervalos de confiança de 95 % nas médias foram calculados a partir do erro padrão da média e o valor-t que reflete o número apropriado de graus de liberdade. A atividade da solução de MPO melhorada apresentou dependência do tempo e concentração em três diferentes concentrações de p-MPO, 18,75, 75, e 150 GU MPO/mL, em um modelo de excisão de espessura completa. Conforme mostrado na figura 4, a solução de MPO melhorada contendo 75 GU MPO/mL e 150 GU MPO/mL rendeu morte quase completa de um inóculo de *S. aureus* ATCC 6538 maior que $7 \log_{10}$ em 15 minutos. O tratamento com a solução de MPO melhorada em ambas as concentrações resultou em uma redução maior que $4 \log_{10}$ CFU em 5 minutos. Quando a concentração foi diminuída para 18,75 GU MPO/mL, redução de aproximadamente $3 \log_{10}$ CFU ainda foi alcançada em 5 minutos. O número de CFU log por ferida recuperado da solução de MPO melhorada de feridas tratadas foi estatisticamente diferente ($p < 0,05$) tanto do inóculo ($7,3 \log_{10}$)

quanto dos controles de infecção não tratados ($7,25 \log_{10}$) para todas as concentrações e pontos de tempo testados.

[0155] O efeito da solução de MPO melhorada nas feridas inoculadas com *E. coli* ATCC 25922 é mostrado na figura 6. Conforme observado com *S. aureus*, contagens bacterianas diminuíram rapidamente em 5 minutos depois do tratamento com a solução de MPO melhorada. Morte quase completa do inóculo aplicado ($7,2 \log_{10}$) foi observada em 5 minutos em feridas tratadas com a solução de MPO melhorada contendo 150 GU MPO/mL.

[0156] Estes resultados confirmaram a atividade da solução de MPO melhorada contra *S. aureus* e *E. coli* rápida e dependente do tempo e concentração em um ambiente compreendendo exudatos de tecido e ferida.

[0157] Nenhuma diferença significativa foi vista entre a atividade bactericida da solução de MPO melhorada contra MRSA e MSSA nas feridas, 15 minutos depois do tratamento (FIGURA 5). Em ambos os casos, a recuperação de organismos viáveis dos grupos de tratamento indicou uma diminuição aproximada de $5 \log_{10}$ no CFU do controle do inóculo. A extensão de morte depois de 15 minutos de exposição ao tratamento foi comparada ao inóculo, uma vez que os resultados anteriores não indicaram nenhuma diminuição ou aumento apreciável na viabilidade bacteriana por até uma hora depois da inoculação bacteriana do local de ferida (figura 5 e figura 6). Estas descobertas corroboram com a atividade *in vitro* da solução de MPO melhorada descrita no exemplo 11 contra organismos tanto resistentes quanto suscetíveis à meticilina (MIC_{90} , $0,03 \mu\text{g}$ MPO/mL).

(ii) Modelo de ferida de espessura parcial

[0158] *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 foi usado como o organismo de desafio. O inóculo foi preparado da forma descrita anteriormente para a ferida de excisão de espessura completa. Feridas experimentais consistiram em dois locais de 10 mm x 7 mm na linha mediana nas costas de cada rato, um local sendo para frente próximo dos ombros e um local sendo caudal. A ferida foi alcançada por abrasão controlada da pele. A pele foi pinchada usando os dedos para formar uma dobra e raspada com uma passagem forte de 10 vezes. Isto produziu uma ferida com uma

ligeira depressão (isto é, cerca de 1/3 a 1/2 a espessura da pele) com algum sangramento menor, que foi seca por manchamento. Testes foram organizados em 4 a 5 grupos de tratamento por experimento com cada tratamento administrado a 3 ratos. Cada um dos ratos teve 2 feridas dando 6 locais de ferida por grupo experimental. Vinte cinco microlitros de um inóculo 10^6 CFU/mL foram dispensados no centro da ferida exposta e raspado por 10 segundos sobre toda a área da ferida usando uma espátula de polipropileno estéril. Vinte minutos depois da aplicação do inóculo, 1 mL tanto da solução de MPO melhorada quanto de placebo foi esfregado com um haste de algodão por 30 segundos no local da ferida. Uma gaze saturada contendo 3 mL da solução de MPO melhorada ou placebo foi então aplicada a cada ferida e a ferida coberta com Tegaderm. Todos os locais tratados foram coletados a 3 ou 24 horas pós-inoculação e cultivados para organismos viáveis. O Tegaderm e gaze foram removidos e toda a ferida foi excisada para a fáscia, colocada em um tubo estéril tarado, pesado e 1 mL de salina 0,9 % fria estéril adicionada a cada tubo. O tecido foi então homogeneizado e contagem de bactérias sobreviventes no homogenato de tecido

recuperado para cada local foi estimada por cultura quantitativa usando diluições de 10 vezes em série, plaqueado em TSA e incubado a 37 °C durante toda a noite. Os desempenhos do tratamento são reportados como a média das contagens da amostra de tecido recuperada para cada grupo de tratamento.

