

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 578 618**

51 Int. Cl.:

**C12N 11/18** (2006.01)  
**A61K 38/46** (2006.01)  
**A01N 65/00** (2009.01)  
**A01N 63/02** (2006.01)  
**A61P 31/00** (2006.01)  
**A61P 31/04** (2006.01)  
**A61L 2/16** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.01.2010 E 10729462 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.03.2016 EP 2373791**

54 Título: **Composiciones que comprenden proteasa, amilasa y lipasa para su uso en el tratamiento de infecciones por Staphylococcus aureus**

30 Prioridad:

**06.01.2009 US 142714 P**  
**17.02.2009 US 153274 P**  
**20.04.2009 US 170915 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**28.07.2016**

73 Titular/es:

**CURELON LLC (100.0%)**  
**411 Theodore Fremd Avenue, Suite 206s**  
**Rye, NY 10580, US**

72 Inventor/es:

**FALLON, JOAN M.;**  
**HEIL, MATTHEW y**  
**FALLON, JAMES J.**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 578 618 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Composiciones que comprenden proteasa, amilasa y lipasa para su uso en el tratamiento de infecciones por *Staphylococcus aureus*

### Campo de la invención

5 Esta descripción se refiere a composiciones, que incluyen composiciones farmacéuticas tales como composiciones de antibióticos, para el tratamiento o la prevención de las infecciones por *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*, también referido como SA en la presente memoria) en seres humanos y otros animales. Esta descripción también se refiere a composiciones, para erradicar o reducir la presencia de *S. aureus* sobre superficies biológicas (p. ej., piel, heridas), y/o para atenuar la infectividad de *S. aureus* con el fin de prevenir y/o reducir la propagación de infecciones por *S. aureus*.  
10

### Antecedentes

*Staphylococcus aureus*, también referido simplemente como "staph", es una bacteria normalmente portada sobre la piel o en la nariz de personas sanas. Las bacterias staph son una de las causas más comunes de infecciones de la piel en los Estados Unidos. La mayor parte de estas infecciones de piel son poco graves (tales como espinillas y forúnculos) y pueden ser tratadas sin antibióticos. No obstante, la bacteria staph también puede causar infecciones graves, tales como infecciones de heridas quirúrgicas, infecciones del torrente sanguíneo, y neumonía.  
15

Los estafilococos son bacterias esféricas Gram-positivas que aparecen en agrupaciones microscópicas que parecen uvas. En 1884, Rosenbach describió los dos tipos de colonias pigmentadas de estafilococos y propuso la nomenclatura apropiada: *Staphylococcus aureus* (de color amarillo) y *Staphylococcus albus* (de color blanco). La última especie se denomina actualmente *Staphylococcus epidermidis*. Los estafilococos son anaerobios facultativos que crecen por respiración aerobia o por fermentación que produce principalmente ácido láctico. Las bacterias son catalasa positivas y oxidasa negativas. *S. aureus* puede crecer a un intervalo de temperatura de 15 a 45 grados y a concentraciones de NaCl tan elevadas como 15 por ciento.  
20

Algunas bacterias staph son resistentes a los antibióticos. *Staphylococcus aureus* Resistente a Metilina (SARM) es un tipo de staph que es resistente a los antibióticos denominados beta-lactamas. Los antibióticos beta-lactámicos incluyen metilina y otros antibióticos más comunes tales como oxacilina, penicilina y amoxicilina. La mayoría de las infecciones por SARM se producen entre pacientes en los hospitales u otros centros asistenciales (referidas como infecciones por SARM adquiridas en hospitales o SARM-AH); sin embargo, Staph y SARM también pueden causar enfermedades en personas fuera de los hospitales y las instalaciones de atención sanitaria. Las infecciones por SARM que son adquiridas por personas que no han sido recientemente hospitalizadas (en el plazo de un año) o no han tenido un procedimiento médico (tal como diálisis, cirugía, catéteres) se conocen como infecciones por SARM adquiridas en la comunidad (SARM-AC). Aproximadamente 75 por ciento de las infecciones SARM-AC se localizan en la piel y los tejidos blandos y normalmente pueden ser tratadas de manera eficaz. No obstante, las cepas SARM-AC presentan una mayor virulencia, se propagan más rápidamente y causan enfermedades más graves que las infecciones por SARM-AH tradicionales, y pueden afectar a órganos vitales conduciendo a una infección generalizada (sepsis), síndrome de choque tóxico y neumonía.  
25  
30  
35

No se sabe por qué algunas personas sanas desarrollan infecciones en la piel por SARM-AC que son tratables mientras otras infectadas por la misma cepa desarrollan infecciones graves, fatales. Los estudios han demostrado que las tasas de infección por SARM-AC están aumentando. En 1999, se informó de que cuatro niños en Minnesota y Dakota del Norte habían fallecido por infecciones fulminantes por SARM-AC. Un estudio sobre los niños del sur de Texas encontró que los casos de SARM-AC aumentaron 14 veces entre 1999 y 2001. Alrededor de 2007, SARM-AC fue la causa más frecuente de infecciones de la piel y los tejidos blandos observadas en los departamentos de urgencias de los Estados Unidos.  
40

Las cepas de *S. aureus* de los hospitales son normalmente resistentes a una variedad de antibióticos diferentes. Unas pocas cepas son resistentes a todos los antibióticos clínicamente útiles excepto la vancomicina, y cada vez se informa más sobre cepas resistentes a la vancomicina (SARV). La resistencia a la metilina es amplia (SARM) y la mayor parte de las cepas resistentes a metilina también son resistentes a múltiples fármacos. Por añadidura, *S. aureus* muestra resistencia a antisépticos y desinfectantes, tales como compuestos de amonio cuaternario, lo que puede ayudar a su supervivencia en el entorno hospitalario.  
45

En la actualidad muere más gente en los Estados Unidos por infección debida a SARM que por SIDA. SARM fue responsable de aproximadamente 94.000 infecciones que pusieron la vida en peligro y de 18.650 muertes en 2005, como informa CDC en la publicación del 17 de Oct. de 2007 de The Journal of the American Medical Association. La estimación nacional es más del doble de prevalencia de SARM invasivo referido cinco años antes. El mismo año, murieron aproximadamente 16.000 personas en los Estados Unidos por SIDA, de acuerdo con CDC.  
50

### 55 Compendio

La presente invención se define por medio de las reivindicaciones.

- Esta descripción se refiere a la prevención y/o el tratamiento de infecciones por *S. aureus*, incluyendo infecciones por SARM y SARV, con el uso de una composición farmacéutica que comprende enzimas digestivas, tales como enzimas pancreáticas u otras enzimas del tracto digestivo (p. ej., enzimas pancreáticas porcinas) o enzimas derivadas de plantas, hongos, o microorganismos, que descomponen los componentes de los alimentos. Según se utiliza en la presente memoria, una composición farmacéutica se puede utilizar para indicaciones humanas o veterinarias. Por consiguiente, las composiciones farmacéuticas pueden ser útiles para el tratamiento profiláctico y/o terapéutico de poblaciones de seres humanos o de otros mamíferos (p. ej., cerdo, caballo, vaca, oveja, mono, rata, ratón, gato, perro) o poblaciones de aves (p. ej., pato, ganso, pollo, pavo).
- Por consiguiente, en un primer aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento o prevención de una infección por *S. aureus* en un ave o un mamífero, que comprende enzimas digestivas que comprenden proteasa, amilasa, y lipasa.
- En un aspecto adicional, la presente invención proporciona una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de un mamífero o un ave que muestran uno o más síntomas debidos a una infección por *S. aureus* que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de enzimas digestivas que comprenden proteasa, amilasa, y lipasa.
- Las composiciones farmacéuticas se pueden utilizar por sí mismas, y/o combinadas con otros regímenes antibacterianos o antibióticos (p. ej., *anti-S. aureus*), y/o con otros agentes terapéuticos o antibióticos después de la infección para tratar infecciones por *S. aureus*.
- Asimismo se proporcionan en la presente memoria composiciones bactericidas y/o bacteriostáticas que comprenden una o más enzimas digestivas para su uso como o en desinfectantes, higienizantes, detergentes, y antisépticos, p. ej., en hospitales, residencias de ancianos, guarderías, centros de día, colegios, entornos laborales, servicios de alimentación, transporte público, y baños, para reducir, atenuar, y/o destruir el *S. aureus* presente en tales entornos. Las superficies tratadas con las composiciones descritas pueden ser tejido vivo (manos, p. ej., detergentes para lavar las manos; heridas, p. ej., heridas quirúrgicas o heridas resultantes de accidentes/traumas). Las composiciones pueden ser útiles de ese modo para el tratamiento de superficies para reducir o erradicar *S. aureus* en ellos, o para atenuar o reducir la infectividad de *S. aureus*, y prevenir o reducir de ese modo la propagación de *S. aureus*. Asimismo se describe un método para el tratamiento o la prevención de la infección por *S. aureus* en un ave o un mamífero que comprende la administración al ave o mamífero de una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica que comprende enzimas digestivas. En algunas realizaciones, las enzimas digestivas comprenden enzimas seleccionadas del grupo que consiste en proteasas, amilasas, celulasas, sacarosas, maltasas, papaína, y lipasas. En algunas realizaciones, las enzimas digestivas comprenden una o más enzimas pancreáticas. Las enzimas digestivas derivan, independientemente, de una fuente animal, una fuente microbiana, una fuente vegetal, una fuente fúngica, o se preparan sintéticamente. En algunas realizaciones, la fuente animal es un páncreas de cerdo.
- En algunas realizaciones, una composición farmacéutica comprende al menos una amilasa, una mezcla de proteasas que comprende quimotripsina y tripsina, y al menos una lipasa. En algunas realizaciones, una composición farmacéutica comprende al menos una proteasa y al menos una lipasa, y en donde la razón de proteasas totales con respecto a lipasas totales (en unidades USP) oscila de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 20:1
- En algunas realizaciones, la composición farmacéutica es una formulación de dosificación seleccionada del grupo que consiste en: píldoras, comprimidos, cápsulas, comprimidos oblongos, espolvoreables, cremas, lociones, aerosoles, emulsiones, polvos, líquidos, geles, y una combinación de cualquiera de los mismos.
- En algunas realizaciones, la composición farmacéutica se formula para la administración oral, o para la administración tópica, o para la administración intranasal, o transmucosal.
- Asimismo se describe un método de tratamiento de un mamífero o ave que muestra uno o más síntomas de infección por *S. aureus* que comprende la administración al mamífero o ave de una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende enzimas digestivas.
- Adicionalmente se describe un método para promover la curación de heridas y/o la reducción de cicatrices en un individuo con una herida, que comprende la administración de una composición farmacéutica que comprende enzimas digestivas al individuo. La herida puede ser, p. ej., una herida quirúrgica o una herida traumática.
- Por consiguiente, en un aspecto adicional la presente invención proporciona una composición farmacéutica para su uso en la promoción de la curación de heridas en un individuo con una herida infectada con *S. aureus*, que comprende enzimas digestivas que comprenden proteasa, amilasa, y lipasa. En algunas realizaciones, dicha composición se utiliza para promover la curación de heridas y la reducción de las cicatrices en un individuo con una herida infectada con *S. aureus*.
- En un aspecto adicional, la presente invención proporciona una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento o la prevención de infecciones por *S. aureus* en animales reduciendo la cantidad de *S. aureus* presente

en una región de la piel, tejido, o herida de un mamífero o ave, en donde la composición se formula para su aplicación a la región de la piel, tejido, o herida, en donde la composición comprende enzimas digestivas que comprenden proteasa, amilasa, y lipasa.

5 También se describe un método para higienizar o desinfectar una superficie para reducir la cantidad de *S. aureus* en la misma o para erradicar *S. aureus* de la misma, que comprende la aplicación a la superficie de una composición que comprende enzimas digestivas. La superficie puede ser una superficie viva (p. ej., piel, herida).

También se describe un método para reducir la cantidad de *S. aureus* presente sobre una región de la piel, tejido, o herida de un mamífero o ave que comprende la aplicación a la región de la piel, tejido, o herida de una composición que comprende enzimas digestivas.

10 La descripción también proporciona un antibiótico que comprende enzimas digestivas, en donde el antibiótico es bactericida y/o bacteriostático para *S. aureus*.

También se proporciona un antiséptico que comprende enzimas digestivas, en donde el antiséptico es bactericida y/o bacteriostático para *S. aureus*.

15 La descripción también proporciona un desinfectante que comprende enzimas digestivas, en donde el desinfectante es bactericida y/o bacteriostático para *S. aureus*

Los detalles de una o más realizaciones de la invención se muestran en los dibujos adjuntos y en la siguiente descripción.

#### **Descripción detallada**

20 El término "administración" o "administrar" hace referencia a un método para proporcionar una dosificación de una composición o composición farmacéutica a un vertebrado o invertebrado, incluyendo un mamífero, un ave, un pez, o un anfibio, en el que el método es por cualquier vía, p. ej., intrarrespiratoria, nasal, tópica, oral, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, transmucosal, bucal, rectal, vaginal, o sublingual. El método de administración preferido puede variar dependiendo de diversos factores, p. ej., los componentes de la composición farmacéutica, el sitio de la enfermedad, la enfermedad implicada, y la gravedad de la enfermedad.

25 El término "mamífero" se utiliza en su sentido biológico habitual. De este modo, incluye específicamente seres humanos, ganado vacuno, caballos, perros, y gatos, pero también incluye muchas otras especies.

30 El término "portador farmacéuticamente aceptable" o "excipiente farmacéuticamente aceptable" incluye todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes para conferir isotonicidad y para retrasar la absorción y similares. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es bien conocido en la técnica. Salvo en la medida en la que cualquier medio o agente convencional es incompatible con los ingredientes activos, se contempla su uso en las composiciones terapéuticas. También se pueden incorporar a las composiciones ingredientes activos complementarios, tales como antibióticos, antifúngicos, antimicrobianos. Además, se pueden incluir coadyuvantes diversos tales como los comúnmente utilizados en la técnica. Estos y otros de tales compuestos se describen en la bibliografía, p. ej., en el Merck Index, Merck & Company, Rahway, NJ. Las consideraciones para la inclusión de diversos componentes en las composiciones farmacéuticas son descritas, p. ej., por Gilman et al. (Eds.) (2006); Goodman y Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics, 11<sup>a</sup> Ed., The McGraw-Hill Companies.

35 "Sujeto" o "paciente" o "individuo" según se utiliza en la presente memoria, representa un mamífero humano o no humano, p. ej., un perro, un gato, un ratón, una rata, una vaca, una oveja, un cerdo, una cabra, un primate no humano o un ave, p. ej., un pollo, así como cualquier otro vertebrado o invertebrado.

40 "Cantidad terapéuticamente eficaz" o "cantidad farmacéuticamente eficaz" es típicamente aquella que es suficiente para lograr el efecto deseado y puede variar de acuerdo con la naturaleza y la gravedad del estado de enfermedad, la naturaleza del sujeto, y la potencia de la composición. Se apreciará que se pueden emplear diferentes concentraciones para la profilaxis que para el tratamiento de una enfermedad activa. Esta cantidad puede depender adicionalmente de la altura, el peso, el sexo, la edad y el historial médico del paciente.

45 Un efecto terapéutico alivia, hasta cierto punto, uno o más de los síntomas de la enfermedad, e incluye la curación de una enfermedad. "Curar" significa que los síntomas de la enfermedad activa se eliminan. Sin embargo, ciertos efectos a largo plazo o permanentes de la enfermedad pueden existir incluso después de lograrse la curación (tal como una lesión tisular).

50 "Tratar," "tratamiento", o "tratando", según se utiliza en la presente memoria hace referencia a la administración de una composición farmacéutica para fines terapéuticos. El término "tratamiento terapéutico" hace referencia a la administración del tratamiento a un paciente que ya padecía una enfermedad causando de ese modo un efecto terapéuticamente beneficioso, tal como el alivio de los síntomas existentes, la prevención de otros síntomas, el alivio o la prevención de las causas metabólicas subyacentes de los síntomas, el aplazamiento o la prevención del

desarrollo adicional de un trastorno y/o la reducción de la gravedad de los síntomas que se desarrollarán o se espera que se desarrollen.

La presente descripción proporciona composiciones que comprenden enzimas digestivas para el tratamiento y/o la prevención de las infecciones por *S. aureus*, incluyendo las formas resistentes a antibióticos de *S. aureus* tales como SARM y SARV. La presente descripción también proporciona composiciones que comprenden enzimas digestivas y métodos de utilización de las mismas como antisépticos, detergentes, desinfectantes, e higienizantes, p. ej., como composiciones bactericidas y/o bacteriostáticas, para erradicar o atenuar *S. aureus* y/o para reducir su infectividad. Las composiciones descritas en la presente memoria incluyen enzimas digestivas, que se postula que ayudan a la reducción, debilitamiento, o erradicación de *S. aureus*, y por lo tanto a prevenir la adquisición de infecciones por *S. aureus* o para tratar las infecciones por *S. aureus* (p. ej., mejorar o aliviar los síntomas o reducir el transcurso del tiempo de la infección).

### Composiciones

Una composición para su uso como se describe en la presente memoria incluye enzimas digestivas. Si bien no se desea estar limitado por la teoría, se cree que las enzimas digestivas de la composición pueden degradar la pared celular, la membrana, y/o las estructuras proteicas de *S. aureus*, conduciendo a la actividad bacteriostática y/o bactericida. Las composiciones demuestran una actividad bactericida/bacteriostática específica de la especie contra *S. aureus* y *E. coli*, pero no contra *S. enterica*, demostrando posiblemente que la vulnerabilidad de los dos organismos deriva de la degradación proteolítica de una secuencia de proteínas similar presente en los dos organismos.

Una enzima digestiva como se describe en la presente memoria es una enzima que puede descomponer uno o más componentes de los alimentos (p. ej., proteínas, grasas, carbohidratos). Las enzimas digestivas pueden ser enzimas derivadas de animales (p. ej., enzimas pancreáticas u otras enzimas del tracto digestivo), o derivadas de plantas, hongos, o microorganismos, o se pueden preparar sintéticamente. Muchas enzimas digestivas se encuentran disponibles en el mercado o se pueden aislar y purificar a partir de otras fuentes mediante métodos bien conocidos por los expertos normales en la técnica. La actividad enzimática de las enzimas también se puede evaluar utilizando análisis convencionales.

Las enzimas digestivas pueden ser de cualquier combinación de fuentes enzimáticas. En algunos casos, las enzimas digestivas comprenden enzimas seleccionadas del grupo que consiste en proteasas, amilasas, celulasas, sacarosas, maltasas, papaína (p. ej., de papaya), bromelaína (p. ej., de piña), hidrolasas, y lipasas. En algunos casos, las enzimas digestivas comprenden una o más enzimas pancreáticas. En algunos casos, la composición comprende una o más proteasas, una o más lipasas, y una o más amilasas. En algunos casos, las una o más proteasas comprenden quimotripsina y tripsina. En algunos casos, una composición como la descrita en la presente memoria consiste esencialmente en, o consiste en, las una o más enzimas digestivas.

En ciertas realizaciones, la composición puede comprender al menos una amilasa, al menos dos proteasas, y al menos una lipasa. En ciertos casos, la composición puede incluir adicionalmente una o más hidrolasas, papaína, bromelaína, papaya, celulasas, pancreatina, sacarosas, y maltasas.

Como se indica, las enzimas digestivas pueden derivar de una fuente animal. En algunas realizaciones, la fuente animal es un cerdo, p. ej., un páncreas de cerdo. Los extractos y formulaciones de enzima pancreática de cerdo son conocidos por los expertos normales en la técnica y se encuentran disponibles en el mercado o se pueden preparar utilizando métodos conocidos. Por ejemplo, se puede adquirir una composición de enzima pancreática de cerdo de Scientific Protein Laboratories (denominada PEC). Una composición de enzima pancreática, o cualquier composición de la presente memoria, se puede ajustar para modificar la cantidad de enzimas digestivas contenidas en la misma, p. ej., el contenido de lipasa, amilasa, o proteasa, por ejemplo mediante métodos de producción y/o procesamiento o mediante la adición selectiva de enzimas exógenas, activadores, o inhibidores a la composición.

En ciertas circunstancias, puede ser deseable tener una actividad relativamente mayor de proteasas que de lipasas. De este modo, en algunas realizaciones, una composición comprende al menos una proteasa y al menos una lipasa, en donde la razón de proteasas totales con respecto a lipasas totales (en unidades USP) oscila de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 20:1 incluyendo 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 11:1, 12:1, 13:1, 14:1, 15:1, 16:1, 17:1, 18:1, 19:1 y 20:1, junto con todos los valores intermedios. En algunas realizaciones, la razón de proteasas con respecto a lipasas oscila de aproximadamente 4:1 a aproximadamente 10:1 incluyendo 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, y 10:1, junto con todos los valores intermedios.

En ciertas circunstancias puede resultar útil modificar la cantidad de actividad de una enzima concreta en una composición dada. La actividad de las enzimas digestivas se puede ajustar de diferentes maneras conocidas por el experto en la técnica, p. ej., aumentando la cantidad de la enzima concreta, o ajustando los componentes de la composición, p. ej., a través del uso de estabilizadores, inhibidores, y activadores. En algunos casos, una composición descrita en la presente memoria incluye una o más proteasas que tienen una actividad de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 400 Unidades USP por mg de la composición, o cualquier valor intermedio (p. ej., 0,1; 0,2; 0,25; 0,5; 1, 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 75, 100, 150, 200, 250,

300, 350 Unidades USP por mg). En algunos casos, una composición descrita en la presente memoria incluye una o más lipasas que tienen una actividad de aproximadamente 0,005 a aproximadamente 50 Unidades por mg de la composición, o cualquier valor intermedio (p. ej., 0,01, 0,02, 0,025, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,08, 0,1, 0,2, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 25, 28, 30, 35, 38, 40, 45 Unidades USP por mg). En algunos casos, una composición descrita en la presente memoria incluye una o más amilasas que tienen una actividad de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 400 Unidades USP por mg de la composición, o cualquier valor intermedio (p. ej., 0,1; 0,2; 0,25; 0,5; 1, 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 350 Unidades USP por mg). En algunos casos, una composición descrita en la presente memoria incluye una o más proteasas en el intervalo de actividad anterior, una o más lipasas en el intervalo de actividad anterior, y una o más amilasas en el intervalo de actividad anterior. Un caso ilustrativo incluye una o más proteasas que tienen una actividad en el intervalo de aproximadamente 150-250 unidades USP/mg; una o más lipasas que tienen una actividad en el intervalo de aproximadamente 20-40 unidades USP/mg; y una o más amilasas que tienen una actividad en el intervalo de aproximadamente 200-300 unidades USP/mg.

En algunos casos, se puede formular una composición con el fin de estabilizar las enzimas digestivas, p. ej., para conservar la actividad enzimática de las enzimas. Las técnicas de estabilización pueden limitar o prevenir la auto-degradación de las enzimas en una composición y ayudar a mantener la actividad enzimática, aumentar la vida útil, y ayudar a la tolerancia de la actividad de las composiciones a los cambios de temperatura, humedad, y condiciones de almacenamiento. Por ejemplo, en algunos casos, las enzimas de la composición están encapsuladas, p. ej., encapsuladas en lípidos. En otras aplicaciones, se pueden emplear variaciones en los excipientes, el pH, los inhibidores de enzimas, etc. para ayudar a estabilizar las enzimas. Las técnicas de estabilización apropiadas dependerán de la aplicación pretendida para la composición (p. ej., antibiótico vs. detergente), de la vía de administración, la forma de la composición, el sitio de suministro/actividad pretendido, y otros factores, y pueden ser determinadas por los expertos normales en la técnica.

Ciertos estabilizadores de actividad enzimática útiles incluyen compuestos que proporcionan una fuente de calcio libre en una solución tal como por ejemplo sales de calcio; alquilalcoholes o ramificados tales como por ejemplo etanol y alcohol isopropílico; alcanolamidas tales como por ejemplo trietanolamina; ácidos tales como ácidos orgánicos; y mezclas de productos destilados del petróleo.

En ciertos casos, el estabilizador de la actividad enzimática puede ser una composición seleccionada entre (1) composiciones que se sabe que son eficaces en la estabilización de enzimas en soluciones acuosas líquidas, incluyendo compuestos y sistemas que estabilizan enzimas, (2) "inhibidores de micelas" seleccionados, y mezclas de (1) y (2). En algunos casos, la actividad estabilizadora es una concentración adecuada de aniones de boro. En algunos casos, el estabilizador de la actividad está solvatado en un poliol y se puede combinar con sinergistas o coadyuvantes estabilizadores de enzimas que forman un sistema de estabilización de enzimas. Los "inhibidores de micelas" preferidos incluyen especies que se sabe que modifican y también que inhiben la formación de micelas y se pueden seleccionar entre disolventes miscibles con agua tales como alcanoles C1-C6, dioles C1-C6, éteres de alquilen(C2-C24)glicol éteres, alquilenglicol alquiléteres, y mezclas de los mismos. Un inhibidor de micelas altamente preferido es el metiléter de di-(propilenglicol) ("DPM") y los análogos del mismo que modifican la formación de micelas.

Un ejemplo de un "sistema de estabilización de enzima" es un compuesto de boro (p. ej. ácido bórico) que en el pasado se utilizaba solo o con otros coadyuvantes o sinergistas seleccionados (p. ej. compuestos amino polifuncionales, antioxidantes, etc.) para proteger las enzimas proteolíticas y otras enzimas en el almacenamiento y en diversos productos.

Se puede seleccionar un estabilizador de la actividad para minimizar sustancialmente la Concentración Inhibidora Mínima ("CIM") de la enzima digestiva en la formulación. La CIM es una medida de la concentración mínima del biocida que permite la prevención del crecimiento bacteriano en un cultivo durante un período de tiempo especificado, por ejemplo 24 hrs. Los detalles del ensayo de CIM se muestran en "Bailey & Scott 'Diagnostic Microbiology', 8ª edición, 1990 en la página 177.

En algunos casos, una composición descrita en la presente memoria se puede recubrir con una variedad de recubrimientos naturales o sintéticos, p. ej., para proporcionar una liberación programada de las enzimas, para proporcionar un enmascaramiento del sabor u olor, o para estabilizar las enzimas. Las preparaciones de enzimas recubiertas, incluyendo las composiciones de enzimas recubiertas con lípidos o encapsuladas con lípidos, que comprenden una o más enzimas digestivas útiles para los métodos y composiciones descritas en la presente memoria se describen en el documento U.S. Núm. de Serie 12/386,051, presentado el 13 de abril de 2009. Tales preparaciones recubiertas pueden proporcionar las características deseadas, incluyendo un aumento de la estabilidad de almacenamiento, una reducción de la aerosolización de las formulaciones en polvo o sólidas, un enmascaramiento del olor y el sabor, una estabilización de las enzimas, y una liberación retardada o programada de las enzimas.

Otros aditivos para su inclusión en las composiciones descritas en la presente memoria pueden ser determinados por los expertos normales en la técnica, y se basarán en numerosos rasgos, incluyendo la aplicación pretendida, p. ej., aplicaciones en seres humanos vs. veterinarias; el perfil de liberación deseado; la farmacocinética deseada; la

seguridad; la estabilidad; y las características físicas (olor, color, sabor, vertibilidad, aerosolización). Los ingredientes, excipientes, aglutinantes, agentes voluminizantes, aromatizantes, colorantes, etc. de formulación adecuados se pueden determinar y evaluar mediante métodos conocidos por los expertos normales en la técnica.

#### **Composiciones farmacéuticas y antibióticos para uso humano o veterinario**

5 Las composiciones descritas en la presente memoria se pueden formular como composiciones farmacéuticas, p. ej., pueden incluir una composición como se ha descrito previamente formulada con uno o más portadores o excipientes farmacéuticamente aceptables. Las composiciones farmacéuticas son útiles para el tratamiento o la prevención de las infecciones por *S. aureus* en seres humanos y otros animales, tales como mamíferos (p. ej., vacas, caballos, cerdos, ovejas, cabras, monos, gatos, perros, ratones, ratas) y aves (pollos, pavos, patos, gansos). Una composición farmacéutica para el tratamiento de las infecciones por *S. aureus* también puede ser referida como antibiótico o composición de antibiótico en la presente memoria.

15 La susceptibilidad de *S. aureus*, incluyendo SARM y SARV, a una composición de antibiótico descrita en la presente memoria se puede determinar mediante métodos conocidos por los expertos normales en la técnica. Un procedimiento rápido utiliza discos de papel de filtro disponibles en el mercado que han sido impregnados con una cantidad específica de la composición de antibiótico. Estos discos se colocan sobre la superficie de placas de agar en las que se ha sembrado en estrías un cultivo del *S. aureus* que está siendo sometido a ensayo, y las placas se observan para determinar las zonas de inhibición del crecimiento. El ensayo de susceptibilidad de dilución del caldo implica la preparación de tubos de ensayo que contienen diluciones seriadas de la composición en medios de cultivo líquidos, inoculando a continuación el organismo que está siendo sometido a ensayo en los tubos. La concentración más baja de fármaco que inhibe el crecimiento de la bacteria después de un período de incubación adecuado es referida como concentración inhibidora mínima (CIM).

20 La resistencia o susceptibilidad de *S. aureus* a un antibiótico descrito en la presente memoria se puede determinar basándose en el resultado clínico, esto es, si la administración de ese antibiótico a un sujeto infectado por ese organismo cura satisfactoriamente al sujeto. Alternativamente, para facilitar la identificación de la resistencia o susceptibilidad al antibiótico utilizando los resultados del ensayo *in vitro*, el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) ha formulado patrones para la susceptibilidad al antibiótico que se corresponden al resultado clínico para determinaciones *in vitro* de la concentración inhibidora mínima del antibiótico.

25 La administración de las composiciones farmacéuticas en la presente memoria puede ser a través de cualquiera de los modos de administración aceptados para agentes que sirven para utilidades similares incluyendo, pero no limitados a, oralmente, subcutáneamente, intravenosamente, intranasalmente, tópicamente, transdérmicamente, transmucosalmente, intraperitonealmente, intramuscularmente, intrapulmonarmente, vaginalmente, rectalmente, o intraocularmente. Las administraciones oral, transmucosal, tópica, y parenteral, por ejemplo, son habituales en el tratamiento de indicaciones para infección por *S. aureus*.

30 En las composiciones farmacéuticas, las concentraciones eficaces de una o más enzimas digestivas se mezclan con un excipiente o portador farmacéutico adecuado. Las concentraciones de las enzimas digestivas en la composición son eficaces para el suministro de una cantidad, tras la administración, que es útil en la reducción o erradicación de la bacteria *S. aureus*, y/o para tratar o aliviar uno o más de los síntomas asociados con la infección por *S. aureus*.

35 Las composiciones de antibióticos se pueden formular para su administración en una sola dosis. Para formular una composición, la fracción en peso de enzimas digestivas se disuelve, suspende, dispersa o mezcla de otro modo en un portador seleccionado a una concentración eficaz de manera que las bacterias se reduzcan o erradiquen, la afección tratada se alivie, o uno o más síntomas se mejoren.

40 Las enzimas digestivas están incluidas en el portador farmacéuticamente aceptable en una cantidad suficiente para ejercer un efecto terapéuticamente útil en ausencia de efectos secundarios no deseables sobre el paciente tratado. La concentración terapéuticamente eficaz se puede determinar empíricamente sometiendo a ensayo las enzimas digestivas *in vitro* e *in vivo*, y a continuación extrapolar de allí para determinar las dosificaciones para seres humanos.

45 La concentración de enzimas digestivas en la composición farmacéutica dependerá de las tasas de absorción, inactivación y excreción de las enzimas, las características fisicoquímicas de las enzimas, el programa de dosificación, la forma de dosificación, y la cantidad administrada así como de otros factores conocidos por los expertos en la técnica.

50 La composición farmacéutica puede ser administrada de una vez, o se puede dividir en varias dosis más pequeñas que se van a administrar a intervalos de tiempo. Se entiende que la dosificación precisa y la duración del tratamiento es una función de la enfermedad que esté siendo tratada y se puede determinar empíricamente utilizando protocolos de ensayo conocidos o mediante extrapolación a partir de los datos de ensayo *in vivo* o *in vitro*. Se debe observar que las concentraciones y los valores de dosificación pueden variar también con la gravedad de la afección que se vaya a aliviar. Se debe entender adicionalmente que para cualquier sujeto concreto, los regímenes de dosificación específicos se deben ajustar a lo largo del tiempo de acuerdo con la necesidad individual y el criterio profesional de la persona que administra o supervisa la administración de las composiciones, y que los intervalos de concentración

mostrados en la presente memoria son meramente ilustrativos y no se pretende que limiten el alcance o la práctica de las composiciones reivindicadas.

Después de la mezcla o adición de las enzimas digestivas, la mezcla resultante puede ser una solución, suspensión, gel, polvo, emulsión o similar. La forma de la mezcla resultante depende de diversos factores, incluyendo el modo deseado de administración y la solubilidad de las enzimas digestivas en el portador o vehículo seleccionados.

Las composiciones deseadas para uso farmacéutico se pueden administrar en forma de productos cristalinos o amorfos. Las composiciones farmacéuticamente aceptables incluyen formas de dosificación sólidas, semi-sólidas, líquidas, geles, polvos, y aerosoles, tales como, p. ej., comprimidos, cápsulas, comprimidos oblongos, espolvoreables, polvos, líquidos, suspensiones, emulsiones, geles, supositorios, aerosoles o similares. Se pueden obtener, por ejemplo, en forma de películas por medio de métodos tales como precipitación, cristalización, liofilización, secado mediante pulverización, o secado mediante evaporación. Para este fin se puede utilizar secado mediante microondas o radiofrecuencia. Las composiciones también se pueden administrar en formas de dosificación sostenida o controlada, incluyendo inyecciones de depósito, bombas osmóticas, píldoras, recubrimientos especializados (p. ej., recubrimientos entéricos) sobre formas de dosificación oral, parches transdérmicos (incluyendo electrotransporte), y similares, para la administración en pulsos prolongada y/o programada, a un ritmo predeterminado. En algunas realizaciones, las composiciones se proporcionan en formas de dosificación unitaria adecuadas para la administración única de una dosis precisa.

Las composiciones se pueden administrar solas o más típicamente combinadas con un portador, excipiente farmacéutico convencional o similar. El término "excipiente" se utiliza en la presente memoria para describir cualquier ingrediente distinto del compuesto o compuestos (enzimas) utilizados en la composición. Los excipientes farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, intercambiadores de iones, alúmina, estearato de aluminio, lecitina, sistemas de liberación de fármacos autoemulsionantes (SEDDS) tales como succinato de D- $\alpha$ -tocopherol-polietilenglicol 1000, tensioactivos utilizados en formas de dosificación farmacéuticas tales como Tween u otras matrices de liberación poliméricas similares, proteínas séricas, tales como albúmina de suero humana, sustancias tamponadoras tales como fosfatos, glicina, ácido sórbico, sorbato de potasio, mezclas de glicéridos parciales de ácidos grasos vegetales saturados, agua, sales o electrolitos, tales como sulfato de protamina, hidrogenofosfato de disodio, hidrogenofosfato de potasio, cloruro de sodio, sales de cinc, sílice coloidal, trisilicato de magnesio, polivinilpirrolidona, sustancias basadas en celulosa, polietilenglicol, carboximetilcelulosa sódica, poliácrilatos, ceras, polímeros en bloque de polietileno-polioxipropileno, y grasa de lana. También se pueden utilizar ventajosamente ciclodextrinas tales como  $\alpha$ -,  $\beta$ -, y  $\gamma$ -ciclodextrina, o derivados modificados químicamente tales como hidroxialquilciclodextrinas, incluyendo 2- y 3-hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrinas, u otros derivados solubilizados para mejorar el suministro de las composiciones descritas en la presente memoria. Los métodos actuales para preparar tales formas de dosificación son conocidos, o resultarán evidentes para los expertos en esta técnica; por ejemplo, véanse Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21<sup>a</sup> Edición (Lippincott Williams & Wilkins. 2005).

En un caso preferido, las composiciones adoptarán la forma de una forma de dosificación tal como una píldora o comprimido y por tanto la composición puede contener, junto con el ingrediente activo, un diluyente tal como lactosa, sacarosa, fosfato dicálcico, o similares; un lubricante tal como estearato de magnesio o similar; y un aglutinante tal como almidón, goma arábiga, polivinilpirrolidina, gelatina, celulosa, derivados de celulosa o similares. En otra forma de dosificación sólida, un polvo, solución o suspensión (p. ej., en carbonato de propileno, aceites vegetales o triglicéridos) es encapsulado en una cápsula de gelatina. También se contemplan las formas de dosificación unitarias en las que dos o más ingredientes están separados físicamente; p. ej., cápsulas con gránulos con una o varias enzimas y gránulos de otros ingredientes; comprimidos de dos capas; cápsulas de gel de dos compartimentos, etc.

Las composiciones líquidas administrables farmacéuticamente se pueden preparar, por ejemplo, disolviendo, dispersando, etc. una o más enzimas digestivas y coadyuvantes farmacéuticos opcionales en un portador (p. ej., agua, solución salina, dextrosa acuosa, glicerol, glicoles, etanol o similares) para formar una solución o suspensión. Si se desea, la composición farmacéutica puede contener también cantidades mínimas de sustancias auxiliares no tóxicas tales como agentes humectantes, agentes emulsionantes, agentes solubilizantes, agentes tamponadores del pH y similares (p. ej., acetato de sodio, citrato de sodio, derivados de ciclodextrina, monolaurato de sorbitán, acetato de trietanolamina, oleato de trietanolamina, y similares). Los inyectables se pueden preparar en formas convencionales, ya sea en forma de soluciones o suspensiones líquidas, en forma de emulsiones, o en formas sólidas adecuadas para su disolución o suspensión en líquidos antes de su inyección.

Las composiciones sólidas se pueden proporcionar en varios tipos diferentes de formas de dosificación, dependiendo de las propiedades fisicoquímicas de las enzimas, la tasa de disolución deseada, consideraciones de coste, y otros criterios. En uno de los casos, la composición sólida es una sola unidad. Esto implica que una dosis unitaria del fármaco está incluida en una sola forma o artículo físicamente sólidos. En otras palabras, la composición sólida es coherente, lo que está en contraposición a una forma de dosificación unitaria múltiple, en la que las unidades son incoherentes.

Los ejemplos de las unidades únicas que se pueden utilizar como formas de dosificación para la composición sólida incluyen comprimidos, tales como comprimidos, unidades en forma de película, unidades en forma de lámina,

obleas, unidades de matrices liofilizadas, y similares. En un caso, la composición sólida es una forma liofilizada altamente porosa. Tales productos liofilizados, a veces denominados también obleas o comprimidos liofilizados, son particularmente útiles por su rápida disgregación, que también posibilita la rápida disolución del compuesto activo.

5 Por otro lado, para algunas aplicaciones la composición sólida también se puede formar como una forma de dosificación unitaria múltiple. Los ejemplos de las unidades múltiples son polvos, espolvoreables, gránulos, micropartículas, microcápsulas, bolitas, cuentas, polvos liofilizados, y similares. En un caso, la composición sólida es un polvo liofilizado. Tal sistema liofilizado disperso comprende una multitud de partículas de polvo, y debido al procedimiento de liofilización utilizado en la formación del polvo, cada partícula tiene una microestructura irregular, porosa a través de la cual el polvo es capaz de absorber agua muy rápidamente, dando como resultado su rápida disolución. En otros casos, la composición sólida es una formulación espolvoreable.

10 Otro tipo de sistema multiparticulado que también es capaz de lograr la rápida disolución del fármaco es el de polvos, gránulos, o bolitas de excipientes solubles en agua que recubiertos con los ingredientes de la composición (p. ej., enzimas), de manera que las enzimas se localizan en la superficie externa de las partículas individuales. En este tipo de sistema, el excipiente de bajo peso molecular soluble en agua es útil para preparar los núcleos de tales partículas recubiertas, que se pueden recubrir a continuación con una composición de recubrimiento que comprende una o varias enzimas y, preferiblemente, uno o más excipientes adicionales, tales como un aglutinante, un formador de poros, un sacárido, un alcohol de azúcar, un polímero formador de película, un plastificante, o otros excipientes utilizados en composiciones farmacéuticas de recubrimiento.

15 Las dosificaciones apropiadas para tratar o prevenir las infecciones por *S. aureus* dependerán del paciente (especie, edad, peso, salud), la gravedad de la enfermedad, la cepa de *S. aureus* presente, el tipo de formulación (p. ej., líquida o pomada) y otros factores conocidos por los expertos normales en la técnica. Se debe observar que las concentraciones y los valores de dosificación pueden variar con la gravedad de la afección que se vaya a aliviar. Se debe entender adicionalmente que para cualquier paciente concreto, los regímenes de dosificación específicos se deben ajustar a lo largo del tiempo de acuerdo con la necesidad individual y el criterio profesional de la persona que administre o supervise la administración de las composiciones.