[0159] A média de sobreviventes $\log_{10}(\text{CFU}+1)$ foi calculada a partir dos dados brutos. Os intervalos de confiança de 95 % nas médias foram calculados a partir do erro padrão da média e o valor-t que reflete o número apropriado de graus de liberdade. A extensão da atividade da solução de MPO melhorada (E-MPO) a 75, 150, ou 300 GU MPO/mL foi estimada em 3 e 24 horas depois do tratamento no modelo de ferida de espessura parcial conforme mostrado na seguinte tabela 35. Esta tabela apresenta os sobreviventes de $\log_{10}$ CFU médios isolados 3 e 24 horas depois de vários tratamentos. O intervalo de confiança de 95 % de cada é mostrado para cada grupo de tratamento. Diferenças significativas foram observadas entre os grupos tratados com controle do placebo e solução de MPO melhorada com relação ao

número de CFU de *S. aureus* viável recuperado das amostras de tecido.

Tabela 35

Modelo de excisão de espessura parcial - Atividade microbica *in vivo* de solução de MPO melhorada contra *S. aureus* ATCC 6538

Grupo de tratamento	Sobreviventes Log ₁₀ (CFU+1) ± intervalo de confiança de 95 %
3 horas depois de tratamento único	
controle de infecção – não tratado	4,2 ± 0,068
Solução E-MPO– 150 GU/mL	0,8 ± 0,614*
24 horas depois de tratamento único	
tratado com placebo	5,9 ± 0,143
Solução E-MPO– 150 GU/mL	4,8 ± 0,807*
24 horas depois de tratamento único	
tratado com placebo	6,2 ± 0,697
Solução E-MPO– 75 GU/mL	5,3 ± 0,997
Solução E-MPO– 300 GU/mL	4,4 ± 0,637

*representa grupos de tratamento que são estatisticamente diferentes do placebo ou controles de infecção.

[0160] Depois de uma única aplicação da solução de MPO melhorada a 150 GU/mL, o número médio de organismos isolados das feridas foi aproximadamente 0,8 log₁₀ CFU (~ 6 CFU) a 3 hora. Isto representou uma redução maior que 3 log₁₀ comparada ao controle de infecção.

[0161] Aplicações únicas da solução de MPO melhorada contendo MPO a 75, 150, e 300 GU/mL foram examinadas para determinar uma resposta da dose e foram comparadas ao controle com placebo a 24 horas. O tratamento usando a solução de MPO melhorada a 75 GU/mL reduziu o número de organismos recuperados para 5,3 log₁₀ CFU. Entretanto, esta redução não foi estatisticamente significativa comparada ao grupo tratado com placebo com uma recuperação de 6,2 log₁₀ CFU (p = 0,15). Depois de uma única aplicação da solução de MPO melhorada a 150 GU/mL, o número de organismos recuperado das feridas foi aproximadamente 1,1 log₁₀ CFU menor que o controle de placebo (p < 0,01). Feridas tratadas com a solução de MPO melhorada a 300 GU/mL continham aproximadamente 4,4 log₁₀ CFU comparado a 6,2 log₁₀ CFU recuperados do grupo de controle tratado com placebo (p = 0,01). Estas

descobertas indicam que há uma resposta de dose em 24 horas para a solução de MPO melhorada contra *S. aureus* e um efeito prolongado na redução do nível de contaminação das feridas depois de um único tratamento.

(iii) Modelo de ferida de incisão profunda

[0162] *S. aureus* ® 136 ou *Pseudomonas aeruginosa* resistentes à metilicina foram usados como os organismos de desafio e o inóculo foi preparado da forma descrita anteriormente. Feridas consistiram em uma incisão em ambas as coxas de cada rato quando MRSA é usado e uma incisão somente em uma das coxas para *P. aeruginosa*. Para cada perna, a espinha, o trocanter maior, e os joelhos foram marcados e uma linha dos joelhos até o trocanter maior, em direção da espinha traçados. Foi feita uma incisão na pele usando excisores aproximadamente em 3 cm ao longo da linha centrada no trocanter maior e a pele indeterminada nas bordas a aproximadamente 1 cm. A incisão profunda foi feita abaixo do nível do fêmur inferiormente, e nos músculos do glúteo superiormente. A profundidade da ferida foi confirmada tocando a haste do fêmur usando fórceps. Testes com *S. aureus* foram organizados em 3 grupos de tratamento por experimento; a solução de MPO melhorada, tratamento com salina e controles não tratados. Dez ratos foram usados para comparar a solução de MPO melhorada à salina, com uma perna recebendo a solução de MPO melhorada e a outra perna sendo tratada com salina. Adicionalmente, 5 animais receberam a solução de MPO melhorada na perna esquerda e 5 animais receberam-na na perna direita. Dois ratos receberam inoculação e nenhum tratamento, resultando em 4 feridas para os controles não tratados.