20 En algunos casos, la composición farmacéutica comprende por dosis: amilasas de aproximadamente 10.000 a aproximadamente 60.000 U.S.P, incluyendo 10.000, 15.000, 20.000, 25.000, 30.000, 35.000, 40.000, 45.000, 50.000, 55.000, y 60.000 U.S.P, junto con todos los valores intermedios, proteasas de aproximadamente 10.000 a aproximadamente 70.000 U.S.P, incluyendo 10.000, 15.000, 20.000, 25.000, 30.000, 35.000, 40.000, 45.000, 50.000, 55.000, 60.000, 65.000, y 70.000, junto con todos los valores intermedios, y lipasas de aproximadamente 4.000 a aproximadamente 30.000 U.S.P, incluyendo, 4.000, 5.000, 10.000, 15.000, 20.000, 25.000, y 30.000, junto con todos los valores intermedios. Una composición farmacéutica puede incluir una o más de: quimotripsina de aproximadamente 2 a aproximadamente 5 mg incluyendo 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, y 5,0 mg, junto con todos los valores intermedios; tripsina de aproximadamente 60 a aproximadamente 100 mg incluyendo 50, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, y 100 mg, incluyendo todos los valores intermedios; papaína de aproximadamente 3.000 a aproximadamente 10.000 unidades USP incluyendo 3.000, 4.000, 5.000, 6.000, 7.000, 8.000, 9.000, y 10.000 USP, junto con todos los valores intermedios; y papaya de aproximadamente 30 a aproximadamente 60 mg, incluyendo 30, 35, 40, 45, 50, 55, y 60 mg, junto con todos los valores intermedios.

Más abajo se proporciona información adicional sobre las formas de dosificación concretas de las composiciones.

#### 40 **1. Composiciones para administración oral**

Las formas de dosificación farmacéuticas orales son sólidas, en gel o líquidas. Las formas de dosificación sólidas son comprimidos, cápsulas, gránulos, y polvos a granel. Los tipos de comprimidos orales incluyen grageas y comprimidos, masticables que pueden tener recubrimiento entérico, recubrimiento de azúcar o recubrimiento de película. Las cápsulas pueden ser cápsulas de gelatina duras o blandas, mientras que los gránulos y polvos se pueden proporcionar en forma no efervescente o en forma efervescente con la combinación de otros ingredientes conocidos por los expertos en la técnica.

##### **a. Composiciones sólidas para administración oral**

50 En ciertos casos, las formulaciones son formas de dosificación sólidas, en una realización, cápsulas o comprimidos. Los comprimidos, píldoras, cápsulas, trociscos y similares pueden contener uno o más de los siguientes ingredientes, o compuestos de una naturaleza similar: un aglutinante; un lubricante; un diluyente; un antiapelmazante; un agente disgregante; un agente colorante; un agente edulcorante; un agente aromatizante; un agente humectante; un recubrimiento emético; y un recubrimiento de película. Los ejemplos de los aglutinantes incluyen celulosa microcristalina, goma de tragacanto, solución de glucosa, mucilago de acacia, solución de gelatina, melazas, polvinilpirrolidina, povidona, crospovidonas, sacarosa y pasta de almidón. Los lubricantes incluyen talco, almidón, estearato de magnesio o calcio, lycopodio y ácido esteárico. Los diluyentes incluyen, por ejemplo, lactosa, sacarosa, almidón, caolín, sal, manitol y fosfato dicálcico. Los antiapelmazantes incluyen, pero no se limitan a, dióxido de silicio coloidal. Los agentes disgregantes incluyen croscarmelosa sódica, glicolato de almidón sódico, ácido algínico, almidón de maíz, almidón de patata, bentonita, metilcelulosa, agar y carboximetilcelulosa. Los

agentes colorantes incluyen, por ejemplo, cualquiera de los colorantes FD y C solubles en agua certificados aprobados, mezclas de los mismos; y colorantes FD y C insolubles en agua suspendidos en hidrato de alúmina. Los agentes edulcorantes incluyen sacarosa, lactosa, manitol y agentes edulcorantes artificiales tales como sacarina, y cualquier número de aromas sometidos a secado mediante pulverización. Los agentes aromatizantes incluyen aromas naturales extraídos de plantas tales como frutas y combinaciones sintéticas de compuestos que producen una sensación agradable, tales como, pero no limitados a menta y salicilato de metilo. Los agentes humectantes incluyen monoestearato de propilenglicol, monooleato de sorbitán, monolaurato de dietilenglicol y polioxietileno lauril éter. Los recubrimientos eméticos incluyen ácidos grasos, grasas, ceras, goma laca, goma laca amoniacal y acetato ftalato de celulosa. Los recubrimientos de película incluyen hidroxietilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica, polietilenglicol 4000 y acetato ftalato de celulosa.

Las enzimas digestivas se pueden proporcionar en una composición que las protege del entorno ácido del estómago. Por ejemplo, la composición se puede formular en un recubrimiento entérico que mantiene su integridad en el estómago y libera las enzimas digestivas en el intestino. La composición también se puede formular combinada con un antiácido u otro de tales ingredientes.

Cuando la forma unitaria de dosificación es una cápsula, ésta puede contener, además del material del tipo anterior, un portador líquido tal como un aceite graso. Además, las formas unitarias de dosificación pueden contener otros diversos materiales que modifican la forma física de la unidad de dosificación, por ejemplo, recubrimientos de azúcar y otros agentes entéricos. Las enzimas digestivas también se pueden administrar como un componente de un elixir, suspensión, jarabe, oblea, espolvoreable, chicle o similar. Un jarabe puede contener, además de las enzimas digestivas activas, sacarosa como agente edulcorante y ciertos conservantes, tintes y colorantes y aromas.

Las enzimas digestivas también se pueden mezclar con otras sustancias activas que no confieren la acción deseada, o con sustancias que complementan la acción deseada, tales como antiácidos, bloqueadores H<sub>2</sub>, y diuréticos. Se pueden incluir concentraciones superiores, hasta aproximadamente 98% en peso de las enzimas digestivas.

En todas las realizaciones, las formulaciones en comprimidos y en cápsulas se pueden recubrir como conocen los expertos en la técnica con el fin de modificar o mantener la disolución de las enzimas digestivas. De este modo, por ejemplo, se pueden recubrir con un recubrimiento digerible entéricamente convencional, tal como salicilato de fenilo, ceras y acetato ftalato de celulosa.

#### **b. Composiciones líquidas para administración oral**

Las formas de dosificación oral líquidas incluyen soluciones, emulsiones, suspensiones acuosas, soluciones y/o suspensiones reconstituidas a partir de gránulos no efervescentes y preparaciones efervescentes reconstituidas a partir de gránulos efervescentes. Las soluciones acuosas incluyen, por ejemplo, elixires y jarabes. Las emulsiones son de aceite en agua o de agua en aceite.

Los elixires son preparaciones hidroalcohólicas, edulcoradas, transparentes. Los portadores farmacéuticamente aceptables utilizados en los elixires incluyen disolventes. Los jarabes son soluciones acuosas concentradas de un azúcar, por ejemplo, sacarosa, y pueden contener un conservante. Una emulsión es un sistema de dos fases en el que un líquido es dispersado en forma de pequeños glóbulos a través de otro líquido. Los portadores farmacéuticamente aceptables utilizados en las emulsiones son líquidos no acuosos, agentes emulsionantes y conservantes. Las suspensiones utilizan agentes suspensores y conservantes farmacéuticamente aceptables. Las sustancias farmacéuticamente utilizadas en los gránulos no efervescentes, que se van a reconstituir en una forma de dosificación oral líquida, incluyen diluyentes, edulcorantes y agentes humectantes. Las sustancias farmacéuticamente aceptables utilizadas en los gránulos efervescentes, que se van a reconstituir en una forma de dosificación oral líquida, incluyen ácidos orgánicos y una fuente de dióxido de carbono. Los agentes colorantes y aromatizantes se utilizan en todas las formas de dosificación anteriores.

Los disolventes incluyen glicerina, sorbitol, alcohol etílico y jarabe. Los ejemplos de los conservantes incluyen glicerina, metil y propilparabenos, ácido benzoico, benzoato sódico y alcohol. Los ejemplos de los líquidos no acuosos utilizados en las emulsiones incluyen aceite mineral y aceite de semilla de algodón. Los ejemplos de los agentes emulsionantes incluyen gelatina, acacia, tragacanto, bentonita, y tensioactivos tales como monooleato de polioxietileno sorbitán. Los agentes suspensores incluyen carboximetilcelulosa sódica, pectina, tragacanto, Veegum y acacia. Los agentes edulcorantes incluyen sacarosa, jarabes, glicerina y agentes edulcorantes artificiales tales como sacarina. Los agentes humectantes incluyen monoestearato de propilenglicol, monooleato de sorbitán, monolaurato de dietilenglicol y polioxietileno lauril éter. Los ácidos orgánicos incluyen ácido cítrico y tartárico. Las fuentes de dióxido de carbono incluyen bicarbonato de sodio y carbonato de sodio. Los agentes colorantes incluyen cualquiera de los colorantes FD y C solubles en agua certificados y aprobados, y mezclas de los mismos. Los agentes aromatizantes incluyen aromas naturales extraídos de plantas tales como frutas, y combinaciones sintéticas de compuestos que producen una sensación de sabor agradable.

Para una forma de dosificación sólida, la solución o suspensión, en por ejemplo carbonato de propileno, aceites vegetales o triglicéridos, están en una realización encapsulada en una cápsula de gelatina. Tales soluciones, y su

preparación y encapsulación, se describen en las Patentes de Estados Unidos Núm. 4.328.245; 4.409.239; y 4.410.545. Para una forma de dosificación líquida, la solución, por ejemplo, en polietilenglicol, se puede diluir con una cantidad suficiente de un portador líquido farmacéuticamente aceptable, p. ej., agua, para medirla fácilmente para su administración.

5 Alternativamente, se pueden preparar formulaciones orales líquidas o semisólidas disolviendo o dispersando las enzimas digestivas en aceites vegetales, glicoles, triglicéridos, ésteres de propilenglicol (p. ej., carbonato de propileno) y otros de tales portadores, y encapsulando estas soluciones o suspensiones en cubiertas de cápsulas de gelatina duras o blandas. Otras formulaciones útiles incluyen las mostradas en las Patentes de Estados Unidos Núm. RE28.819 y 4.358.603. En resumen, tales formulaciones incluyen, pero no se limitan a, aquellas que contienen  
10 las enzimas digestivas proporcionadas en la presente memoria, un mono- o poli-alquilenglicol dialquilado, incluyendo, pero sin limitarse a, 1,2-dimetoximetano, diglima, triglima, tetraglima, dimetiléter de polietilenglicol-350, dimetiléter de polietilenglicol-550, dimetiléter de polietilenglicol-750 en donde 350, 550 y 750 se refieren al peso molecular medio aproximado del polietilenglicol, y uno o más antioxidantes, tales como hidroxitolueno butilado (BHT), hidroxianisol butilado (BHA), galato de propilo, vitamina E, hidroquinona, hidroxycumarinas, etanolamina, lecitina, cefalina, ácido ascórbico, ácido málico, sorbitol, ácido fosfórico, ácido tiodipropiónico y sus ésteres, y  
15 ditiocarbamatos.

Otras formulaciones incluyen, pero no se limitan a, disoluciones alcohólicas acuosas incluyendo un acetal farmacéuticamente aceptable. Los alcoholes utilizados en estas formulaciones son disolventes miscibles con agua farmacéuticamente aceptables cualesquiera que tienen uno o más grupos hidroxilo, incluyendo, pero sin limitarse a,  
20 propilenglicol y etanol. Los acetales incluyen, pero no se limitan a, di(alquil inferior)acetales de alquil-aldehídos inferiores tales como dietilacetal de acetaldehído.

## 2. Inyectables, soluciones y emulsiones

La administración parenteral, en una realización caracterizada por la inyección, por vía subcutánea, intramuscular o intravenosa también es contemplada en la presente memoria. Los inyectables se pueden preparar en las formas  
25 convencionales, en forma de soluciones o suspensiones líquidas, formas sólidas adecuadas para solución o suspensión en líquido antes de su inyección, o en forma de emulsiones. Los inyectables, soluciones y emulsiones también contienen uno o más excipientes. Los excipientes adecuados son, por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa, glicerol o etanol. Además, si se desea, las composiciones farmacéuticas que se van a administrar pueden contener también cantidades mínimas de sustancias auxiliares no tóxicas tales como agentes humectantes o  
30 emulsionantes, agentes tamponadores del pH, estabilizantes, potenciadores de la solubilidad, y otros de tales agentes, tales como por ejemplo, acetato de sodio, monolaurato de sorbitán, oleato de trietanolamina y ciclodextrinas.

La implantación de un sistema de liberación lenta o de liberación sostenida, de manera que se mantenga un nivel de dosificación constante (véase, p. ej., la Patente de Estados Unidos Núm. 3.710.795) también se contempla en la  
35 presente memoria. En resumen, las enzimas digestivas proporcionadas en la presente memoria se dispersan en una matriz interna sólida, p. ej., poli(metacrilato de metilo), poli(metacrilato de butilo), poli(cloruro de vinilo) plastificado o no plastificado, nailon plastificado, poli(tereftalato de etileno) plastificado, caucho natural, poliisopreno, poliisobutileno, polibutadieno, polietileno, copolímeros de etileno-acetato de vinilo, cauchos de silicona, polidimetilsiloxanos, copolímeros de carbonato de silicona, polímeros hidrófilos tales como hidrogeles de ésteres de ácido acrílico y metacrílico, colágeno, poli(alcohol vinílico) entrecruzado y poli(acetato de vinilo) parcialmente  
40 hidrolizado entrecruzado, que está rodeada de una membrana polimérica externa, p. ej., polietileno, polipropileno, copolímeros de etileno/propileno, copolímeros de etileno/acrilato de etilo, copolímeros de etileno/acetato de vinilo, cauchos de silicona, polidimetilsiloxanos, caucho de neopreno, polietileno clorado, poli(cloruro de vinilo), copolímeros de cloruro de vinilo con acetato de vinilo, cloruro de vinilideno, etileno y propileno, ionómero de tereftalato de polietileno, caucho butílico, cauchos de epiclorhidrina, copolímero de etileno/alcohol vinílico, terpolímero de etileno/acetato de vinilo/alcohol vinílico, y copolímero de etileno/viniloxietanol, que es insoluble en los fluidos corporales. Las enzimas digestivas se difunden a través de la membrana polimérica externa en una etapa de control de la velocidad de liberación. El porcentaje de enzimas digestivas contenidas en tales composiciones parenterales es altamente dependiente de su naturaleza específica, así como de la actividad de la enzima digestiva  
45 o de sus mezclas y de las necesidades del sujeto.

La administración parenteral de las composiciones incluye administraciones intravenosa, subcutánea e intramuscular. Las preparaciones para administración parenteral incluyen soluciones estériles listas para su inyección, productos solubles secos estériles, tales como polvos liofilizados, listos para ser combinados con un disolvente inmediatamente antes de su uso, incluyendo comprimidos hipodérmicos, suspensiones estériles listas  
55 para su inyección, productos insolubles secos estériles listos para ser combinados con un vehículo inmediatamente antes de su uso y emulsiones estériles. Las soluciones pueden ser acuosas o no acuosas.

Si se administran intravenosamente, los portadores adecuados incluyen solución salina fisiológica o solución salina tamponada con fosfato (PBS), y soluciones que contienen agentes espesantes y solubilizantes, tales como glucosa, polietilenglicol, y polipropilenglicol y mezclas de los mismos.

Los portadores farmacéuticamente aceptables utilizados en las preparaciones parenterales incluyen vehículos acuosos, vehículos no acuosos, agentes antimicrobianos, agentes isotónicos, tampones, antioxidantes, anestésicos locales, agentes suspensores y dispersantes, agentes emulsionantes, agentes secuestrantes o quelantes y otras sustancias farmacéuticamente aceptables.

- 5 Los ejemplos de los vehículos acuosos incluyen Inyectable de Cloruro de Sodio, Inyectable de Ringer, Inyectable de Dextrosa Isotónica, Inyectable de Agua Estéril, Inyectable de Dextrosa y de Ringer con Lactato añadido. Los vehículos parenterales no acuosos incluyen aceites fijados de origen vegetal, aceite de semilla de algodón, aceite de maíz, aceite de sésamo y aceite de cacahuete. Se deben añadir agentes antimicrobianos a concentraciones bacteriostáticas o fungistáticas a las preparaciones parenterales envasadas en contenedores de dosis múltiples que incluyen fenoles o cresoles, mercuriales, alcohol bencílico, clorobutanol, ésteres de ácido metil y propil p-hidroxibenzoico, timerosal, cloruro de benzalconio y cloruro de benzetonio. Los agentes isotónicos incluyen cloruro de sodio y dextrosa. Los tampones incluyen fosfato y citrato. Los antioxidantes incluyen bisulfato de sodio. Los anestésicos locales incluyen hidrocloreuro de procaína. Los agentes suspensores y dispersantes incluyen carboximetilcelulosa sódica, hidroxipropilmetilcelulosa y polivinilpirrolidona. Los agentes emulsionantes incluyen Polisorbato 80 (TWEEN® 80). Los agentes secuestrantes o quelantes de iones metálicos incluyen EDTA. Los portadores farmacéuticos también incluyen alcohol etílico, polietilenglicol y propilenglicol para vehículos miscibles con agua; e hidróxido de sodio, ácido clorhídrico, ácido cítrico o ácido láctico para el ajuste de pH.

Las preparaciones parenterales de dosis unitaria se envasan en una ampolla, un vial o una jeringa con una aguja. Todas las preparaciones para administración parenteral deben ser estériles, como se sabe y practica en la técnica.

- 20 Ilustrativamente, la infusión intravenosa o intraarterial de una solución acuosa estéril que contiene enzimas digestivas es un modo de administración eficaz. Otra realización es una solución o suspensión acuosa u oleosa estériles que contienen enzimas digestivas que pueden ser inyectadas cuando sea necesario para producir el efecto farmacológico deseado.

- 25 Los inyectables se diseñan para administración local o sistémica. En una realización, una dosificación terapéuticamente eficaz se formula para que contenga una concentración de al menos aproximadamente 0,1% p/p a aproximadamente 90% p/p o más, en ciertas realizaciones más de 1% p/p de las enzimas digestivas para el tejido o tejidos tratados.

- 30 Las enzimas digestivas se pueden suspender en una forma micronizada u otra forma adecuada o se puede derivatizar para producir un producto activo más soluble. La forma de la mezcla resultante depende de diversos factores, incluyendo el modo de administración deseado y la solubilidad de las enzimas digestivas en el portador o vehículo seleccionados. La concentración eficaz es suficiente para mejorar los síntomas de la afección y se puede determinar empíricamente.

### 3. Polvos liofilizados

- 35 También tienen interés en la presente memoria los polvos liofilizados, que pueden ser reconstituidos para su administración en forma de soluciones, emulsiones y otras mezclas. También se pueden reconstituir y formular en forma de sólidos o geles.

- 40 El polvo liofilizado, estéril se prepara disolviendo las enzimas digestivas proporcionadas en la presente memoria en un disolvente adecuado. El disolvente puede contener un excipiente que mejora la estabilidad u otro componente farmacológico del polvo o solución reconstituida, preparada a partir del polvo. Los excipientes que se pueden utilizar incluyen, pero no se limitan a, dextrosa, sorbital, fructosa, jarabe de maíz, xilitol, glicerina, glucosa, sacarosa u otro agente adecuado. El disolvente puede contener también un tampón, tal como citrato, fosfato de sodio o potasio u otro de tales tampones conocidos por los expertos en la técnica, en una realización, a aproximadamente pH neutro. La posterior filtración en condiciones estériles de la solución seguida de liofilización en condiciones convencionales conocidas por los expertos en la técnica proporciona la formulación deseada. En una realización, la solución resultante será repartida en viales para liofilización. Cada vial contendrá una sola dosificación o múltiples dosificaciones de las enzimas digestivas. El polvo liofilizado se puede almacenar en condiciones apropiadas, por ejemplo de aproximadamente 4°C a temperatura ambiente.

- 50 La reconstitución de este polvo liofilizado con agua para inyectables proporciona una formulación para su uso en la administración parenteral. Para su reconstitución, el polvo liofilizado se añade a agua estéril u otro portador adecuado. La cantidad precisa depende de las enzimas digestivas seleccionadas. Tal cantidad se puede determinar empíricamente.

### 4. Administración tópica

- 55 Se pueden preparar mezclas tópicas como se describe para la administración local y sistémica. La mezcla resultante puede ser una solución, suspensión, emulsión o similares y se formula en forma de cremas, geles, pomadas, emulsiones, polvos, soluciones, elixires, lociones, suspensiones, tinturas, pastas, espumas, aerosoles, irrigaciones, pulverizaciones, supositorios, apósitos, parches dérmicos o cualquier otra formulación adecuada para la administración tópica.

Las enzimas digestivas se pueden formular en forma de aerosoles para aplicación tópica, tal como mediante inhalación (véanse, p. ej., las Patentes de Estados Unidos Núm. 4.044.126, 4.414.209, y 4.364.923, que describen aerosoles para la liberación de un esteroide útil para el tratamiento de enfermedades inflamatorias, particularmente asma). Estas formulaciones para administración al tracto respiratorio pueden estar en forma de un aerosol o solución para un nebulizador, o en forma de polvo microfino para insuflación, solo o combinado con un portador inerte tal como lactosa. En tal caso, las partículas de la formulación tendrán, en una realización, diámetros de menos de 50 micras, en una realización menos de 10 micras.

Las enzimas digestivas se pueden formular para aplicación local o tópica, tal como para aplicación tópica a la piel y membranas mucosas, tal como en el ojo, en forma de geles, cremas, y lociones y para aplicación al ojo o para aplicación intracisternal o intraespinal. La administración tópica se contempla para el suministro transdérmico y también para la administración a los ojos o la mucosa, o para terapias mediante inhalación. También se pueden administrar soluciones nasales de las enzimas digestivas solas o combinadas con otros excipientes farmacéuticamente aceptables.

Estas soluciones, particularmente aquellas destinadas a uso oftálmico, se pueden formular en forma de soluciones isotónicas al 0,01% - 10%, pH de aproximadamente 5-7, con sales apropiadas.

Los polvos se pueden formar con la ayuda de cualquier base para polvo adecuada, p. ej., talco, lactosa, almidón, y similares. Las soluciones se pueden formular con una base acuosa o no acuosa, y también pueden incluir uno o más agentes dispersantes, agentes suspensores, agentes solubilizantes, y similares. Los geles tópicos se preparan utilizando polímeros que tienen peso molecular y nivel de concentración eficaz para formar una solución viscosa o gel coloidal de una solución o suspensión acuosa o no acuosa de enzimas digestivas. Los polímeros a partir de los cuales se pueden preparar geles tópicos incluyen polifosfoésteres, polietilenglicoles, poli(ácido láctico) de alto peso molecular, hidroxipropilcelulosas, quitosano, poliestirensulfonatos, y similares.

Las pomadas, cremas y lociones se formulan, por ejemplo, con una base acuosa u oleosa y adición de un agente espesante, agente gelificante, agente estabilizante, agente emulsionante, agente dispersante, agente suspensor, o agente regulador de la consistencia adecuados, y similares. Las bases incluyen agua, un alcohol o un aceite, tal como parafina líquida, aceite mineral, o un aceite vegetal, tal como aceite de cacahuete o de ricino. Los agentes espesantes que se pueden utilizar de acuerdo con la naturaleza de la base incluyen parafina blanda, estearato de aluminio, alcohol cetosteárico, propilenglicol, polietilenglicoles, polifosfoésteres, poli(ácido láctico), hidroxietilcelulosas, hidroxipropilcelulosas, gomas de celulosa, polímeros de acrilato, agentes gelificantes hidrófilos, quitosano, poliestirensulfonato, vaselina, grasa de lana, lanolina hidrogenada, cera de abejas, y similares.

Las pomadas, pastas, cremas, geles, y lociones pueden contener también excipientes, tales como grasas animales y vegetales, aceites, ceras, parafinas, almidón, tragacanto, derivados de celulosa, polietilenglicoles, siliconas, bentonitas, ácido silícico, talco, óxido de cinc, y mezclas de los mismos. Los polvos y las pulverizaciones pueden contener también excipientes tales como ácido silícico, hidróxido de aluminio, silicatos de calcio y polvo de poliamida, o mezclas de estas sustancias. Las soluciones, suspensiones o dispersiones se pueden convertir en aerosoles o pulverizaciones por cualquiera de los medios conocidos utilizados rutinariamente para preparar aerosoles para aplicación tópica. En general, tales métodos comprenden presurizar o proporcionar un medio para presurizar un contenedor de una solución, suspensión o dispersión, usualmente con un gas portador inerte, y hacer pasar el gas presurizado a través de un orificio pequeño. Los pulverizadores y aerosoles pueden contener también propelentes habituales, p. ej., clorofluorohidrocarburos o hidrocarburos no sustituidos volátiles, tales como butano y propano.

Los excipientes incluyen compuestos que promueven la absorción por la piel, tales como dimetil sulfóxido (DMSO), glicéridos parciales de ácidos grasos, y similares, presentes a niveles de hasta aproximadamente 10% en peso del peso de la fórmula total. Los ejemplos de los glicéridos parciales de ácidos grasos incluyen, pero no se limitan a IMWITOR 742 y IMWITOR 308 disponibles en SASOL North America, Inc. de Houston, Tex. Las formulaciones tópicas también pueden incluir opcionalmente ingredientes inactivos para mejorar la aceptabilidad cosmética, incluyendo pero no limitados a, humectantes, tensioactivos, fragancias, agentes colorantes, emolientes, cargas, y similares.

Las composiciones tópicas también pueden incluir otros agentes antibióticos, cuyos ejemplos incluyen bacitracina, neomicina, polimixina, beta-lactamas, incluyendo penicilina, metilicina, moxalactama y cefalosporinas, tales como cefaclor, cefadroxil, cefamandol nafato, cefazolina, cefixima, cefinetazol, cefonicid, cefoperazona, ceforanida, cefotanme, cefotaxima, cefotetan, cefoxitina, cefpodoxima proxetil, ceftazidima, ceftizoxima, ceftriaxona, cefriaxona, cefuroxima, cefalexina, cefalosporina C, sal sódica de cefalosporina C, cefalotina, sal sódica de cefalotina, cefalotina dihidrato, cefapirina, cefradina, cefuroxima axetilo, loracarbef, y similares. Esencialmente se puede utilizar cualquier agente anti-infeccioso/antibiótico que sea eficaz cuando se aplique tópicamente. De este modo, los métodos de la presente invención tanto para el tratamiento de infecciones activas como para la descolonización de poblaciones de patógenos de la piel incluyen métodos en los que las enzimas digestivas se aplican de manera singular o combinadas, ya sea sin otro agente anti-infeccioso, ya sea con al menos otro agente anti-infeccioso.

Las composiciones tópicas se pueden administrar directamente mediante espolvoreo de un polvo, pulverización de un aerosol o distribución de una película de una pomada, crema, loción, solución o gel en la zona deseada de la piel utilizando las puntas de los dedos del paciente o de un profesional sanitario u otra aplicación convencional tal como un hisopo o una toallita. El producto se puede aplicar primero a la piel y extender con las puntas de los dedos o un aplicador o se puede aplicar a las puntas de los dedos y extender sobre la piel. Las composiciones también se pueden aplicar primero como recubrimiento sobre la superficie de un aplicador tópico, tal como un apósito, hisopo, toallita tejida o no tejida húmeda y similares, que a continuación se aplica a la porción de la piel que va a recibir la composición.

Las composiciones tópicas de la presente invención se pueden preparar con formulaciones base que son esencialmente convencionales para un experto normal en la técnica con respecto a los ingredientes empleados, las cantidades de los mismos, y los métodos de preparación, ninguno de los cuales requiere una descripción adicional. Las composiciones tópicas de acuerdo con la presente invención también se pueden preparar en forma de una crema o loción basada en una formulación en emulsión que posee una actividad bactericida no reconocida hasta ahora, además de una buena compatibilidad con la piel y propiedades de curación de heridas que sea particularmente adecuada para la formulación con enzimas digestivas.

Como se ha comentado anteriormente, la presente invención no se limita a formulaciones tópicas en crema o gel. Las formulaciones tópicas basadas en pulverizaciones, nieblas, aerosoles, lociones, cremas, soluciones acuosas y no acuosas o líquidos, aceites, geles, pomadas, pastas, ungüentos, emulsiones y suspensiones convencionales contendrán una cantidad de enzimas digestivas, y opcionalmente uno o más agentes anti-infecciosos diferentes, a una concentración total de entre aproximadamente 0,125 y aproximadamente 10% en peso o más, reconociendo de nuevo que las dosificaciones óptimas pueden diferir solamente en 0,05% en peso, de manera que las realizaciones en crema y loción representativas incluirán incrementos de concentración de 0,05% en peso cada uno dentro de este intervalo.

Las composiciones tópicas de la presente invención se utilizan para tratar infecciones de la piel e infecciones de heridas tales como heridas superficiales, y heridas penetrantes. Las heridas adecuadas para el tratamiento incluyen heridas por abrasiones de la piel, cortes de la piel o superficiales, de decúbito, quemaduras y heridas quirúrgicas. Las composiciones tópicas de la presente invención se pueden utilizar también para descolonizar poblaciones de bacteria *S. aureus* para evitar las infecciones secundarias, incluyendo el pre-tratamiento de zonas antes de la cirugía o la inserción de catéteres.

Las formulaciones de suministro mucosal pueden incluir enzimas digestivas como las descritas en la presente memoria combinadas o administradas de manera coordinada con un portador o vehículo adecuados para el suministro mucosal. Según se utiliza en la presente memoria, el término "portador" representa una carga, diluyente, o material encapsulante sólido o líquido farmacéuticamente aceptable. Un portador líquido que contiene agua puede contener aditivos farmacéuticamente aceptables tales como agentes acidulantes, agentes alcalinizantes, conservantes antimicrobianos, antioxidantes, agentes tamponadores, agentes quelantes, agentes complejantes, agentes solubilizantes, humectantes, disolventes, agentes de suspensión y/o aumentadores de la viscosidad, agentes de tonicidad, agentes humectantes u otros materiales biocompatibles. Se puede encontrar una tabulación de ingredientes enumerados en las categorías anteriores en U.S. Pharmacopeia National Formulary, págs. 1857-1859, 1990. Algunos ejemplos de los materiales que puede servir como portadores farmacéuticamente aceptables son los azúcares, tales como lactosa, glucosa y sacarosa; almidones tales como almidón de maíz y almidón de patata; celulosa y sus derivados tales como carboximetil celulosa sódica, etil celulosa y acetato de celulosa; tragacanto pulverizado; malta; gelatina; talco; excipientes tales como manteca de cacao y ceras para supositorios; aceites tales como aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón, aceite de cártamo, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de soja; glicoles, tales como propilenglicol; polioles tales como glicerina, sorbitol, manitol y polietilenglicol; ésteres tales como oelato de etilo y laurato de etilo; agar; agentes tamponadores tales como hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio; ácido alginico; agua libre de pirógenos; solución salina isotónica; solución de Ringer, alcohol metílico y soluciones de tampón fosfato, así como otras sustancias compatibles no tóxicas utilizadas en formulaciones farmacéuticas. También pueden estar presentes en las composiciones agentes humectantes emulsionantes, y lubricantes tales como lauril sulfato de sodio y estearato de magnesio, así como agentes colorantes, agentes de liberación, agentes de recubrimiento, edulcorantes, agentes aromatizantes y perfumantes, conservantes y antioxidantes, de acuerdo con los deseos del formulador. Los ejemplos de los antioxidantes farmacéuticamente aceptables incluyen antioxidantes solubles en agua tales como ácido ascórbico, hidrocloreuro de cisteína, bisulfato de sodio, metabisulfito de sodio, sulfito de sodio y similares; antioxidantes solubles en aceite tales como palmitato de ascorbilo, hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), lecitina, galato de propilo, alfa-tocoferol y similares; y agentes quelantes de metales tales como ácido cítrico, ácido etilendiamino tetraacético (EDTA), sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico y similares. La cantidad de enzimas digestivas que se puede combinar con los materiales portadores para producir una única forma de dosificación variará dependiendo del modo concreto de administración.

Las formulaciones mucosales son generalmente estériles, libres de partículas y estables para uso farmacéutico. Según se utiliza en la presente memoria, el término "libre de partículas" representa una formulación que satisface los requerimientos de la especificación de la USP para disoluciones parenterales de pequeño volumen. El término "estable" representa una formulación que satisface todas las especificaciones químicas y físicas con respecto a la

identidad, fuerza, calidad, y pureza que se han establecido de acuerdo con los principios de Buenas Prácticas de Fabricación, estipuladas por los organismos reguladores gubernamentales apropiados.

5 En las composiciones de suministro mucosal, se pueden emplear diversos agentes potenciadores del suministro que potencian el suministro de enzimas digestivas hacia el interior o a través de una superficie mucosal. Según se utiliza en la presente memoria, los "agentes potenciadores del suministro mucosal" incluyen agentes que potencian el suministro o la solubilidad (p. ej., a partir de un vehículo de suministro de la formulación), la tasa de difusión, capacidad y plazo de penetración, absorción, tiempo de residencia, estabilidad, vida media eficaz, niveles de concentración máxima o sostenida, aclaramiento y otras características de suministro mucosal deseadas (p. ej., medidas en el sitio de suministro, o en un sitio diana de actividad seleccionado tal como el torrente sanguíneo o el sistema nervioso central) de enzimas digestivas u otro compuesto u otros compuestos biológicamente activos. La potenciación del suministro mucosal se puede producir por lo tanto mediante cualquiera de una variedad de mecanismos, por ejemplo aumentando la difusión, el transporte, la persistencia o la estabilidad de las enzimas digestivas, aumentando la fluidez de la membrana, modulando la disponibilidad o la acción del calcio y otros iones que regulan la penetración intracelular o paracelular, solubilizando los componentes de la membrana mucosal (p. ej., lípidos), cambiando los niveles de sulfhidrilo no proteico y proteico en los tejidos mucosales, incrementando el flujo de agua a través de la superficie de la mucosa, modulando la fisiología juntural epitelial, reduciendo la viscosidad del moco que recubre el epitelio mucosal, reduciendo las tasas de aclaramiento mucociliar, y otros mecanismos.

20 Si bien el mecanismo de promoción de la absorción puede variar con los diferentes agentes potenciadores del suministro intranasal de la invención, los reactivos útiles en este contexto no afectarán adversamente de manera sustancial el tejido mucosal y se seleccionarán de acuerdo con las características fisicoquímicas de las enzimas digestivas concretas u otro agente potenciador del suministro o activo. En este contexto, los agentes potenciadores del suministro que incrementan la penetración o la permeabilidad de los tejidos mucosales a menudo darán como resultado cierta alteración de la barrera de permeabilidad protectora de la mucosa. Para que tales agentes de potenciación del suministro, tengan valor en la invención, generalmente se desea que cualquier cambio significativo en la permeabilidad de la mucosa sea reversible en un marco temporal apropiado para la duración deseada de suministro del fármaco. Además, no debe haber una toxicidad cumulativa, sustancial, ni ningún cambio perjudicial permanente inducido en las propiedades de barrera de la mucosa con la utilización a largo plazo.

30 En algunos casos, se seleccionan agentes promotores de la absorción para la administración coordinada o la formulación combinatoria con las enzimas digestivas descritas en la presente memoria entre moléculas hidrófilas pequeñas, incluyendo pero no limitadas a, dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilformamida, etanol, propilenglicol, y las 2-pirrolidonas. Alternativamente, se pueden emplear moléculas anfipáticas de cadena larga, por ejemplo, desacilmetil sulfóxido, azona, lauril sulfato de sodio, ácido oleico, y las sales biliares, para potenciar la penetración mucosal de las enzimas digestivas. En aspectos adicionales, se emplean tensioactivos (p. ej., polisorbatos) como compuestos accesorios, agentes de procesamiento, o aditivos de formulación para potenciar el suministro intranasal de las enzimas digestivas. Estos agentes potenciadores de la penetración interaccionan típicamente en los grupos de cabeza polar o en las regiones de cola hidrófila de moléculas que comprende la bicapa lipídica de las células epiteliales que revisten la mucosa nasal (Barry, *Pharmacology of the Skin*, Vol. 1, págs. 121-137, Shroot et al., Eds., Karger, Basel, 1987; y Barry, *J. Controlled Release* 6:85-97, 1987). La interacción en estos sitios puede tener el efecto de interrumpir el relleno de las moléculas de lípidos, incrementando la fluidez de la bicapa, y facilitando el transporte de las enzimas digestivas a través de la barrera mucosal. La interacción de estos potenciadores de la penetración con los grupos de cabeza polar también pueden causar o permitir que las regiones hidrófilas de las bicapas adyacentes absorban más agua y se separen, abriendo de ese modo la vía paracelular para el transporte de las enzimas digestivas. Además de estos efectos, ciertos potenciadores pueden tener efectos directos sobre las propiedades de volumen de las regiones acuosas de la mucosa nasal. Agentes tales como DMSO, polietileno glicol, y etanol pueden entrar, si están presentes a concentraciones suficientemente elevadas en el entorno de suministro (p. ej., mediante la administración previa o la incorporación a una formulación terapéutica), en la fase acuosa de la mucosa y alterar sus propiedades de solubilización, potenciando de ese modo el reparto de las enzimas digestivas desde el vehículo hacia la mucosa.

50 Otros agentes potenciadores del suministro mucosal que son útiles en los métodos de administración coordinada y procesamiento y en las formulaciones combinatorias de la invención incluyen, pero no se limitan a, micelas mixtas; enaminas; donadores de óxido nítrico (p. ej., S-nitroso-N-acetil-DL-penicilamina, NOR1, NOR4, que se administran preferiblemente de manera simultánea con un captador de NO tal como carboxi-PITO o diclofenaco sódico); salicilato de sodio; ésteres de glicerol de ácido acetoacético (p. ej., gliceril-1,3-diacetoacetato o 1,2-isopropilidenglicerol-3-acetoacetato); y otros agentes de liberación-difusión o promotores de la penetración intra- o trans-epitelial que son fisiológicamente compatibles para el suministro mucosal. Otros agentes promotores de la absorción se seleccionan entre una variedad de portadores, bases y excipientes que potencian el suministro mucosal, la estabilidad, la actividad o la penetración trans-epitelial de las enzimas digestivas. Estos incluyen, entre otros, ciclodextrinas y derivados de 13-ciclodextrina (p. ej., 2-hidroxiopropil-β-ciclodextrina y heptakis(2,6-di-O-metil-β-ciclodextrina). Estos compuestos, opcionalmente conjugados con uno o más de los ingredientes activos y formulados opcionalmente en una base oleaginosa, potencian la biodisponibilidad en las formulaciones mucosales de la invención. Otros agentes potenciadores de la absorción más adaptados para el suministro mucosal incluyen ácidos grasos de cadena media, incluyendo mono- y diglicéridos (p. ej., caprato de sodio-extractos de aceite de coco, Capmul), y triglicéridos (p. ej., amilodextrina, Estaram 299, Migliol 810).

Las composiciones terapéuticas y profilácticas mucosales se pueden complementar con cualquier agente promotor de la penetración adecuado que facilite la absorción, difusión, o penetración de enzimas digestivas a través las barreras mucosales. El promotor de la penetración puede ser cualquier promotor que sea farmacéuticamente aceptable. De este modo, en aspectos más detallados de la invención se proporcionan composiciones que incorporan uno o más agentes promotores de la penetración seleccionados entre salicilato de sodio y derivados de ácido salicílico (p. ej., salicilato de acetilo, salicilato de colina, salicilamida); aminoácidos y sales de los mismos (p. ej. ácidos monoaminocarboxílicos tales como glicina, alanina, fenilalanina, prolina, hidroxiprolina; hidroxiaminoácidos tales como serina; aminoácidos tales como ácido aspártico, ácido glutámico; y aminoácidos alcalinos tales como lisina, incluyendo sus sales de metales alcalinos o alcalinotérreos); y N-acetilaminoácidos (N-acetilalanina, N-acetilfenilalanina, N-acetilserina, N-acetilglicina, N-acetilisina, ácido N-acetilglutámico, N-acetilprolina, N-acetilhidroxiprolina, etc.) y sus sales (sales de metales alcalinos y sales de metales alcalinotérreos). También se proporcionan como agentes promotores de la penetración en los métodos y composiciones de la invención sustancias que se utilizan generalmente como emulsionantes (p. ej. oleilfosfato de sodio, laurilfosfato de sodio, laurilsulfato de sodio, miristilsulfato de sodio, polioxietilén alquil éteres, polioxietilén alquil ésteres, etc.), ácido caproico, ácido láctico, ácido málico y ácido cítrico y sales de metales alcalinos de los mismos, ácidos pirrolidinocarboxílicos, ésteres de ácidos alquilpirrolidoncarboxílicos, N-alquilpirrolidonas, ésteres acílicos de prolina, y similares.