[0163] Testes com *P. aeruginosa* também foram organizados em 3 grupos de tratamento por experimento com 4 ratos usados para a solução de MPO melhorada, tratamentos de salina, e controles não tratados, respectivamente. Cada um dos ratos tinha uma única ferida dando 4 locais de ferida por grupo experimental. Um inóculo de 100 µL de uma suspensão de organismos de 10⁹ CFU/mL foi dispensado na profundidade da ferida usando uma pipeta estéril. Sessenta (60) minutos depois da inoculação com *S. aureus*, as feridas foram tratadas tanto uma vez com 2,5 mL da solução de MPO melhorada a 75 GU/mL quanto duas vezes, 15 minutos depois, com

10 mL da solução de MPO melhorada a 300 GU/mL (ver tabela 36). Sessenta (60) minutos depois da inoculação com *P. aeruginosa*, as feridas foram tratadas duas vezes, 15 minutos depois, com 5 mL da solução de MPO melhorada a 300 GU/mL (ver tabela 37). Todos os tratamentos com solução de MPO melhorada e salina foram aplicados usando uma seringa com uma agulha de gavagem. Feridas tratadas foram fechadas usando dois grampos de pele imediatamente depois do segundo tratamento, enquanto que as feridas de controle não tratadas foram fechadas imediatamente depois da inoculação das bactérias. A avaliação da ferida foi realizada no dia 4. Uma avaliação de cada ferida foi realizada e uma pontuação de infectividade determinada. Duas métricas chave de infecção foram usadas para determinar a pontuação de infectividade, especificamente a área de dureza e a presença ou ausência de purulência. A área de dureza foi medida em mm quadrados usando um paquímetro e a presença de purulência foi determinada abrindo cirurgicamente cada ferida. A pontuação de infectividade foi determinada pelo valor da área de dureza e se purulência presente na pontuação de infectividade foi aumentada em 25 %. Não houve nenhuma redução da pontuação de infectividade se purulência estivesse ausente.

[0164] Pontuações de infectividade média foram determinadas a partir dos dados agrupados de múltiplos experimentos por PROC MIXED (SAS, SAS Institute, Cary, North Carolina, U.S.A.), usando um modelo com feridas alojadas em ratos, e ratos alojados nos experimentos. Tanto os ratos quanto os experimentos são considerados variáveis aleatórias neste modelo. Comparações em pares de valores médios foram feitas usando o teste-t. O efeito da solução de MPO melhorada na progressão da infecção pela cepa resistente à meticilina de *S. aureus* ou *Pseudomonas aeruginosa* foi determinado em 4 dias pós-inoculação no modelo de ferida de incisão na coxa profunda. Conforme mostrado na seguinte tabela 36, nenhum dos grupos tratados com a solução de MPO melhorada (E-MPO) foi estatisticamente diferente um do outro. O * representa grupos de tratamento que são estatisticamente diferentes do placebo e o # representa grupos de tratamento que são estatisticamente diferentes dos controles de infecção.

[0165] A pontuação de infectividade para os grupos tratados com solução de MPO

melhorada foi comparada à pontuação de infectividade dos grupos de salina e não tratados em 4 dias pós-tratamento, conforme mostrado nas seguintes tabelas 36 e 37.

Tabela 36

Modelo de ferida de incisão na coxa profunda -Atividade microbicida *in vivo* de solução de MPO melhorada contra *S. aureus*

Tratamento ^a	N	taxa de infectividade
não tratado	44	303*
Salina - 2x10 mL	28	195#
Salina - 1x2,5 mL	30	216#
Solução E-MPO (300 GU/mL - 2x10 mL)	31	110*#
Solução E-MPO (75 GU/mL - 1x2,5 mL)	10	84*#

N é o número de pernas por grupo de tratamento.

*representa grupos de tratamento que são estatisticamente diferentes do placebo.

representa grupos de tratamento que são estatisticamente diferentes dos controles de infecção.

Tabela 37

Modelo de ferida de incisão da coxa profunda -Atividade microbicida *in vivo* de solução de MPO melhorada contra *P. aeruginosa*

Tratamento ^a	N	Taxa de infectividade
não tratado	4	1032*
Salina - 2x5 mL	4	705#
solução de MPO melhorada(300 GU/mL - 2x5 mL)	4	86*#

N é o número de pernas por grupo de tratamento.

*representa grupos de tratamento que são estatisticamente diferentes do placebo.

representa grupos de tratamento que são estatisticamente diferentes dos controles de infecção.

[0166] Animais inoculados com MRSA foram tratados tanto duas vezes com 10 mL da solução de MPO melhorada a 300 GU/mL quanto uma vez com 2,5 mL da solução de MPO melhorada a 75 GU/mL. Examinações das feridas 4 dias pós-tratamento indicaram uma maior incidência de presença de purulência para todas as feridas não tratadas (59 %) comparado às feridas tratadas com salina (25 %) e os

grupos de tratamento com solução de MPO melhorada (10 % tanto a 300 GU/mL quanto a 75 GU/mL).

[0167] A pontuação de infectividade média de 110 para animais tratados duas vezes com 10 mL da solução de MPO melhorada a 300 GU/mL, foi estatisticamente diferente (valor- $p < 0,05$) dos dois tratamentos com salina e os grupos não tratados tendo pontuações de infectividade de 216, 195, e 303, respectivamente (Tabela 36). Nenhuma diferença estatística ($p > 0,05$) pode ser diferenciada entre a alta concentração/alto volume e baixa concentração/baixo volume dos tratamentos com solução de MPO melhorada.

[0168] Conforme também mostrado na tabela 36, a diminuição simultânea da concentração e volume da solução de MPO melhorada, de 10 mL aplicados duas vezes a 300 GU/mL a 2,5 mL aplicados uma vez a 75 GU/mL, resultou em uma pontuação de infectividade de 84 que é estatisticamente diferente (valor- $p < 0,05$) das pontuações de infectividade de 216, 195, e 303 obtidas para animais tratados com 2,5 mL de salina aplicada uma vez, animais tratados com 10 mL de salina aplicada duas vezes e os animais não tratados, respectivamente. Nenhuma diferença estatística ($p > 0,05$) pode ser diferenciada entre a alta concentração/alto volume e baixa concentração/baixo volume dos tratamentos com solução de MPO melhorada.