### 5. Composiciones para otras vías de administración

También se contemplan en la presente memoria otras vías de administración, tales como parches transdérmicos, incluyendo dispositivos iontoforéticos y electroforéticos, y administración rectal.

Los parches transdérmicos, incluyendo los dispositivos iontoforéticos y electroforéticos, son bien conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, tales parches se describen en las Patentes de los Estados Unidos Núms. 6.267.983, 6.261.595, 6.256.533, 6.167.301, 6.024.975, 6.010.715, 5.985.317, 5.983.134, 5.948.433, y 5.860.957.

Por ejemplo, las formas de dosificación farmacéutica para la administración rectal son los supositorios rectales, las cápsulas y los comprimidos con efecto sistémico. Los supositorios rectales que se utilizan en la presente memoria representan cuerpos sólidos para la inserción en el recto que se funden o se reblandecen a la temperatura corporal liberando uno o más ingredientes farmacológicamente o terapéuticamente activos. Las sustancias farmacéuticamente aceptables utilizadas en los supositorios rectales son bases o vehículos y agentes para elevar el punto de fusión. Los ejemplos de las bases incluyen manteca de cacao (aceite de teobroma), glicerina-gelatina, Carbowax (polioxietilenglicol) y mezclas apropiadas de mono-, di- y triglicéridos de ácidos grasos. Se pueden utilizar combinaciones de las diversas bases. Los agentes para elevar el punto de fusión de los supositorios incluyen espermaceti y cera. Los supositorios rectales se pueden preparar mediante un método de compresión o mediante moldeo. El peso de un supositorio rectal, en una realización, es de aproximadamente 2 a 3 gm.

Los comprimidos y las cápsulas para la administración rectal se fabrican utilizando la misma sustancia farmacéuticamente aceptable y mediante los mismos métodos que para las formulaciones para la administración oral.

### 6. Formulaciones de liberación sostenida

También se proporcionan formulaciones de liberación sostenida para suministrar las enzimas digestivas a la diana deseada. Se entiende que los niveles de las enzimas digestivas se mantienen durante un cierto período de tiempo según se desee y pueden ser fácilmente determinados por un experto en la técnica. Tales formulaciones de liberación sostenida y/o controlada se pueden elaborar mediante métodos de liberación sostenida de dispositivos de suministro que son bien conocidos por los expertos normales en la técnica, tales como los descritos en las Patentes de los Estados Unidos Núms. 3.845.770; 3.916.899; 3.536.809; 3.598.123; 4.008.719; 4.710.384; 5.674.533; 5.059.595; 5.591.767; 5.120.548; 5.073.543; 5.639.476; 5.354.556 y 5.733.566. Estas composiciones farmacéuticas se pueden utilizar para proporcionar la liberación lenta o sostenida de una o más enzimas digestivas utilizando, por ejemplo, hidroxipropilmetil celulosa, otras matrices poliméricas, geles, membranas permeables, sistemas osmóticos, recubrimientos de múltiples capas, micropartículas, liposomas, microesferas, o similares. Las formulaciones de liberación sostenida adecuadas conocidas por los expertos en la técnica, incluyendo aquellas descritas en la presente memoria, se pueden seleccionar fácilmente para su uso con las composiciones farmacéuticas proporcionadas en la presente memoria. De este modo, las formas de dosificación unitaria individuales adecuadas para la administración oral, tales como, pero no limitadas a, comprimidos, cápsulas, cápsulas de gel, comprimidos oblongos, polvos y similares, que se adaptan para la liberación sostenida se contemplan en la presente memoria.

En un caso, la formulación de liberación sostenida contiene un compuesto activo tal como, pero no limitado a, celulosa microcristalina, maltodextrina, etilcelulosa, y estearato de magnesio. Como se ha descrito anteriormente, se contemplan en la presente memoria todos los métodos conocidos para la encapsulación que son compatibles con las propiedades de las enzimas digestivas descritas. La formulación de liberación sostenida se encapsula recubriendo partículas o gránulos de las composiciones farmacéuticas proporcionadas en la presente memoria con un grosor variable de polímeros lentamente solubles o mediante microencapsulación. En un caso, la formulación de liberación sostenida se encapsula con un material de recubrimiento de grosor variable (p. ej. de aproximadamente 1

micra a 200 micras) que permite la disolución de la composición farmacéutica de aproximadamente 48 horas a aproximadamente 72 horas después de la administración a un mamífero. En otro caso, el material de recubrimiento es un aditivo alimentario autorizado.

5 En otro caso, la formulación de liberación sostenida es un dispositivo de disolución en matriz que se prepara mediante compresión del fármaco con un portador polimérico lentamente soluble en un comprimido. En un caso, las partículas recubiertas tienen un intervalo de tamaño entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 300 micras, como se describe en las Patentes de los Estados Unidos Núms. 4.710.384 y 5.354.556. Cada una de las partículas está en forma de una micromatriz, con el ingrediente activo distribuido uniformemente por todo el polímero.

10 Las enzimas digestivas proporcionadas en la presente memoria se pueden formular como una formulación de liberación sostenida y/o controlada. Todos los productos farmacéuticos de liberación sostenida tienen el objetivo común de mejorar la terapia con fármacos por encima de lo logrado por sus contrapartes de liberación no sostenida. Idealmente, el uso de una preparación de liberación sostenida óptimamente diseñada en el tratamiento médico se caracteriza por un mínimo de enzimas digestivas que se emplean para curar o controlar una afección. Las ventajas de las formulaciones de liberación sostenida pueden incluir: 1) un actividad ampliada de la composición, 2) una menor frecuencia de dosificación, y 3) una mayor conformidad del paciente. Adicionalmente, las formulaciones de liberación sostenida se pueden utilizar para influir en el tiempo de comienzo de la acción u otras características, tales como los niveles en sangre de la composición, y por lo tanto pueden influir en la aparición de efectos secundarios.

15 Las formulaciones de liberación sostenida proporcionadas en la presente memoria se diseñan para liberar inicialmente una cantidad de la composición terapéutica que produce inmediatamente el efecto terapéutico deseado, y liberar de manera gradual y continua otras cantidades de la composición para mantener este nivel de efecto terapéutico a lo largo de un período de tiempo prolongado. Con el fin de mantener este nivel constante en el organismo, la composición terapéutica debe ser liberada de la forma de dosificación a una velocidad que remplace la composición que está siendo metabolizada y excretada del organismo.

20 La liberación sostenida de un ingrediente activo puede ser estimulada por diversos inductores, por ejemplo pH, temperatura, enzimas, agua, u otras condiciones fisiológicas o compuestos.

25 Las preparaciones para la administración oral se pueden formular adecuadamente para proporcionar una liberación controlada de las enzimas digestivas. En una realización, las enzimas digestivas se formulan como polvos de liberación controlada de micropartículas discretas que pueden ser fácilmente formuladas en forma líquida. El polvo de liberación controlada comprende partículas que contienen un ingrediente activo y opcionalmente, un excipiente con al menos un polímero no tóxico.

30 El polvo puede ser dispersado o suspendido en un vehículo líquido y mantendrá sus características de liberación sostenida durante un período de tiempo útil. Estas dispersiones o suspensiones tienen ambas estabilidad química y estabilidad en términos de velocidad de disolución. El polvo puede contener un excipiente que comprende un polímero, que puede ser soluble, insoluble, permeable, impermeable, o biodegradable. Los polímeros pueden ser polímeros o copolímeros. El polímero puede ser un polímero natural o sintético. Los polímeros naturales incluyen polipéptidos (p. ej., zeína), polisacáridos (p. ej., celulosa), y ácido alginico. Los polímeros sintéticos representativos incluyen aquellos descritos, pero no limitados a, los descritos en la columna 3, líneas 33-45 de la Patente de Estados Unidos Núm. 5.354.556. Los polímeros particularmente adecuados incluyen los descritos, pero no limitados a, los descritos en la columna 3, línea 46, columna 4, línea 8 de la Patente de Estados Unidos Núm. 5.354.556.

35 Las composiciones de liberación sostenida proporcionadas en la presente memoria se pueden formular para la administración parenteral, p. ej., mediante inyecciones intramusculares o implantes para tejidos subcutáneos y diversas cavidades corporales y dispositivos transdérmicos. En una realización, las inyecciones intramusculares se formulan en forma de suspensiones acuosas u oleosas. En una suspensión acuosa, el efecto de liberación sostenida se debe, en parte, a la reducción de la solubilidad de las enzimas digestivas tras la formación de complejos o a una disminución de la velocidad de disolución. Se adopta un enfoque similar con las suspensiones y soluciones oleosas, en donde la velocidad de liberación de las enzimas digestivas se determina repartiendo las enzimas digestivas fuera del aceite en el medio acuoso circundante. Solamente son adecuadas las enzimas digestivas que son solubles en aceite y tienen las características de reparto deseadas. Los aceites que se pueden utilizar para la inyección intramuscular incluyen, pero no se limitan a, aceite de sésamo, oliva, araquís, maíz, almendra, soja, semilla de algodón y ricino.

#### **Administración simultánea con otras composiciones farmacéuticas**

40 Las composiciones farmacéuticas se pueden utilizar por sí mismas, y/o combinadas con otros regímenes terapéuticos o antibióticos (p. ej., *anti-S. aureus*). Por ejemplo, se le pueden administrar a un paciente otros agentes terapéuticos, tales como anti-inflamatorios o anestésicos, para abordar otros aspectos de una infección por *S. aureus* (p. ej., dolor, daño tisular) o incluso otras patologías a las que se puede estar enfrenando el paciente. En otras realizaciones, se le puede administrar a un paciente una composición farmacéutica como las descritas en la presente memoria, y uno o más antibióticos adicionales. Los uno o más antibióticos adicionales pueden ser eficaces contra *S. aureus* u otras bacterias, o ambos (p. ej., si el paciente tiene múltiples infecciones) y pueden estar en el

mismo formato o en formatos diferentes del de las composiciones farmacéuticas de la presente invención (p. ej., uno puede ser un líquido y el otro puede ser un antibiótico tópico). Las principales clases de antibióticos son (1) las  $\beta$ -lactamas, incluyendo las penicilinas, cefalosporinas y monobactamas; (2) los aminoglicósidos, p. ej., gentamicina, tobramicina, netilmicina, y amikacina; (3) las tetraciclinas; (4) las sulfonamidas y trimetoprim; (5) las fluoroquinolonas, p. ej., ciprofloxacino, norfloxacino, y ofloxacino; (6) vancomicina; (7) los macrólidos, que incluyen por ejemplo, eritromicina, azitromicina, y claritromicina; y (8) otros antibióticos, p. ej., las polimixinas, el cloranfenicol y las lincosamidas.

En algunas realizaciones, el antibiótico adicional es un antibiótico de beta-lactama (p. ej., una penicilina o derivados de penicilina, una cefalosporina, una monobactama, un penam, un penemo, un carbapenemo o un carbapenamo, un cefemo, un carbacefemo, un oxacefemo, una monobactama). En algunos casos, el antibiótico adicional puede ser un inhibidor de beta-lactamasa. En algunos casos, el antibiótico adicional puede ser un antibiótico aminoglicosídico. En algunos casos, el antibiótico adicional se selecciona entre penicilina o un derivado de penicilina, oxacilina, amoxicilina, nafcilina, cloxacilina, meticilina, temocilina, ampicilina, co-amoxiclav, azlocilina, carbenicilina, ticarcilina, mezlocilina, piperacilina, cefalexina, cefalotina, cefazolina, cefaclor, cefuroxima, cefamandol, cefotetan, cefoxitina, ceftriaxona, cefotaxima, cefpodoxima, ceftazidima, cefepima, cefpiroma, vancomicina, teicoplanina, telavancina, bleomicina, ramoplanina, decaplanina, oritavancina, y dalbavancina.

Se pueden administrar por separado una composición de antibiótico descrita en la presente memoria y un antibiótico adicional o en una sola forma de dosificación. Si se administran por separado, se pueden administrar en cualquier orden y frecuencia relativa.

### **Desinfectantes e higienizantes**

Las composiciones que comprenden enzimas digestivas como las descritas en la presente memoria también se pueden utilizar como desinfectantes e higienizantes, p. ej., para desinfectar objetos inanimados y superficies, sin limitación, en entornos hospitalarios, domésticos, y comunitarios erradicando, atenuando o reduciendo *S. aureus* en tales localizaciones. Los desinfectantes son agentes antimicrobianos que se aplican a objetos no vivos para destruir microorganismos. Los desinfectantes se deben distinguir generalmente de los antibióticos que destruyen los microorganismos dentro del organismo, y de los antisépticos, que destruyen los microorganismos en los tejidos vivos. Los higienizantes son desinfectantes que reducen el número de microorganismos a un nivel seguro. Una definición de un higienizante establece que un higienizante debe ser capaz de destruir 99,999%, conocido como una reducción log de 5, de una población de ensayo bacteriana específica, y de hacerlo en 30 segundos. La principal diferencia entre un higienizante y un desinfectante es que a una dilución de uso especificada, el desinfectante debe tener mayor capacidad de destrucción para las bacterias patógenas en comparación con la de un higienizante.

Un desinfectante o un higienizante como se describen en la presente memoria pueden incluir enzimas digestivas, en diversas realizaciones como se ha descrito anteriormente, y opcionalmente pueden incluir otros ingredientes activos e inactivos, incluyendo estabilizadores (p. ej., estabilizadores de enzimas), otros desinfectantes conocidos por los expertos normales en la técnica, excipientes de formulación, colorantes, perfumes, etc. Un experto normal en la técnica puede seleccionar los ingredientes activos o inactivos adicionales para incluirlos en un desinfectante. Los ejemplos de los desinfectantes adicionales incluyen: fuentes de cloro activo (es decir, hipocloritos, cloraminas, dicloroisocianurato y tricloroisocianurato, cloro húmedo, dióxido de cloro etc.); fuentes de oxígeno activo (peróxidos, tales como ácido peracético, persulfato de potasio, perborato sódico, percarbonato de sodio y perhidrato de urea); soluciones de yodo y yodóforo (povidona yodada (povidona-yodo, Betadine), solución de Lugol, tintura de yodo, tensioactivos no iónicos yodados); alcoholes concentrados (principalmente etanol, 1-propanol, también denominado n-propanol y 2-propanol, denominado isopropanol y mezclas de los mismos; adicionalmente, 2-fenoxietanol y 1- y 2-fenoxipropanoles); sustancias fenólicas (tales como fenol (también denominado "ácido carbólico"), cresoles (denominados "Lysol" combinados con jabones de potasio líquido), fenoles halogenados (clorados, bromados), tales como hexaclorofeno, triclosan, triclorofenol, tribromofenol, pentaclorofenol, Dibromol y sales de los mismos); tensioactivos catiónicos, tales como algunos cationes de amonio cuaternario (tales como cloruro de benzalconio, bromuro o cloruro de cetil trimetilamonio, cloruro de didecildimetilamonio, cloruro de cetilpiridinio, cloruro de benzetonio) y otros; compuestos no cuaternarios, tales como clorhexidina, glucoprotamina, dihidrocloruro de octenidina; oxidantes fuertes, tales como ozono y soluciones de permanganato; metales pesados y sus sales, tales como plata coloidal, nitrato de plata, cloruro de mercurio, sales de fenilmercurio, sulfato de cobre, y cloruro de óxido de hierro; ácidos fuertes concentrados (ácidos fosfórico, nítrico, sulfúrico, amidosulfúrico, toluenesulfónico) y álcalis (hidróxidos de sodio, potasio, calcio), tales como los de pH < 1 o > 13, concretamente a una temperatura elevada (por encima de 60°C). En algunos casos, un desinfectante como los descritos en la presente memoria consistirá esencialmente en las enzimas digestivas. En algunos casos, el desinfectante consistirá esencialmente en las enzimas digestivas, y no incluirá otros agentes desinfectantes.

Se puede incorporar una composición desinfectante que comprende enzimas digestivas como se describe en la presente memoria a otros ingredientes para formar una variedad de productos desinfectantes que incluyen, pero no se limitan a, limpiadores de manos, enjuagues bucales, batas quirúrgicas, colonias corporales, geles y espumas higienizantes para las manos, toallitas desinfectantes, y productos similares para el cuidado personal. Otros tipos de productos incluyen espumas desinfectantes, cremas, espumas y similares, y composiciones que contienen materiales de relleno orgánicos e inorgánicos, tales como emulsiones, lociones, cremas, pastas, y similares. Las

- composiciones también se pueden utilizar como limpiador antibacteriano para superficies duras, por ejemplo, lavabos y encimeras en hospitales, zonas donde se sirven alimentos, y plantas de procesamiento de carne. Las composiciones desinfectantes también se pueden utilizar como nieblas desinfectantes y vaporizaciones desinfectantes. Las presentes composiciones de enzimas digestivas se pueden elaborar en forma de composiciones diluidas listas para su uso, o en forma de productos concentrados que se diluyen antes de su uso. Los diversos productos en los que se utilizan los desinfectantes también pueden incluir fragancias, dependiendo de la naturaleza del producto. Por ejemplo, puede ser deseable una fragancia de pino o limón para su uso en toallitas de limpieza para la cocina debido a su asociación atractiva con la limpieza para muchos consumidores. Adicionalmente, también se pueden aromatizar geles o aerosoles por razones similares u otras razones.
- Las composiciones desinfectantes se pueden utilizar para elaborar toallitas desinfectantes. Se puede utilizar una toallita desinfectante para limpiar una variedad de superficies duras y otras superficies, incluyendo, por ejemplo, manos y piel humanos, instrumental y dispositivos médicos, encimeras, suelos, paredes, y ventanas. Las toallitas pueden estar elaboradas de una variedad de géneros. Los géneros se definen para que incluyan telas y papeles, así como materiales tejidos y no tejidos. Los géneros tejidos y no tejidos se pueden elaborar a partir de materiales adecuados tales como rayón, nailon, o algodón, y combinaciones de los mismos. Los ejemplos de los géneros no tejidos se describen en las Patentes de los Estados Unidos Núms. 3.786.615; 4.395.454; y 4.199.322. Los géneros o papeles se pueden impregnar con la solución desinfectante mediante cualquier método conocido en la técnica. Las toallitas se pueden empaquetar de cualquier manera conocida en la técnica incluyendo blísters individuales o en paquetes de múltiples toallitas envueltas o apiladas.
- La composición desinfectante que comprende enzimas digestivas se puede formular en una composición higienizante en gel o gelatinosa. Además de las composiciones desinfectantes, los higienizantes en gel pueden incluir un agente espesante o gelificante, en donde "agente espesante" y "agente gelificante" se utilizan indistintamente. Según se utilizan en la presente memoria, los términos composiciones higienizantes en "gel" o "gelatinosas" hacen referencia a sustancias líquidas desinfectantes que pueden tener una viscosidad de aproximadamente 1 Pa.s a aproximadamente 100 Pa.s, o de 2 Pa.s a 50 Pa.s en otro caso, aunque no se pretende que estos intervalos sean limitantes. Por ejemplo, un gel de manos puede ser considerablemente menos viscoso que un gel utilizado para limpieza industrial o para fines desinfectantes. Los ejemplos de los agentes gelificantes o espesantes incluyen, pero no se limitan a, gomas naturales tales como guar y derivados de guar, un polímero sintético, una arcilla, un aceite, una cera, gel de aloe vera, un homopolímero de acrilato, un copolímero de acrilato, un carbómero, celulosa, un derivado de celulosa, algina, un derivado de algina, un alcohol C8-C20 insoluble en agua, carragenano, sílice ahumada, mezclas de los mismos, y similares. El agente gelificante puede estar presente en la composición higienizante gelatinosa en una cantidad de aproximadamente 0,1 % en peso a 50 % en peso de la composición gelatinosa. En otro caso, el agente gelificante está presente en una cantidad de 0,25 % en peso a 10 % en peso de la composición gelatinosa. La cantidad de agente gelificante puede depender de una variedad de factores incluyendo el tipo de agente gelificante y la viscosidad deseada del gel. Los higienizantes gelatinosos se pueden utilizar para una variedad de aplicaciones incluyendo la higienización de la piel humana p. ej., higienizante de manos en gel, y la higienización de superficies duras. En un caso concreto, la composición desinfectante se puede mezclar con gel de aloe vera natural para formar una formulación de aloe desinfectante. Semejante formulación sería útil para la aplicación a quemaduras, infecciones de la piel, y otras irritaciones. El aloe puede actuar como un agente espesante, o también puede incluir otro agente espesante o gelificante como se ha descrito anteriormente, dependiendo de la viscosidad deseada del gel desinfectante.
- La composición desinfectante que comprende enzimas digestivas se puede formular en una espuma desinfectante o una composición espumante. Las espumas desinfectantes o composiciones espumantes incluyen la composición desinfectante y agentes espumantes. Se puede utilizar cualquier agente espumante conocido en la técnica dependiendo de la aplicación deseada y de las características de la espuma desinfectante resultante. Como con la composición desinfectante, las espumas desinfectantes de la presente invención se pueden utilizar tanto en aplicaciones humanas (p. ej. lavado de manos) como industriales.
- La composición desinfectante que comprende enzimas digestivas puede estar en forma de un aerosol o niebla desinfectante. La nebulización, también referida como nebulización térmica, es el procedimiento por medio del cual se aplican como aerosoles los desinfectantes. Las partículas en aerosol del desinfectante se suspenden en el aire durante un período de tiempo con el fin de desinfectar el propio aire y las superficies, incluyendo las partes inaccesibles de una estructura tales como las rendijas de ventilación. Las partículas en aerosol del desinfectante pueden tener un tamaño de partícula de aproximadamente 5 µm a aproximadamente 200 µm. En otra realización, la partícula en aerosol puede tener un tamaño de partícula de aproximadamente 20 µm a aproximadamente 150 µm.
- Los métodos para la evaluación de la capacidad desinfectante de una composición concreta son conocidos por los expertos normales en la técnica. Típicamente, la eficacia relativa de un desinfectante se puede medir comparando lo bien que desinfecta en comparación de un desinfectante conocido. El fenol es un desinfectante conocido convencional, y el correspondiente sistema de clasificación se denomina "Coeficiente fenol". El desinfectante que se va a someter a ensayo se compara con el fenol sobre un microbio convencional, p. ej., *E. coli* o *S. aureus*. Los desinfectantes que son más eficaces que el fenol tienen un coeficiente > 1. Los que son menos eficaces tienen un coeficiente < 1. Para calcular el coeficiente del fenol, se divide la concentración del compuesto de ensayo a la cual el compuesto destruye el organismo de ensayo en 10 minutos, pero no en 5 minutos, por la concentración de fenol que

destruye el organismo en las mismas condiciones. El coeficiente de fenol se puede determinar en presencia de una cantidad patrón de materia orgánica añadida o en ausencia de materia orgánica. Un análisis del coeficiente de fenol concreto utiliza el método de Rideal-Walker. El Departamento de Agricultura de los Estados Unidos también tiene un método que proporciona el coeficiente del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos. Los expertos normales en la técnica conocen otros métodos.