[0169] A mudança no organismo de *S. aureus* para *P. aeruginosa* levou a um aumento na severidade do modelo e letalidade quando ambas as pernas foram inoculadas (dados não mostrados), daí em diante uma única perna por animal foi usada quando animais foram inoculados com *P. aeruginosa*. Adicionalmente, uma vez que *P. aeruginosa* pode se tornar sistêmico depois da administração localizada, usando as duas pernas de animais para diferentes tratamentos foi imprudente e provável de levar a resultados não claros. Conforme mostrado na tabela 37, a média de pontuação de infectividade de 86 para animais tratados duas vezes com 5 mL da solução de MPO melhorada a 300 GU/mL foi estatisticamente diferente (valor $p < 0,05$) tanto do grupo tratado com salina ($n = 705$) quanto do grupo não tratado (1032). A observação no dia 4 levou a uma maior incidência de purulência para todas as feridas não tratadas (50 %) comparado às feridas tratadas com salina (25 %) e os grupos de

tratamento da solução de MPO melhorada (0 %).

[0170] Especificamente, estes resultados demonstram a atividade microbicida dependente da dose e tempo da solução de MPO melhorada contra *S. aureus* e *E. coli* no modelo de infecção da ferida de espessura completa. A solução de MPO melhorada foi eficaz na redução de cargas bacterianas na presença de exudatos de ferida depois de uma única aplicação, e importantemente, sem a adição de antibióticos convencionalmente usados. Este efeito microbicida é rápido e traduz em recuperações bacterianas reduzidas comparado aos controles de placebo ou não tratados, mesmo 24 horas depois do tratamento com a solução de MPO melhorada.

[0171] Em resumo, estes resultados microbicidas acoplados a uma atividade bactericida rápida, de amplo espectro, de baixa propensão para selecionar resistência, e falta de interação medicamento-medicamento vista nos estudos *in vitro*, fortemente suportam o uso das composições da invenção para o tratamento, prevenção e redução de infecções *in vivo*.

[0172] Embora modalidades ilustrativas tenham sido ilustradas e descritas, percebe-se que várias mudanças podem ser feitas nelas sem fugir do espírito e escopo da invenção.

REIVINDICAÇÕES

1. Composição para inibir o crescimento de microrganismos gram-positivos e gram-negativos, caracterizada pelo fato de que compreende mieloperoxidase, glicose oxidase, glicina, L-alanina e L-prolina e em que a composição compreende de 10µg/ml a 5.000 µg/ml da mieloperoxidase, de 1 U/ml a 500 U/ml da glicose oxidase, e 0,3mM a 50 mM de cada de glicina, L-alanina e L-prolina.

2. Composição de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que ainda compreende peróxido de hidrogênio ou uma fonte de peróxido de hidrogênio.

3. Composição de acordo com a reivindicação 2, caracterizada pelo fato de que a fonte de peróxido de hidrogênio é um oxidase produzindo peróxido que produz peróxido de hidrogênio na presença de um substrato para a oxidase.

4. Composição de acordo com a reivindicação 3, caracterizada pelo fato de que compreende uma oxidase produzindo peróxido eficaz para gerar de 100 pmol a 50 µmol peróxido por mL por minuto quando na presença de um substrato para a oxidase.

5. Uso da composição definida na reivindicação 1, caracterizado pelo fato de ser na fabricação de um medicamento para o tratamento de uma infecção em um indivíduo humano ou animal, em que os aminoácidos funcionam em combinação, na presença de peróxido de hidrogênio e cloreto ou brometo, para melhorar a atividade microbica da mieloperoxidase.

6. Uso de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que a composição ainda compreende peróxido de hidrogênio ou uma fonte de peróxido de hidrogênio.

7. Uso de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que a fonte de peróxido de hidrogênio compreende um oxidase produzindo peróxido que produz peróxido de hidrogênio na presença de um substrato para a oxidase.

8. Uso de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que a composição compreende um oxidase produzindo peróxido eficaz para gerar de 100

pmol a 50 µmol peróxido por mL por minuto quando na presença de um substrato para a oxidase.

9. Uso de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que a composição compreende 10 a 5.000 µg/mL de mieloperoxidase, de 0,3 a 50 mM de glicina, de 0,3 a 50 mM de L-alanina, de 0,3 a 50 mM de L-prolina, e de 1 a 500 U/mL de glicose oxidase.

10. Uso de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que o indivíduo humano ou animal sofre de uma infecção microbiana de gengivas, olhos, ouvidos, pele, tecido mole, feridas, áreas vaginais, áreas da virilha, escaras ou áreas de queimadura.

11. Uso de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que a infecção é uma infecção polimicrobiana.

12. Uso da composição definida na reivindicação 1, caracterizado pelo fato de ser na fabricação de um medicamento para matar ou inibir o crescimento de microrganismos suscetíveis, em que os aminoácidos funcionam em combinação para melhorar a atividade microbicida da mieloperoxidase.

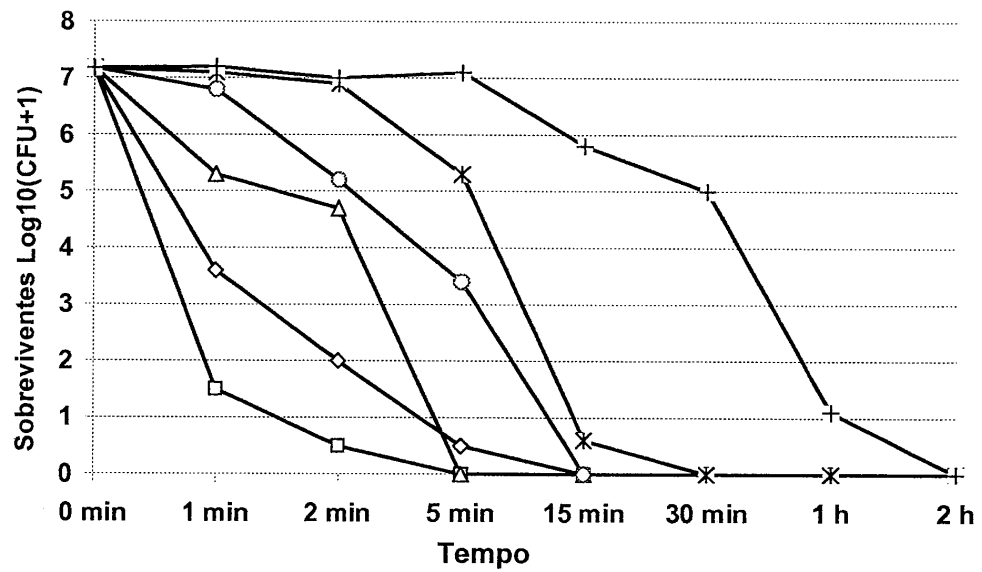
Staphylococcus aureus ATCC 6538

Fig. 1A

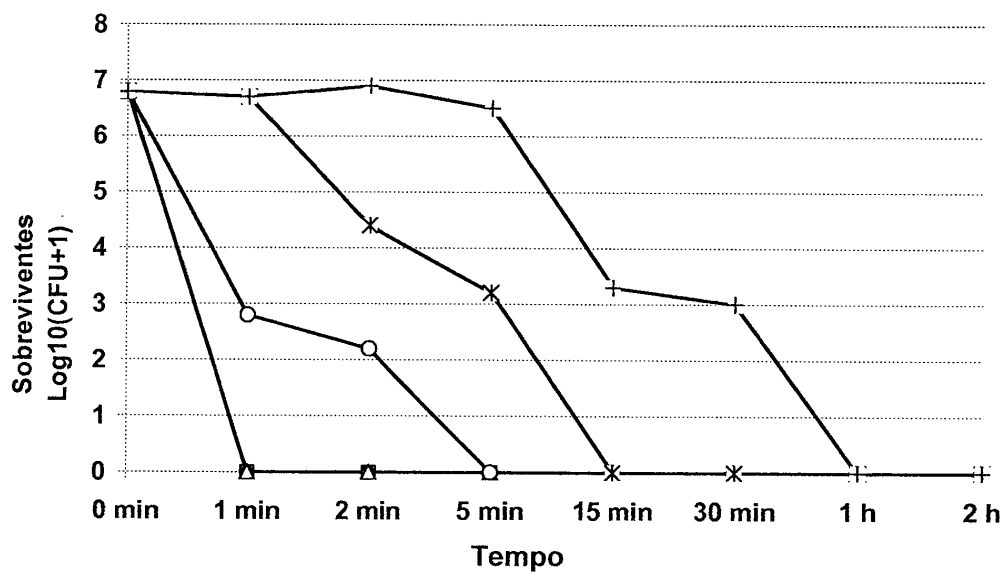
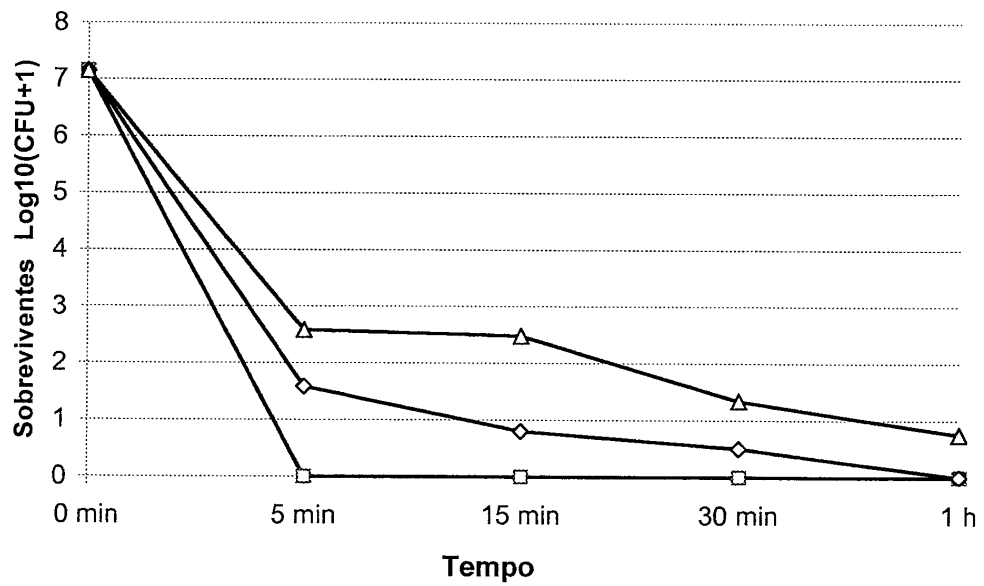
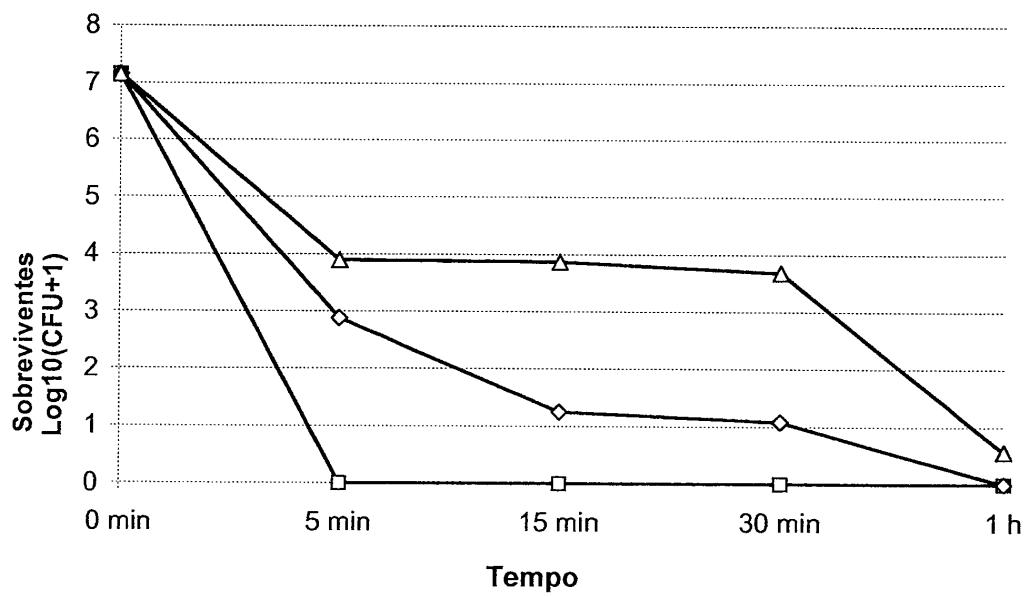
Escherichia coli ATCC 25922