Un desinfectante como se describe en la presente memoria puede tener un coeficiente de fenol para *S. aureus* que es > 1, p. ej., mayor de 1,05, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,75, 2, 2,25, 2,5, 2,75, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, o mayor. En algunos casos, el coeficiente de fenol está en el intervalo de aproximadamente 2 a aproximadamente 20, p. ej., de aproximadamente 4 a aproximadamente 10, de aproximadamente 2 a aproximadamente 6, de aproximadamente 6 a aproximadamente 12, o de aproximadamente 10 a aproximadamente 15.

Un desinfectante como se describe en la presente memoria puede tener un coeficiente de fenol para *E. coli* que es > 1, p. ej., mayor de 1,05, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,75, 2, 2,25, 2,5, 2,75, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18. En algunos casos, el coeficiente de fenol está en el intervalo de aproximadamente 2 a aproximadamente 20, p. ej., de aproximadamente 4 a aproximadamente 10, de aproximadamente 2 a aproximadamente 6, de aproximadamente 6 a aproximadamente 12, o de aproximadamente 10 a aproximadamente 15.

Un desinfectante o un higienizante como los descritos en la presente memoria pueden ser bactericidas y/o bacteriostáticos para *S. aureus*. En algunas realizaciones, un desinfectante o un higienizante como se describen en la presente memoria pueden ser bactericidas y/o bacteriostáticos contra SARM o SARV, o ambos.

## **Detergentes**

Una composición desinfectante que comprende enzimas digestivas descritas en la presente memoria también se puede formular como detergente. Un detergente es un material destinado a ayudar a la limpieza. Un detergente puede contener enzimas digestivas, como las descritas previamente, en una formulación adecuada para mantener su capacidad desinfectante, y puede contener ingredientes activos o inactivos opcionales, p. ej., estabilizadores de enzimas, desinfectantes adicionales, blanqueadores, jabones, tensioactivos, colorantes y perfumes, abrasivos, modificadores del pH, ácidos, álcalis, o compuestos cáusticos, descalcificadores, oxidantes, agentes de suspensión, suavizantes de ropa, agentes espumantes o agentes anti-espumantes, modificadores de la viscosidad, inhibidores de la corrosión, y blanqueadores ópticos. Un detergente como los descritos en la presente memoria puede ser bacteriostático y/o bactericida para *S. aureus*, y en algunas realizaciones puede ser bacteriostático y/o bactericida contra SARM o SARV, o ambos.

Una composición detergente que comprende enzimas digestivas, especialmente aquellas elaboradas para su uso con agua, puede incluir componentes adicionales tales como tensioactivos para "cortar" (disolver) la grasa y para humedecer superficies, abrasivos para restregar, sustancias para modificar el pH o afectar al funcionamiento o la estabilidad, ácidos para descalcificar o cáusticos para romper compuestos orgánicos, descalcificadores para contrarrestar el efecto de los iones de "dureza", oxidantes (oxidantes) para blanquear, desinfectar, y romper compuestos orgánicos, materiales no tensioactivos que mantienen la suciedad en suspensión, enzimas para digerir proteínas, grasas, o carbohidratos en las manchas o para modificar el tacto del tejido, ingredientes que modifican las propiedades espumantes de los tensioactivos de limpieza, para estabilizar o contrarrestar la espuma, ingredientes para aumentar o disminuir la viscosidad de la solución, o para mantener otros ingredientes en solución, en un detergente suministrado como disolución en agua o gel, ingredientes que afectan a las propiedades estéticas del artículo que se va a limpiar, o del propio detergente antes o durante su utilización, tales como blanqueadores ópticos, suavizantes para ropa, colores, y perfumes, ingredientes tales como inhibidores de la corrosión para contrarrestar el daño al equipo con el que se utiliza el detergente, ingredientes para reducir el perjuicio o producir beneficios en la piel, cuando el detergente se utiliza con las manos descubiertas sobre objetos inanimados o se utiliza para limpiar la piel, y conservantes para evitar el deterioro de otros ingredientes.

La composición detergente puede estar en cualquier forma seca conveniente, p. ej., una barra, un comprimido, un polvo, un gránulo o una pasta. También puede ser un detergente líquido.

La enzima o las enzimas digestivas de la composición detergente se pueden estabilizar utilizando agentes estabilizadores convencionales, p. ej., un poliol tal como propilen glicol o glicerol, un azúcar o alcohol de azúcar, ácido láctico, ácido bórico, o un derivado de ácido bórico, p. ej., un éster de borato aromático, o un derivado de ácido fenilborónico tal como ácido 4-formilfenil borónico, y la composición se puede formular como se describe p. ej. en los documentos WO 92/19709 y WO 92/19708.

## **Antisépticos**

También se pueden utilizar diversas realizaciones de composiciones que comprenden una o más enzimas digestivas como agentes antisépticos, p. ej., para reducir, erradicar, o atenuar *S. aureus* sobre la piel u otros tejidos vivos. Los antisépticos son sustancias antimicrobianas que se aplican a tejido vivo/piel para reducir la posibilidad de infección, sepsis, o putrefacción. Generalmente se deben distinguir de los antibióticos que destruyen las bacterias dentro del organismo, y de los desinfectantes, que destruyen los microorganismos encontrados en objetos no vivos. Algunos

antisépticos son verdaderos germicidas, capaces de destruir microbios (bactericidas), mientras otros son bacteriostáticos y solamente previenen o inhiben su crecimiento.

Los antisépticos descritos en la actualidad pueden encontrar usos concretos en entornos hospitalarios o del cuidado de la salud, p. ej., en formulaciones para manos, faciales o de lavado corporal; como antisépticos para su uso antes y después del tratamiento quirúrgico; y como antisépticos para su uso en la limpieza y tratamiento de heridas, tales como heridas traumáticas o quirúrgicas. En el entorno comunitario, los antisépticos son útiles en cualquier entorno en el que las infecciones adquiridas por la comunidad sean una preocupación, p. ej., centros de día, grandes instituciones, colegios, etc. Los antisépticos también pueden ser útiles en el entorno doméstico en formulaciones para las manos, faciales o de lavado corporal, o para el tratamiento de heridas.

Un antiséptico puede incluir enzimas digestivas, en diversas realizaciones como se ha descrito previamente, y opcionalmente pueden incluir uno o más ingredientes activos o inactivos, tales como otros agentes antisépticos conocidos por los expertos normales en la técnica, estabilizadores (p. ej., estabilizadores de enzimas), colorantes, perfumes, y otros excipientes. Los ejemplos de los agentes antisépticos que se incluyen con las enzimas digestivas incluyen alcoholes (p. ej., etanol, 1- y 2-propanol, o mezclas de los mismos), compuestos de amonio cuaternario (cloruro de benzalconio, bromuro de cetil trimetilamonio, cloruro de cetilpiridinio, y cloruro de bencetonio), ácido bórico, gluconato de clorhexidina, peróxidos (p. ej., peróxido de hidrógeno, peróxido de benzoilo); soluciones de yodo y yodóforo (p. ej., povidona-yodo), dicloruro de octenidina, compuestos Fenólicos (ácido carbólico) y derivados fenólicos, cloruro de sodio, hipoclorito sódico, e hipoclorito cálcico.

Un antiséptico descrito en la presente memoria puede ser bactericida y/o bacteriostático para *S. aureus*, y en algunas realizaciones puede ser bactericida y/o bacteriostático para SARM o SARV, o ambos.

En un caso, una composición antiséptica comprende enzimas digestivas y opcionalmente uno o más de un agente anti-inflamatorio, un analgésico, o un anestésico.

Un agente anti-inflamatorio puede incluir compuestos anti-inflamatorios esteroideos y no esteroideos. En un caso, la composición antiséptica incluye uno o más esteroideos. En un caso, las composiciones antisépticas pueden comprender un agente anti-inflamatorio que es un fármaco anti-inflamatorio no esteroideo. Los ejemplos no limitantes de los fármacos anti-inflamatorios no esteroideos adecuados incluyen aspirina (Anacin, Ascriptin, Bayer, Bufferin, Ecotrin, Excedrin), colina y salicilatos de magnesio (CMT, Tricosal, Trilisate), salicilato de colina (Artliropan), celecoxib (Celebrex), diclofenaco potásico (Cataflam), diclofenaco sódico (Voltaren, Voltaren XR), diclofenaco sódico con misoprostol (Arthrotec), diflunisal (Dolobid), etodolac (Lodine, Lodine XL), fenoprofeno cálcico (Nalfon), flurbiprofeno (Ansaid), ibuprofeno (Advil, Motrin, Motrin IB, Nuprin), indometacina (Indocin, Indocin SR), ketoprofeno (Actron, Orudis, Orudis KT, Oruvail), salicilato de magnesio (Arthritab, Bayer Select, Doan's Pills, Magan, Mobidin, Mobogesic), meclofenamato sódico (Meclomen), ácido mefenámico (Ponstel), meloxicam (Mobic), nabumetona (Relafen), naproxeno (Naprosyn, Naprelan), naproxeno sódico (Aleve, Anaprox), oxaprozin (Daypro), piroxicam (Feldene), rofecoxib (Vioxx), salsalato (Amigesic, Anaflex 750, Disalcid, Marthritic, Mono-Gesic, Salflex, Salsitab), salicilato sódico, sulindac (Clinoril), tolmetin sódico (Tolectin), valdecoxib (Bextra), o una combinación de los mismos.

Los ejemplos no limitantes de los analgésicos incluyen ácido acetilsalicílico, codeína, ibuprofeno, acetaminofeno, o aceite del árbol del té. Los ejemplos no limitantes de los anestésicos incluyen xilocaína, prilocaína o benzocaína.

Los métodos ilustrativos para someter a ensayo las composiciones antisépticas candidatas se proporcionan más abajo. Un experto en la técnica comprenderá que se conocen en la técnica otros métodos de ensayo de las composiciones antisépticas y que también son adecuados para someter a ensayo composiciones antisépticas candidatas.

Los métodos *in vitro* de determinación de la capacidad de las composiciones antisépticas candidatas para destruir o inhibir el crecimiento de células microbianas tales como *S. aureus* son bien conocidos en la técnica. En general, estos métodos implican poner en contacto un cultivo de las células de interés con diversas concentraciones de las composiciones antisépticas candidatas y controlar el crecimiento del cultivo celular con respecto a un cultivo de control no tratado. También se puede incluir en tales ensayos un segundo cultivo de control que comprende células que se han puesto en contacto con un agente anti-microbiano conocido, si se desea.

Por ejemplo, la capacidad de una composición antiséptica candidata para inhibir el crecimiento de células microbianas se puede determinar fácilmente mediante medición de la concentración inhibidora mínima (CIM) para la composición antiséptica. La CIM se define como la concentración más baja que inhibe el crecimiento del organismo a un nivel predeterminado. Por ejemplo, un valor de CIM 100 se define como la concentración más baja que inhibe completamente el crecimiento del organismo, mientras un valor CIM 90 se define como la concentración más baja que inhibe el crecimiento en un 90% y un valor CIM 50 se define como la concentración más baja que inhibe el crecimiento en un 50%. Los valores de CIM se expresan a veces como intervalos, por ejemplo, la CIM 100 para una composición antiséptica se puede expresar como la concentración a la que no se observa crecimiento o como un intervalo entre la concentración a la cual no se observa crecimiento y la concentración de la dilución que sigue inmediatamente.

Las CIM antibacterianas para las composiciones antisépticas candidatas se pueden medir utilizando un análisis de macro- y micro-dilución de caldo (véase Amsterdam, D. (1996) "Susceptibility testing of antimicrobials in liquid media," págs. 52-111. En Loman, V., ed. Antibiotics in Laboratory Medicine, 4ª ed. Williams y Wilkins, Baltimore, MD). Se proporciona un ensayo de susceptibilidad anti-bacteriana normalizado en el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) como NCCLS, 2000; documento M7-A58.

En el método de microdilución de caldo clásico, la composición antiséptica candidata se diluye en medio de cultivo un una placa de microtitulación de 96 pocillos recubierta, estéril. Se diluye un cultivo durante la noche de una sola colonia bacteriana en medio estéril de manera que, tras la inoculación, cada pocillo de la placa de microtitulación contiene un número apropiado de unidades formadoras de colonias (UFC)Anl (típicamente, aproximadamente 5 x 10<sup>5</sup> UFC/ml). También se incluye el medio de cultivo solo (que no contiene bacterias) como control negativo para cada placa y a menudo se incluyen antibióticos conocidos como controles positivos. La placa de microtitulación inoculada se incuba a continuación a una temperatura apropiada (por ejemplo, 35°C - 37°C durante 16-48 horas). La turbidez de cada pocillo se determina a continuación mediante inspección visual y/o midiendo la absorbancia, o la densidad óptica (DO), a 595 nm o 600 nm utilizando un lector de microplaca y se utiliza como una indicación del grado de crecimiento bacteriano.

Los efectos anti-microbianos también se pueden expresar como el porcentaje (%) de inhibición del crecimiento de un microorganismo dado a lo largo de un período de tiempo pre-determinado mediante tratamiento con una única concentración de una composición antiséptica candidata. Este método proporciona un método rápido de evaluación de la capacidad de una composición antiséptica para inhibir el crecimiento microbiano, por ejemplo, antes de llevar a cabo más ensayos en profundidad, tales como determinaciones de CIM o ensayos *in vivo*.

La capacidad de cualquiera de las presentes composiciones desinfectantes, detergentes, higienizantes, y antisépticas para destruir o inhibir el crecimiento de la bacteria *S. aureus* se puede someter a ensayo utilizando métodos bien conocidos en la técnica, incluyendo los diversos métodos descritos anteriormente. Los métodos y protocolos para someter a ensayo las composiciones contra bacterias específicas se pueden encontrar, por ejemplo, en Official Methods of Analysis of the AOAC, 15ª Ed., Arlington Virginia 22201, USA (Association of Official Analytical Chemists (AOAC), Inc. 1990), Designación: E 1054-91 "Practices for Evaluation Inactivators of Antimicrobial Agents Used in Disinfectant, Sanitizer, Antiseptic, o Preserved Products" (American Society for Testing and Materials (ASTM), 1991). Como también es sabido en la técnica, se pueden realizar evaluaciones de Mortalidad-Tiempo *in vitro* utilizando una modificación de los métodos descritos en Draft European Standard, prEN 12054, "Chemical Disinfectants and Antiseptics - Products for Hygienic and Surgical Handrub and Handwash - Bactericidal Activity - Test Method and Requirements (1995)." Otros métodos adicionales que se pueden utilizar incluyen el ensayo de reducción log, los ensayos de proliferación, el método de dilución utilizado por la AOAC, o el ensayo de la zona de inhibición. Otros métodos se describen en los Ejemplos a continuación.

### **Kits**

También se proporcionan en la presente memoria kits. Típicamente, un kit incluye una o más composiciones como las descritas en la presente memoria. En ciertos casos, un kit puede incluir uno o más sistemas de suministro o administración, p. ej., para suministrar o administrar una composición como la proporcionada más arriba, y/o directrices para el uso del kit (p. ej., instrucciones para el tratamiento de un paciente; instrucciones para desinfectar una superficie). En otro caso, el kit puede incluir una composición como la descrita en la presente memoria y una etiqueta, p. ej., una etiqueta que indica que los contenidos se van a administrar a un paciente con una infección por *S. aureus*, o una etiqueta en cuanto a cómo utilizar la composición como desinfectante, higienizante, detergente, o antiséptico.

### **Métodos de uso**

Las composiciones farmacéuticas (p. ej., composiciones de antibióticos) descritas anteriormente se pueden utilizar para tratar o prevenir las infecciones por *S. aureus* en animales, p. ej., mamíferos y aves. En particular, se pueden utilizar las composiciones farmacéuticas para aliviar uno o más síntomas y efectos secundarios de tales infecciones y/o para reducir o erradicar la bacteria *S. aureus* que causa la infección. Las composiciones farmacéuticas pueden estar en cualquier forma de dosificación apropiada, como se ha descrito previamente. En cierto caso, las composiciones de antibióticos descritas en la presente memoria se utilizan para tratar heridas o lesiones que se han infectado, p. ej., heridas resultantes de trauma o cirugía. Semejante uso puede reducir las cicatrices y promover la curación de heridas en pacientes que tienen heridas infectadas. Las composiciones formuladas para uso farmacéutico también se pueden emplear profilácticamente, p. ej., como antisépticos. Tales composiciones encuentran un uso concreto en el tratamiento profiláctico de incisiones quirúrgicas y otras heridas, para prevenir la infección por *S. aureus*.

Las enzimas digestivas proporcionadas en la presente memoria se pueden utilizar para el tratamiento de una variedad de enfermedades y trastornos asociados con la infección por bacteria SA o en las que está implicada la bacteria SA. Ciertas realizaciones incluyen infecciones por SA asociadas con dispositivos médicos o prótesis, p. ej. catéteres, injertos, válvulas cardíacas prostéticas, articulaciones artificiales, etc. De uno a cinco por ciento de las prótesis permanentes se infectan, lo que normalmente requiere la retirada o sustitución de las prótesis. En algunos

casos, una composición que comprende una o más enzimas digestivas se puede aplicar como recubrimiento sobre el dispositivo médico o bien durante la fabricación del dispositivo o bien después de la fabricación pero antes de la inserción del dispositivo. La infección durante la hemodiálisis es otra fuente de infección. La infección es la segunda causa principal de muerte en pacientes en hemodiálisis crónica. Aproximadamente 23% de las bacteremias se debe a infecciones en los sitios de acceso. La mayoría de las infecciones por injerto están causadas por estafilococos coagulasa positivos (SA) y coagulasa-negativos. Para combatir la infección, se pueden aplicar las enzimas digestivas solas o combinadas con un antibiótico en forma de pomada o crema al sitio de la diálisis antes de cada procedimiento de hemodiálisis.