Fig. 1B

Staphylococcus aureus* ATCC 6538****Fig. 2A**Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27317****Fig. 2B**

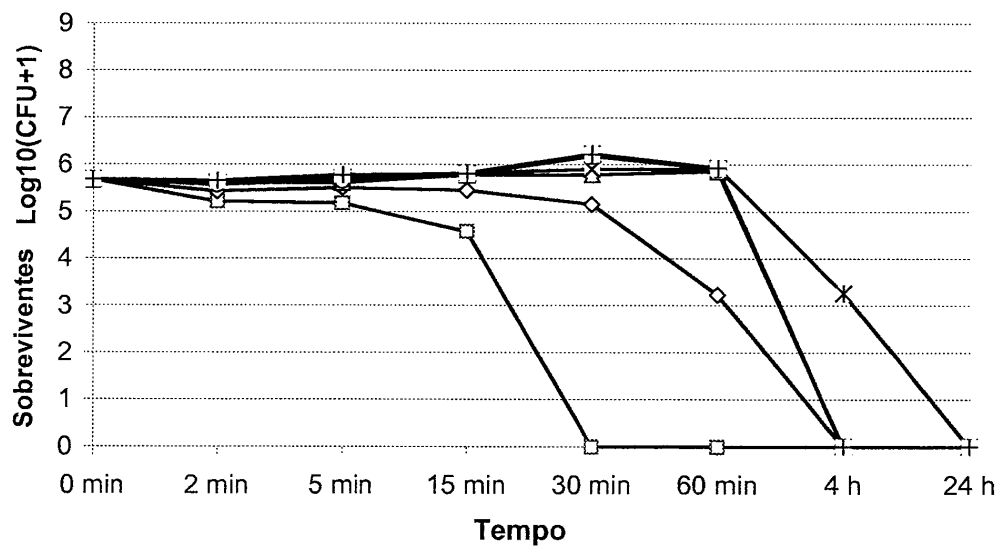
Staphylococcus aureus ATCC 29213

Fig. 3A

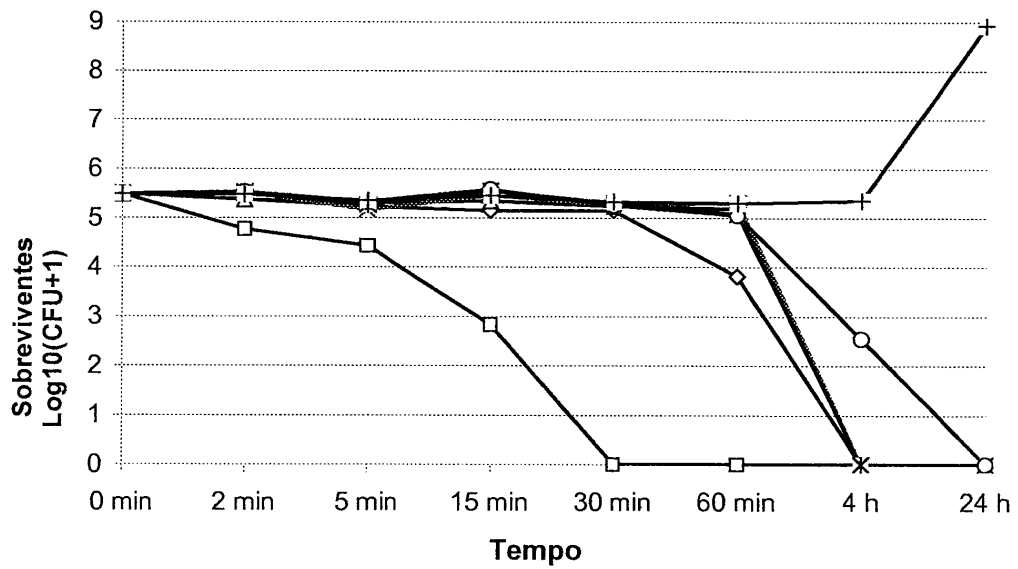