En otro caso, las composiciones proporcionadas en la presente memoria se pueden utilizar para tratar o prevenir el transporte nasal y extra-nasal de SA. La infección por este organismo puede dar como resultado lesiones de tipo impétigo o heridas infectadas. También está asociada con un aumento de las tasas de infección después de la cirugía cardíaca, la hemodiálisis, la cirugía ortopédica y la neutropenia, tanto inducida por enfermedad como iatrogénica. El transporte nasal y extra-nasal de estafilococos puede dar como resultado brotes hospitalarios de la misma cepa de estafilococos que está colonizando el sitio de transporte nasal o extranasal del paciente o el trabajador del hospital. Se debe prestar mucha atención a la erradicación de la colonización nasal, pero los resultados del tratamiento han sido generalmente poco satisfactorios. El uso de sustancias antimicrobianas tópicos, tales como Bacitracina, Tetraciclina, o Clorhexidina, da como resultado la supresión de la colonización nasal, en oposición a su erradicación.

Las enzimas digestivas solas o combinadas con un antibiótico se aplican preferiblemente intra-nasalmente, se formulan para la aplicación nasal, en forma de pomada, crema o solución. La aplicación se puede producir una vez o múltiples veces hasta que se reduce o se elimina la colonización de los estafilococos.

En algunos casos, las composiciones proporcionadas en la presente memoria se pueden utilizar para tratar o prevenir las infecciones de heridas por quemadura. Aunque la aparición de infecciones de heridas por quemaduras invasivas se ha reducido significativamente, la infección sigue siendo la causa más común de morbilidad y mortalidad en pacientes con quemaduras extensas. La infección es el determinante predominante de la curación de las heridas, de la incidencia de complicaciones, y del desenlace de los pacientes con quemaduras. Uno de los principales organismos responsables es el SA. Los desbridamientos frecuentes y el establecimiento de una epidermis, o un sustituto tal como un injerto o un sustituto de piel, son esenciales para la prevención de la infección.

Las enzimas digestivas solas o combinadas con otros antibióticos y/o anestésicos o anti-inflamatorios se pueden aplicar a heridas por quemadura en forma de una pomada o crema y/o se pueden administrar sistémicamente. La aplicación tópica puede prevenir la infección sistémica siguiente a una colonización superficial o erradicar una infección superficial. La aplicación a la piel se podría realizar una vez al día o tan a menudo como se cambien los vendajes. La administración sistémica podría ser mediante inyecciones o infusiones intravenosas, intramusculares o subcutáneas. También se podrían utilizar otras rutas de administración.

Las heridas quirúrgicas, especialmente aquellas asociadas con material foráneo, p. ej. suturas también se pueden tratar con las composiciones proporcionadas en la presente memoria. Hasta 71% de todas las infecciones nosocomiales se producen en pacientes quirúrgicos, 40% de las cuales son infecciones en el sitio de la operación. A pesar de los esfuerzos para prevenir las infecciones, se estima que entre 500.000 y 920.000 infecciones de heridas quirúrgicas complican los aproximadamente 23 millones de procedimientos quirúrgicos realizados anualmente en los Estados Unidos. Los organismos infectantes son variados, pero los estafilococos son organismos importantes en estas infecciones.

Las enzimas digestivas solas o combinadas con un antibiótico, anestésico, o anti-inflamatorio se pueden aplicar como pomada, crema o líquido al lugar de la herida o en forma de líquido antes y durante el cierre de la herida. Después del cierre, se podría aplicar una composición que comprende enzimas digestivas en los cambios de vendaje. Para las heridas que están infectadas, la composición se podría aplicar tópicamente y/o sistémicamente.

En algunas realizaciones, se puede tratar o prevenir la neumonía nosocomial utilizando las enzimas digestivas proporcionadas en la presente memoria. Las neumonías nosocomiales representan casi un 20% de todas las infecciones nosocomiales. Los pacientes que tienen más riesgo de desarrollar neumonía nosocomial son aquellos en unidades de cuidados intensivos, pacientes con niveles alterados de consciencia, pacientes ancianos, pacientes con enfermedad pulmonar crónica, pacientes con ventilación asistida, fumadores y pacientes post-operatorios. En un paciente gravemente comprometido, es probable que los patógenos nosocomiales resistentes a múltiples antibióticos sean la causa de la neumonía.

Uno de los principales organismos responsables de esta infección es SA. Las enzimas digestivas solas o combinadas con otros antibióticos se podrían administrar oralmente, a través de aerosilización, o sistémicamente para tratar la neumonía. La administración podría ser una vez al día o múltiples administraciones por día. En algunas realizaciones, las composiciones se podrían administrar directamente al pulmón por medio de inhalación o por medio de instalación de un tubo endotraqueal.

- La fibrosis quística (FC) es el trastorno genético más común de la población Caucásica. La enfermedad pulmonar es la causa más común de muerte prematura en pacientes con fibrosis quística. La terapia antimicrobiana óptima para la FC no es conocida, y generalmente se cree que la introducción de mejores antibióticos anti-pseudomonales ha sido el principal factor que contribuye al aumento de la esperanza de vida para los pacientes con FC. Uno de los organismos más comunes asociados con la enfermedad de pulmón en la FC es el SA.
- La enzima digestiva sola o combinada con otros antibióticos se podría administrar oralmente o sistémicamente o por medio de aerosol para el tratamiento de la fibrosis quística. Preferiblemente, el tratamiento se efectúa hasta durante 3 semanas durante la enfermedad pulmonar aguda y/o hasta durante 2 semanas cada 2-6 meses para prevenir exacerbaciones agudas.
- La endocarditis infecciosa resulta de la infección de las cúspides de las válvulas del corazón, aunque puede estar implicada cualquier parte del endocardio o cualquier material protésico insertado en el corazón. Normalmente es fatal si no se trata. La mayoría de las infecciones son de origen nosocomial, causadas por patógenos cada vez más resistentes a los fármacos disponibles. Uno de los principales organismos responsables es el SA.
- Las enzimas digestivas solas o combinadas con otros antibióticos se podrían administrar oralmente o sistémicamente para tratar la endocarditis, aunque se preferiría la administración sistémica. El tratamiento es preferiblemente de 2-6 semanas de duración y se puede administrar en forma de una infusión continua o de una administración múltiple durante el día.
- En el comienzo temprano agudo de la osteomielitis el suministro vascular al hueso está comprometido por la infección que se extiende al tejido circundante. En este necrótico e isquémico, la bacteria puede ser difícil de erradicar incluso después de respuesta intensa del anfitrión, cirugía, y/o terapia con antibiótico. Los principales organismos responsables son SA y *E. coli*.
- Las enzimas digestivas se podrían administrar sistémicamente solas o combinadas con otros antibióticos. El tratamiento podría tener 2-6 semanas de duración. Se podrían suministrar en forma de una infusión continua o de una administración múltiple durante el día. Se podría utilizar una composición que comprendiera enzimas digestivas como cemento impregnado en antibiótico o como cuentas recubiertas de antibiótico para procedimientos de sustitución de articulaciones.
- También se proporciona el tratamiento o la prevención de la sepsis en un anfitrión inmunocomprometido. El tratamiento de infecciones en pacientes que están inmunocomprometidos en virtud de una granulocitopenia inducida por quimioterapia e inmunosupresión relacionada con un trasplante de órgano o médula ósea representa un desafío significativo. El paciente neutropénico es especialmente susceptible de infección bacteriana, de manera que se debe iniciar inmediatamente la terapia con anticuerpo para cubrir los patógenos probables, si se sospecha que hay infección. Los organismos que probablemente causan infecciones en pacientes granulocitopénicos son: SA y *E. coli*.
- La composición de enzimas digestivas solas o combinadas con un antibiótico se administra preferiblemente oralmente o sistémicamente durante 2-6 semanas. Las enzimas digestivas se podrían administrar en forma de una infusión continua o a través de múltiples administraciones durante el día.
- Las composiciones desinfectantes, higienizantes, y detergentes descritas en la presente memoria se pueden aplicar a superficies no vivas en las cantidades y de la manera apropiadas para reducir o erradicar *S. aureus* de tales superficies, y de ese modo pueden reducir o prevenir la transmisión y/o infectividad por *S. aureus*. Las concentraciones, la programación, y la frecuencia de tratamiento son parámetros que pueden ser determinados por un experto normal en la técnica.
- Cualquier superficie puede ser desinfectada con las composiciones descritas, incluyendo una variedad de dispositivos médicos utilizados en el entorno hospitalario o del cuidado de la salud. Según se utiliza en la presente memoria, "dispositivo médico" hace referencia a cualquier dispositivo para su uso en o sobre un paciente, tal como un implante o prótesis. Tales dispositivos incluyen, sin limitación, injertos vasculares sintéticos, dispositivos de control de la sangre, válvulas cardíacas artificiales, escalpelo, cuchillo, tijeras, espátulas, expansores, clips, pinzas, espéculos, retractores, sutura, malla quirúrgica, cincel, taladro, nivel, escofina, sierra, férula, calibre, bridas, fórceps, garfios, lancetas, agujas, cánulas, curetas, depresores, dilatadores, elevadores, articuladores, extractores, sondas, grapas, catéteres, dispositivos intraluminales, tubos, cuencos, bandejas, esponjas, asas, cucharas, jeringas, marcapasos, tornillos, placas, o alfileres.
- Otras superficies comunitarias, hospitalarias o para el cuidado de la salud que se sospecha que albergan *S. aureus* pueden ser desinfectadas, incluyendo superficies grandes o pequeñas (suelos, mesas, cambiadores, camas, sistemas de ventilación, bañeras, picaportes, mostradores, superficies para servicio de alimentación, etc.). Las composiciones también pueden encontrar uso en lavados de manos o corporales, p. ej., en puntos de entrada a entornos comunitarios, habitaciones de hospitales, o cuartos de baño.
- Las composiciones proporcionadas en la presente memoria se pueden utilizar como desinfectantes comunes o en cualquier situación en la que no sean deseables microorganismos. Por ejemplo, se pueden utilizar como

desinfectantes de superficies, en recubrimientos para dispositivos médicos, en recubrimientos para indumentaria, tales como para inhibir el crecimiento de bacterias o repeler mosquitos, en filtros para la purificación de aire, tales como aeroplanos o en entornos comunitarios u hospitalarios, en sistemas de purificación de agua, como constituyentes de champús y jabones, como conservantes alimentarios, conservantes cosméticos, conservantes de medios, en herbicidas o insecticidas, como constituyentes de materiales de construcción, tales como selladores de silicona, y en el procesamiento de productos animales, tales como el curado de pieles de animales o en mataderos.

Para estos fines, típicamente las enzimas digestivas solas o junto con otros desinfectantes o detergentes se incluyen en las composiciones y se aplican con un aplicador apropiado. También se pueden incorporar o impregnar en el material durante la fabricación, tal como para un filtro de aire, o se aplican de otro modo al material u objeto.

Por ejemplo, en algunos casos, una composición descrita en la presente memoria se puede mezclar con el material, por ejemplo durante la fabricación del material o en un momento posterior. Adicionalmente, se puede aplicar una composición a la superficie de un material, o bien durante la fabricación o bien en un momento posterior. Según se utiliza en la presente memoria, el término "material adecuado" representa cualquier material sobre el cual, para el cual, o en el cual se pueden aplicar o incorporar las enzimas digestivas, incorporando de ese modo una actividad antimicrobiana en/sobre el material. Por ejemplo, se puede fabricar una gasa sobre un apósito con una composición que comprende enzimas digestivas en o sobre la gasa, y/o se puede aplicar a la gasa una pomada que comprende enzimas digestivas incorporando de ese modo actividad antimicrobiana a la gasa. Los ejemplos de los materiales adecuados en los cuales se pueden utilizar enzimas digestivas, incluyen, pero no se limitan a: alimentos, líquidos, un dispositivo médico (p. ej. instrumental quirúrgico), una cuenta, una película, un monofilamento, un material no tejido, esponja, tela, tejido de punto, una fibra corta, un tubo, una fibra hueca, un órgano artificial, un catéter, una sutura, una membrana, un apósito, y gasa. Las enzimas digestivas se pueden aplicar o mezclar en otros numerosos tipos de materiales que son adecuados para su uso en actividades médicas, de la salud, de seguridad alimentaria, o de limpieza del medio ambiente.

#### **Aplicaciones veterinarias**

Las composiciones descritas en la presente memoria, en formatos farmacéuticos, desinfectantes/higienizantes, detergentes o antisépticos, también se pueden utilizar en una variedad de aplicaciones veterinarias. Por ejemplo, muchos mamíferos, incluyendo perros, gatos, y vacas, pueden ser infectados con *S. aureus* o actuar como portadores de la bacteria. La mastitis en vacas está causada frecuentemente por infecciones con *S. aureus*. Por consiguiente, las presentes composiciones se pueden utilizar para tratar animales infectados o que se sospecha que portan *S. aureus* con el fin de tratar la infección o para prevenir la transmisión a otros animales, incluyendo seres humanos. Se pueden utilizar composiciones desinfectantes y detergentes para tratar animales que viven en cuarteles y el equipamiento que está en contacto con los animales, mientras se pueden utilizar formulaciones antisépticas y antibióticas para tratar animales para prevenir o tratar la infección.

Por ejemplo, las enzimas digestivas proporcionadas en la presente memoria se pueden utilizar para la prevención y el tratamiento de la mastitis, concretamente la mastitis del ganado lechero, aunque se puede tratar cualquier mastitis utilizando las enzimas digestivas proporcionadas en la presente memoria. La mastitis en el ganado lechero es una inflamación de la glándula mamaria en respuesta a la infección bacteriana intramamaria, trauma mecánico, o trauma químico. Se piensa que la mastitis contagiosa está causada principalmente por SA y *Streptococcal agalactiae*. La *mastitis ambiental* puede estar causada por una variedad de bacterias diferentes, incluyendo, pero no limitadas a, *K. pneumoniae*, *E. coli*, *Klebsiella oxitoca*, *Enterobacter aerogenes*, *Streptococcal uberis*, *Streptococcal bovis*, y *Streptococcal dysgalactia*.

En algunos casos, la prevención de la mastitis bovina puede incluir la inmersión diaria de la ubre en una solución que comprende enzimas digestivas. En algunas realizaciones, la solución que comprende enzimas digestivas puede incluir adicionalmente uno o más antibióticos adicionales. Cuando la infección se produce, se puede implementar la infusión intramamaria de de enzimas digestivas. Como antes, también se pueden administrar antibióticos adicionales junto con las enzimas digestivas. Típicamente, las enzimas digestivas se administran mediante inyección intramamaria; sin embargo, se puede administrar dosificaciones eficaces parenteralmente, percutáneamente, mediante implante y también mediante inmersión. En algunos casos, la mastitis bovina se puede tratar mediante la administración de una cantidad eficaz de enzimas digestivas a una vaca. La administración puede ser una administración profiláctica, ya que se trata todo el ganado vacuno del rebaño con una composición de enzima digestiva, o la administración se puede producir cuando aparece la infección en vacas individuales.

La introducción de bacterias SA y bacterias *E. coli* puede ocurrir durante la preparación de productos de ternera, volatería, pescado y cerdo. Por consiguiente, en algunas realizaciones, la reducción de la infección puede ser proporcionada a través de la administración de enzimas digestivas a un animal (p. ej., vaca, pollo, pavo, pescado, o cerdo) para reducir la presencia de las bacterias *E. coli* o SA en los intestinos del animal. La administración puede tener lugar por medio de cualquier método disponible incluyendo la inyección y por medio de la introducción de enzimas digestivas en el alimento.

En algunos casos, se puede utilizar la administración de enzimas digestivas a un animal para prevenir o reducir la transmisión de bacterias SA o *E. coli* desde el animal a otros animales o seres humanos. La administración de las

enzimas digestivas se puede completar por medio de cualquier método disponible conocido en la técnica. Por ejemplo, la prevención o reducción de la transmisión de la bacteria SA de cerdos a seres humanos se puede completar por medio de la administración de enzimas digestivas a un cerdo para reducir el número de bacterias SA presentes en el cerdo, reduciendo de ese modo la transmisión de bacterias SA a un ser humano.

## 5 **Aplicaciones en alimentos**

También se proporciona en la presente memoria un método de prevención de la infección por SA o *E. coli* en ternera, volatería, pescado, y cerdo. El procesamiento de la ternera es un punto de contaminación común: durante el proceso en el matadero, el contenido del intestino o la materia fecal sobre la piel se podría mezclar con la carne, permitiendo de ese modo que las bacterias prosperen en condiciones de calor y humedad. Si las partes infectadas se trituran a continuación, las bacterias van de la superficie del corte al interior de la masa triturada. Adicionalmente, en la producción de ternera triturada, a menudo se tritura junta carne de múltiples vacas, permitiendo que la contaminación de un único animal infecte la totalidad del lote de ternera triturada. Por consiguiente, en algunas realizaciones, se puede proporcionar una reducción de la infección por medio de la administración de enzimas digestivas a una vaca para reducir la presencia de bacterias en el intestino de la vaca. La administración se puede producir mediante cualquier método adecuado incluyendo la inyección y por medio de la introducción de enzimas digestivas en el alimento. También se describe que se puede proporcionar una reducción de la contaminación de la carne durante el sacrificio y el triturado por medio de la utilización de pulverizaciones que contienen las enzimas digestivas proporcionadas en la presente memoria. Tales pulverizaciones se pueden utilizar, por ejemplo, en la desinfección del instrumental de sacrificio y triturado o en la desinfección de la propia carne triturada. Los métodos descritos más arriba se pueden utilizar adicionalmente durante el sacrificio y la preparación de productos de volatería, pescado y cerdo (p. ej., a través de la administración de enzimas digestivas a la volatería, el pescado y/o el cerdo antes del sacrificio).

Las bacterias *E. coli* y SA también se pueden propagar por medio de frutas y hortalizas no lavadas. Por consiguiente, también se describe en la presente memoria un método de lavado de frutas y hortalizas frescas utilizando una solución, lavado, aerosol, niebla, gel, o polvo que comprenden enzimas digestivas como las proporcionadas en la presente memoria. Una solución de lavado de productos es una solución utilizada para bañar la superficie del producto, y típicamente está en contacto con el producto de aproximadamente 30 seg a aproximadamente 5 min. Una solución de inmersión de productos es una solución en la que los artículos producidos se sumergen durante un tiempo de aproximadamente 30 seg a aproximadamente 30 min. No obstante, los plazos y las soluciones se pueden utilizar indistintamente a menos que se ilustre de otro modo. Se entiende que la temperatura a la cual se lava o sumerge el producto influirá en la duración del tiempo necesario para reducir o inactivar las bacterias del mismo, conduciendo las temperaturas más altas a tiempos más cortos necesarios para el tratamiento.

Las soluciones de lavado o inmersión descritas en la presente memoria se pueden utilizar para reducir el número de bacterias, especialmente el número de bacterias patógenas, sobre la superficie de frutas, hortalizas, productos cárnicos de despiece, pescado, marisco, a nivel de consumidor (en el domicilio), en entornos comerciales de preparación de alimentos, sobre frutas y/u hortalizas antes de hacer zumo, por operarios al por mayor o detalle, y/o a nivel de la cosecha, la planta de procesamiento de carne o matadero, barcos de pesca, etcétera, sin limitación. Los presentes métodos son particularmente útiles para la inactivación de *E. coli* sobre las superficies de frutas y hortalizas frescas.

## **Ejemplos**

### **Composiciones líquidas ilustrativas**

Una composición de enzima pancreática seca que contiene aproximadamente 200 unidades USP/mg de proteasa, aproximadamente 40 unidades USP/mg de lipasa, y aproximadamente 250 unidades USP/mg de amilasa se puede diluir con diversos diluyentes (agua, solución salina, soluciones tamponadas de fosfato, soluciones de pH estabilizado) y opcionalmente con otros aditivos activos o inactivos (sistemas de estabilización de enzima, tampones, colorantes, higienizantes, detergentes, desinfectantes, antisépticos) para formar composiciones líquidas ilustrativas para los usos descritos en la presente memoria. En algunas realizaciones, la composición de enzima seca se puede diluir a una razón en mgs de la composición de enzima seca con respecto a mls del diluyente total en el intervalo de 1 mg de composición de enzima:1 ml de diluyente total a 1 mg de composición de enzima: 10.000 mls de diluyente total, o cualquier valor intermedio, p. ej., 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9, 1:10, 1:20, 1:50, 1:100, 1:200, 1:500, 1:1000, 1:5000, o 1:10,000.

### **Composiciones sólidas ilustrativas**

Una composición de enzima pancreática seca que contiene aproximadamente 200 unidades USP/mg de proteasa, aproximadamente 40 unidades USP/mg de lipasa, y aproximadamente 250 unidades USP/mg de amilasa se puede mezclar con diversos ingredientes y aditivos activos o inactivos (p. ej., detergentes secos, desinfectantes, antisépticos, e higienizantes, tales como alquilsulfato etoxilado, SDS, lauriléter sulfato de sodio, dodecilbenzeno, 4-dodecilbencenesulfonato de sodio, sistemas de estabilización de enzima, excipientes, colorantes) para formar

composiciones sólidas ilustrativas. En algunas realizaciones, la composición de enzima seca se puede mezclar con los mgs totales de los aditivos en el intervalo de 1 mg de composición de enzima: 1 mg de aditivos totales a 1 mg de composición de enzima: 10.000 mgs de aditivos totales, o cualquier valor intermedio, p. ej., 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9, 1:10, 1:20, 1:50, 1:100, 1:200, 1:500, 1:1000, 1:5000, o 1:10,000.

## 5 **Formulaciones tópicas ilustrativas**

Una composición de enzima pancreática seca que contiene aproximadamente 200 unidades USP/mg de proteasa, aproximadamente 40 unidades USP/mg de lipasa, y aproximadamente 250 unidades USP/mg de amilasa se puede mezclar con diversos portadores apropiados para formulaciones farmacéuticas tópicas a razones que oscilan de aproximadamente 1 mg de la composición de enzima con respecto a 1 mg del portador a aproximadamente 1 mg de la composición de enzima con respecto a aproximadamente 200 mg del portador, o cualquier razón intermedia (p. ej., 1:2, 1:4, 1:5, 1:10, 1:20, 1:30, 1:40, 1:50, 1:75, 1:100, 1:150). Por ejemplo, en una realización se emplea una razón de 1:25, y el portador es vaselina.

### **Ensayo de límite bacteriano - Evaluación de las propiedades bactericidas y bacteriostáticas**

Los autores de la presente invención han descubierto sorprendentemente en el transcurso de la ejecución del ensayo de límite bacteriano sobre una composición de enzima pancreática de cerdo seca que comprende aproximadamente 200 unidades USP/mg de actividad proteasa, aproximadamente 40 unidades USP/mg de actividad lipasa, y 250 unidades USP/mg de actividad amilasa que la bacteria *S. aureus* no crece en presencia de diversas diluciones de este material. La recuperación de las UFC de *S. aureus* de los controles positivos "enriquecidos" con *S. aureus* era constantemente de baja a ausente. El ensayo de límite bacteriano de dilución de la composición seca en forma tanto no encapsulada como encapsulada en lípido (20% de aceite de soja en peso de la composición) demuestra una recuperación mínima o nula de la bacteria a partir de controles positivos a los que se había añadido un número conocido de UFC de *S. aureus*. La carencia de recuperación durante tales métodos de recuperación sugiere una naturaleza bacteriostática y/o bactericida de la composición.

### **Métodos y materiales**

**Materiales de muestra** - Se elaboró producto Concentrado de Enzima Pancreática Porcina No Encapsulado (uPEC, por sus siglas en inglés) aislado de cerdo (*Sus scrofa*) por un proveedor comercial (Scientific Protein Labs) para que contuviera aproximadamente 200 U/mg de actividad proteasa, 40 U de actividad lipasa/mg, y 250 U de actividad amilasa/mg. Se obtuvo una versión encapsulada en lípido de este material (ePEC) utilizando un procedimiento de lecho fluidificado y un aceite orgánico altamente purificado totalmente hidrogenado (aceite de soja totalmente hidrogenado) que se utilizó a continuación para recubrir las partículas de enzima a un porcentaje en peso de aproximadamente 20% de las partículas finales.

**Métodos:** Tanto ePEC como uPEC experimentaron un análisis microbiano convencional para la detección de microbios. Ninguna de las composiciones mostró una contaminación significativa utilizando el Ensayo de límites microbianos mediante los métodos USP. Adicionalmente, ambas muestras son negativas/10 g para especies de *Salmonella* y *E. coli*. En resumen, el procedimiento para el examen de las composiciones de ensayo para la idoneidad microbiológica (es decir, estimación del número total de microorganismos viable y libertad del organismo específico) se esboza en la USP, capítulo 61, "Microbial Limit Tests." La USP 61 esboza el ensayo preparatorio, durante el cual se determinan los parámetros de ensayo en donde la propia composición de ensayo ya no inhibe la multiplicación de los organismos viables. La USP 1227 ("Validation") también proporciona pautas para la validación de los métodos de recuperación. Los métodos para la evaluación del recuento microbiano aeróbico total, se llevaron a cabo en especies de *E. coli*, y *Salmonella*.

**Recuento Microbiano Aeróbico Total; Preparación de diluciones de ensayo** - Se prepararon diluciones masivas de ePEC y uPEC a 1:10, 1:50, 1:100 y 1:200 en Caldo de Soja con Tripsina añadida que contenía Polisorbato 20 al 4% y lecitina al 0,5%. La dilución de la muestra de ensayo masiva se dividió después en alícuotas separadas de 10 ml, en las que se inoculó a continuación un pequeño número de unidades formadoras de colonias (UFC <100/mL) de los microorganismos apropiados (*S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. enterica*). Se cultivó en placa un mililitro de las alícuotas inoculadas por duplicado utilizando el medio sólido apropiado (agar). Se prepararon controles positivos, se inocularon, y se cultivaron en placa de una manera similar a las muestras de ensayo. Se prepararon controles negativos, se inocularon con reactivos estériles, y se cultivaron en placa de una manera similar a las muestras de ensayo. Las placas se incubaron de 30°C a 35°C durante dos días. Al final del período se calculó la recuperación. La recuperación de los organismos inoculados debe ser al menos 70% del control positivo con el fin de mostrar la no inhibición del crecimiento por la composición de ensayo. Se utilizó cloruro de trifeníltetrazolio para el recuento de las placas.

**Ensayo para las especies de Salmonella** - Las diluciones preparadas con caldo de Lactosa que contenía Polisorbato 20 al 4% y lecitina al 0,5% con  $\leq$  100 UFC de *Salmonella enterica*. Las diluciones inoculadas se incubaron de 30°C a 35°C durante 24 horas antes de transferir 1 ml a caldos de Selenita Cistina y Tetrahionato. Los caldos selectivos se inocularon durante 18 horas de 30°C a 35°C antes de ser aplicados en estrías en agares verde brillante, sulfito de bismuto y xilosa lisina desoxicolato. Las placas de agar selectivo se incubaron de 30°C a 35°C durante 24 horas. Las

placas se observaron para determinar las colonias características de las especies de Salmonella. Cuando se observaron, se confirmó que una colonia representativa era de una especie de Salmonella utilizando un ensayo de identificación bioquímica API 20e.

- 5 *Ensayo para E. coli* - Las diluciones preparadas con caldo de Lactosa que contenía Polisorbato 20 al 4% y lecitina al 0,5% se inocularon con  $\leq 100$  UFC de *E. coli*. Las diluciones inoculadas se incubaron de 30°C a 35°C durante 24 horas antes de ser aplicadas en estrías sobre agar MacKonkey. Las placas se observaron para determinar las colonias características de *E. coli*. Cuando se observaron, se confirmó que una colonia representativa era *E. coli* utilizando un ensayo de identificación bioquímica API 20e.

**Resultados**

- 10 *Recuento aeróbico total*: Los resultados del ensayo utilizando PEC no recubierto (uPEC) se muestran en la **Tabla 1**, más abajo. Como se muestra, para las diluciones de 1:50, 1:100, y 1:200 el porcentaje de recuperación de *S. aureus* fue de 0%, demostrando la acción bactericida y/o bacteriostática de uPEC de *S. aureus*.

**Tabla 1**

Recuperación de microorganismos después de la incubación con uPEC					
Organismo	Control Negativo	Control Positivo	Dilución	Promedio del ensayo	% Recuperación
<i>S. aureus</i>	0 UFC	57 UFC	1:50	0 UFC	0%
			1:100	0 UFC	0%
			1:200	0 UFC	0%
<i>E. coli</i>	0 UFC	63 UFC	1:50	0 UFC	0%
			1:100	1 UFC	2%
			1:200	1 UFC	2%
<i>S. enterica</i>	0 UFC	66 UFC	1:50	48 UFC	73%
			1:100	62 UFC	94%
			1:200	56 UFC	85%

- 15 El porcentaje de recuperación uPEC para *E. coli* también se proporciona en la **Tabla 1**. Para una dilución de 1:50 la recuperación fue de 0%, para una dilución de 1:100 la recuperación fue de 2%, y para una dilución de 1:200 la recuperación fue de 2%.

- 20 El porcentaje de recuperación uPEC para *S. enterica* también se proporciona en la **Tabla 1**. Para una dilución de 1:50 la recuperación fue de 73%, para una dilución de 1:100 la recuperación fue de 94%, y para una dilución de 1:200 la recuperación fue de 85%.

Los resultados del ensayo utilizando PEC encapsulado en lípido (ePEC) se proporcionan en la **Tabla 2**, más abajo. Como se muestra, para una dilución de 1:50 la recuperación de *S. aureus* fue de 29%, para una dilución de 1:100 la recuperación fue de 0%, y para 1:200 el porcentaje de recuperación de *S. aureus* también fue de 0%.

Tabla 2

Recuperación de microorganismos después de la incubación con ePEC					
Organismo	Control Negativo	Control Positivo	Dilución	Promedio del ensayo	% Recuperación
<i>S. aureus</i>	0 UFC	34 UFC	1:50	10 UFC	29%
			1:100	0 UFC	0%
			1:200	0 UFC	0%
<i>E. coli</i>	0 UFC	38 UFC	1:50	12 UFC	32%
			1:100	9 UFC	17%
			1:200	28 UFC	78%
<i>S. enterica</i>	0 UFC	61 UFC	1:50	53 UFC	87%
			1:100	N/P	N/P
			1:200	N/P	N/P

El porcentaje de recuperación ePEC para *E. coli* también está en la **Tabla 2**. Para una dilución de 1:50 la recuperación fue de 32%, para una dilución de 1:100 la recuperación fue de 17%, y para una dilución de 1:200 la recuperación fue de 78%.

El porcentaje de recuperación ePEC para *S. enterica* también se da en la **Tabla 2**. Para una dilución de 1:50 la recuperación fue de 87%, para una dilución de 1:100 y 1:200 los ensayos no se llevaron a cabo.

Los controles positivos referidos en las **Tablas 1 y 2** demuestran claramente que el medio de crecimiento para todos los cultivos microbiológicos estaba funcionando eficazmente. En la **Tabla 1**, se puede observar que la composición de uPEC era altamente eficaz tanto sobre *S. aureus* como sobre *E. coli*. Esto se fundamentó por el hecho de que la recuperación de los controles enriquecidos positivamente no lograron satisfacer el criterio USP de la recuperación positiva (al menos 70% de las UFC de la muestra enriquecida se recuperaron).

También es importante observar que la actividad bacteriostática/bactericida mostraba especificidad de especie. La muestra de *S. enterica* mostró una excelente recuperación utilizando PEC tanto recubierto como no recubierto. Debido a que las bacterias comparten paredes celulares y estructuras de membrana comunes tales como lípidos y peptidoglicanos, es posible que estos resultados apunten a la sensibilidad de más de un componente celular más específico de la especie tal como una proteína. Si la acción lipasa o amilasa sola fuera suficiente para inducir la muerte bacteriana o la supresión del crecimiento, en ese caso sería poco probable observar la recuperación de *S. enterica* a tales niveles robustos. Es posible que una o varias proteínas específicas de la especie en *S. aureus* y *E. coli* compartan secuencias peptídicas similares y la estructura terciaria local apropiada para permitir el ataque enzimático por una o varias de las proteasas presentes en PEC, conduciendo a la posterior destrucción de la bacteria. Estos resultados no excluyen sin embargo, un evento de múltiples fases en el que la acción por las lipasas y amilasas contra la pared celular y la membrana bacterianas se exponen primero a proteínas extracelulares o transmembrana que tienen la estructura primaria y terciaria apropiadas para facilitar su degradación enzimática por una o muchas de las proteasas PEC.

Estos resultados demuestran un claro efecto bacteriostático para PEC tanto recubierto por lípidos como no recubierto. Debido a que este experimento depende de una lectura del criterio de valoración final del crecimiento de las colonias bacterianas mientras la bacteria sujeto permanece en presencia de PEC, no es posible, basándose en estos resultados, excluir la posibilidad de un efecto meramente bacteriostático. De este modo, el fracaso en la recuperación de un número suficiente de unidades formadoras de colonias viables podría ser el resultado de la presencia supresora continua del material PEC, en oposición a la inducción de la muerte bacteriana. Por consiguiente, se llevaron a cabo ensayos experimentales adicionales con el fin de evaluar de manera más concluyente las capacidades bactericidas de PEC.

**Materiales y métodos:** La formulación de PEC no recubierta descrita más arriba se utilizó previamente para evaluar la actividad bactericida de las formulaciones.

**Preparación de las diluciones de ensayo** - Se prepararon diluciones masivas de uPEC a 1:100 y 1:200 en caldo de soja con tripsina añadida que contenía Polisorbato 20 al 4% y lecitina al 0,5%. La dilución masiva se dividió después en alícuotas de 10 ml separadas, que se inocularon a continuación con un pequeño número de unidades formadoras de colonias (UFC <100) de los microorganismos adecuados. Se cultivó en placa un mililitro de las alícuotas inoculadas por duplicado utilizando el medio sólido apropiado (agar). Los controles positivos se prepararon, se inocularon, y se cultivaron en placa de una manera similar a las muestras de ensayo. Se prepararon se prepararon, se inocularon con reactivo estéril, y se cultivaron en placa de una manera similar a las muestras de ensayo. Las placas se incubaron de 30°C a 35°C durante dos días. Después de esta incubación inicial, el material cultivado se recogió y se lavó en Solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se filtró con el fin de eliminar PEC. El material se resuspendió en caldo de soja con tripsina añadida diluido según lo anterior y se volvió a cultivar en placa sobre medio sólido de nueva aportación (agar) y se incubó durante 2 días más. Al finalizar este período, las colonias se enumeraron y se calculó el porcentaje de recuperación. Al finalizar el período se calculó la recuperación. La recuperación de los organismos inoculados debe ser de al menos 70% con el fin de mostrar la no inhibición del crecimiento. Se utilizó cloruro de trifeníltetrazolio para el recuento de las placas.

**Ensayos para E. coli** - Las diluciones preparadas con caldo de Lactosa que contenía Polisorbato 20 al 4% y lecitina al 0,5% se inocularon con <= 100 UFC de *E. coli*. Las diluciones inoculadas se incubaron de 30°C a 35°C durante 24 horas antes de ser aplicadas en estrías al agar MacKonkey. Las placas se observaron para determinar las colonias características de *E. coli*. Cuando se observaron, se confirmó que una colonia representativa era *E. coli* utilizando un ensayo de identificación bioquímica API 20e.

Los ensayos también se repitieron tanto para *S. aureus* como para *E. coli* a Diluciones de 1:20, 1:40, y 1:80.

**Resultados de ensayo**

Los resultados de ensayo utilizando el uPEC no recubierto se proporciona en las **Tablas 3 y 4**, más abajo, demostrando la recuperación de la bacteria después de volver a cultivar en placa la bacteria sola, post-incubar con uPEC y lavar. Como se muestra en la **Tabla 3**, para las diluciones de 1:100, y 1:200, el porcentaje de recuperación de *S. aureus* fue de 13% y 48%, respectivamente, demostrando claramente la acción bactericida de uPEC sobre *S. aureus*. Como se muestra en la **Tabla 4**, el porcentaje de recuperación de *S. aureus* a una dilución de 1:20 es de 2%, para una dilución de 1:40 es de 4%, y para una dilución de 1:80 es de 23%.

**Tabla 3**

Acción bactericida Post lavado(recuperación de microorganismos)					
Organismo	Control Negativo	Control Positivo	Dilución	Promedio de ensayo	% Recuperación
<i>S. aureus</i>	0 UFC	48 UFC	1:100	6 UFC	13%
			1:200	23 UFC	48%
<i>E. coli</i>	0 UFC	46 UFC	1:100	1 UFC	2%
			1:200	13 UFC	28%

**Tabla 4**

Acción bactericida post lavado/recuperación de microorganismos					
Organismo	Control Negativo	Control Positivo	Dilución	Promedio de ensayo	% Recuperación
<i>S. aureus</i>	0 UFC	47 UFC	1:20	1 UFC	2%
			1:40	2 UFC	4%

Acción bactericida post lavado/recuperación de microorganismos					
Organismo	Control Negativo	Control Positivo	Dilución	Promedio de ensayo	% Recuperación
			1:80	11 UFC	23%
<i>E. coli</i>	0 UFC	43 UFC	1:20	0 UFC	0%
			1:40	0 UFC	0%
			1:80	5 UFC	12%

La recuperación para *E. coli* también se proporciona en las **Tablas 3 y 4**. Como se muestra en la **Tabla 3**, para una dilución de 1:100 la recuperación fue de 2%, y para una dilución de 1:200 la recuperación fue de 28%. Como se muestra en la **Tabla 4**, el porcentaje de recuperación de *E. coli* a una dilución de 1:20 es de 0%, para una dilución de 1:40 es de 0%, y para una dilución de 1:80 es de 12%

5 Los controles positivos demuestran que los medios de crecimiento para todos los cultivos microbianos estaban funcionando eficazmente. Esto indica un efecto bactericida auténtico cuando los organismos seleccionados se exponen a PEC. Si la acción del PEC fuera meramente bacteriostática, la eliminación de PEC del cultivo simultáneo con las bacterias de ensayo daría como resultado una liberación de cualquier acción supresora por PEC con una recuperación del crecimiento activo. No obstante, la eliminación de PEC no da como resultado ninguna recuperación, ni siquiera cuando los cultivos se dejaron crecer a lo largo de un período de 24 horas completo. Esto apoya fuertemente la noción de que la razón de que los organismos seleccionados no logren mostrar la recuperación de las UFC tras la exposición a PEC se debe a la acción bactericida de PEC. Esta acción podría incluir mecanismos tales como el daño físico e irreversible a los lípidos de la superficie celular, las proteínas de la membrana o la cápsula bacteriana por la degradación enzimática, conduciendo a desequilibrios de electrolitos iónicos extracelulares e intercelulares, cambios de acidez, y daño del material genético.

10

15

**REIVINDICACIONES**

- 1.** Una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento o prevención de la infección por *S. aureus* en un ave o un mamífero, que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de enzimas digestivas que comprenden proteasa, amilasa, y lipasa.
- 5 **2.** La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la proteasa comprende quimotripsina y tripsina.
- 3.** La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde las enzimas digestivas derivan, independientemente, de una fuente animal, una fuente microbiana, una fuente vegetal, una fuente fúngica, o se preparan sintéticamente.
- 10 **4.** La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 3, en donde la fuente animal es un páncreas de cerdo.
- 5.** La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la razón de proteasas totales con respecto a lipasas totales (en unidades USP) oscila de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 20:1.
- 15 **6.** La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, en donde la razón de proteasas con respecto a lipasas oscila de aproximadamente 4:1 a aproximadamente 10:1.
- 7.** La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la composición farmacéutica es una formulación de dosificación seleccionada del grupo que consiste en: píldoras, comprimidos, cápsulas, comprimidos oblongos, espolvoreables, cremas, lociones, aerosoles, emulsiones, polvos, líquidos, geles, y una combinación de cualquiera de los mismos.
- 20 **8.** La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la composición farmacéutica se formula para la administración oral, administración tópica, administración transmucosal, o para la aplicación a heridas.
- 9.** Una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de un mamífero o ave que muestra uno o más síntomas debidos a una infección por *S. aureus* que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de enzimas digestivas que comprenden proteasa, amilasa, y lipasa.
- 25 **10.** La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 ó 9, que comprende adicionalmente un antibiótico betalactámico.
- 11.** Una composición farmacéutica para su uso en la promoción de la curación de heridas en un individuo con una herida infectada con *S. aureus*, que comprende enzimas digestivas que comprenden proteasa, amilasa, y lipasa.
- 30 **12.** Una composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 11, en donde el uso es para la promoción de la curación de heridas y la reducción de cicatrices en un individuo con una herida infectada con *S. aureus*.
- 13.** La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 11 ó 12, en donde la composición farmacéutica se aplica a la herida del individuo.
- 35 **14.** La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 11 ó 12, en donde la herida es una herida quirúrgica.
- 15.** Una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento o la prevención de las infecciones por *S. aureus* en animales mediante la reducción de la cantidad de *S. aureus* presente en una región de la piel, tejido, o herida de un mamífero o ave, en donde la composición se formula para la aplicación a la región de la piel, tejido, o herida, en donde la composición comprende enzimas digestivas que comprenden proteasa, amilasa, y lipasa.
- 40