Escherichia coli ATCC 25922

Fig. 3B

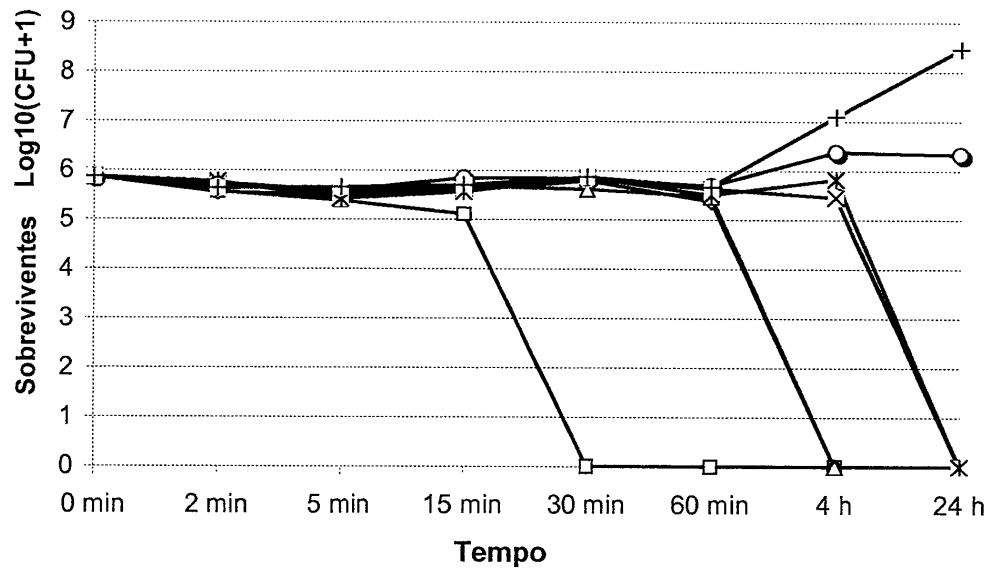
Enterococcus faecalis ATCC 29212

Fig. 3C

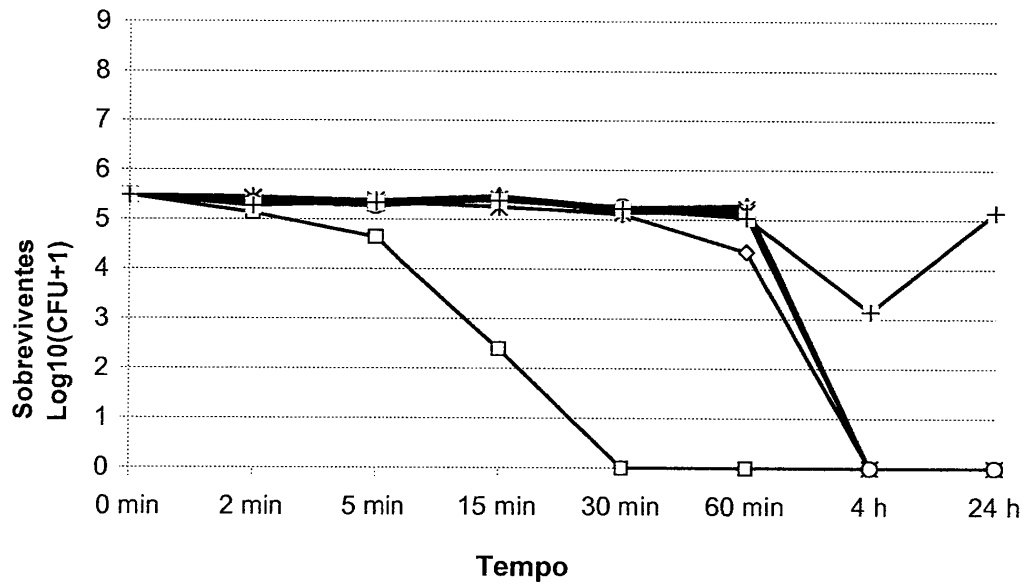
Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853

Fig. 3D

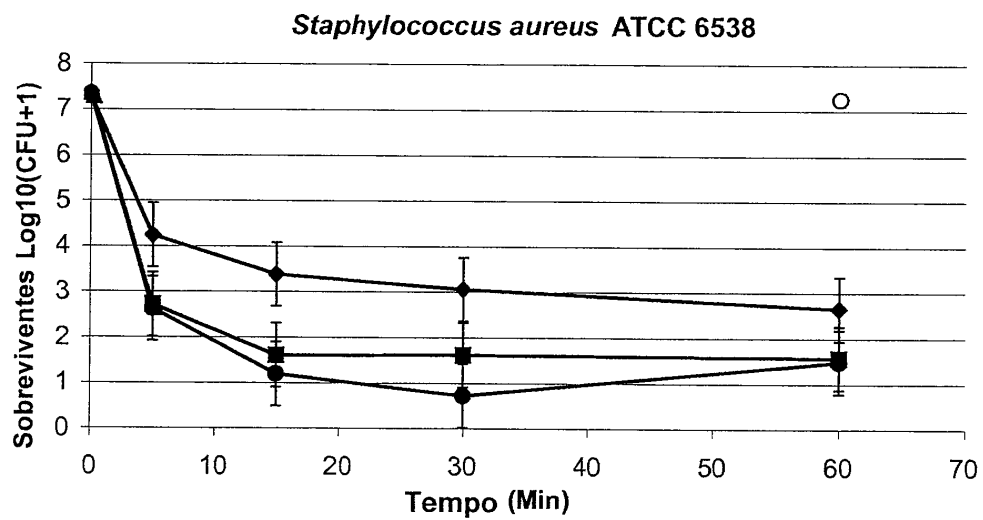


Fig. 4

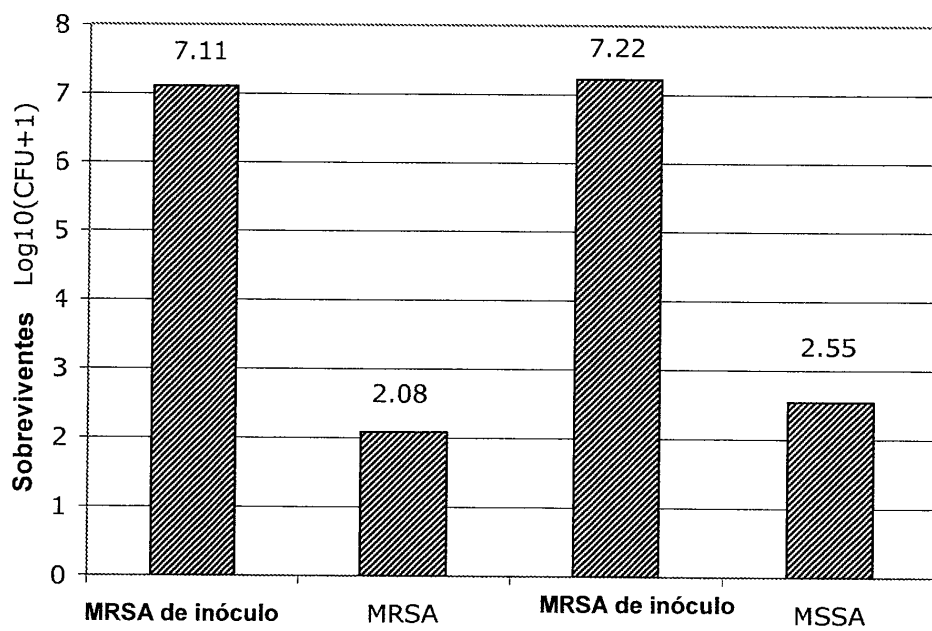


Fig. 5

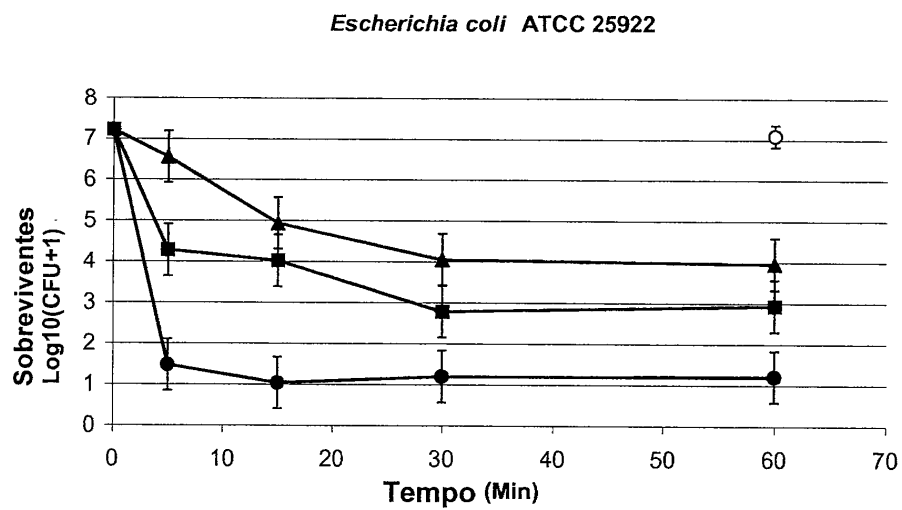


Fig. 6