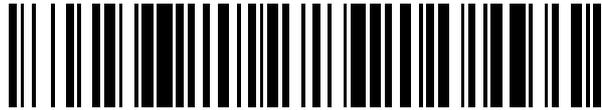


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 645 062**

51 Int. Cl.:

A61K 38/47	(2006.01)
A61K 31/70	(2006.01)
A61K 38/43	(2006.01)
A61P 1/04	(2006.01)
A61P 31/04	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.02.2009 PCT/US2009/033599**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **13.08.2009 WO09100456**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.02.2009 E 09709038 (5)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.07.2017 EP 2254591**

54 Título: **Inhibición y tratamiento de biopelículas gastrointestinales**

30 Prioridad:

08.02.2008 US 65186

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

04.12.2017

73 Titular/es:

**PROTHERA, INC. (100.0%)
795 Trademark Dr
Reno, NV 89521, US**

72 Inventor/es:

OLMSTEAD, STEPHEN F.

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 645 062 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

Inhibición y tratamiento de biopelículas gastrointestinales

ANTECEDENTES

5 Una "biopelícula" es un fenómeno muy conocido y puede definirse como una población de células procariotas que crecen sobre una superficie y encerradas en un material polimérico de matriz de extracelular auto-producido, que media en la adhesión de las células entre sí y a superficies. Las biopelículas no son simplemente ensamblajes pasivos de células que se pegan a superficies, sino que son sistemas biológicos estructuralmente y dinámicamente complejos. En comparación con células que son planctónicas en la naturaleza, las bacterias que crecen en las biopelículas presentan un fenotipo diferente con respecto a la tasa de crecimiento y transcripción génica. Véase <http://en.wikipedia.org/wiki/Biofilm>.

10 Las biopelículas no deseadas han sido responsables, por ejemplo, de la incrustación de torres de agua de refrigeración, tuberías de agua, unidades de membrana y plantas de procesamiento de alimentos. Las biopelículas son tristemente difíciles de erradicar. Los microbios en las biopelículas industriales se protegen de los productos químicos antimicrobianos, bacteriófagos medioambientales y amebas fagocíticas (Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. Clin Microbiol Rev 2002; 15:167-293).

15 Además de su importancia en la industria, las biopelículas pueden estar implicadas en un significativo porcentaje de infecciones microbianas humanas (Potera C. Forging a link between biofilms and disease. Science 1999; 283: 1837-8). Parsek y Singh propusieron cuatro criterios para definir una etiología de biopelícula de una infección: las bacterias patógenas están asociadas a la superficie o son adherentes a un sustrato; el examen directo revela bacterias en agrupaciones, encerradas en una matriz de constituyentes bacterianos o de hospedador; la infección está localizada; y la infección es resistente a terapia con antibióticos a pesar de la sensibilidad a antibióticos de los organismos planctónicos constituyentes (Parsek MR, Singh PK. Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis. Annu Rev Microbiol 2003;57:677-701).

20 Las infecciones por biopelículas pueden estar implicadas en la etiología de caries dental, enfermedad periodontal, fibrosis quística (FQ), infecciones de las vías respiratorias, endocarditis de válvula nativa, prostatitis bacteriana crónica, otitis media e infecciones vaginales. Los microorganismos de biopelículas también participan en infecciones relacionadas con los implantes, en los que se forman poblaciones microbianas adherentes sobre las superficies de catéteres, válvulas cardíacas protésicas, prótesis articulares y otros dispositivos (Donlan RM. Biofilms and device-associated infections. Emerg Infect Dis 2001;7:277-81).

25 El tubo digestivo proporciona un reservorio para muchas bacterias de biopelículas resistentes a antibióticos, que incluyen especies de *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa* y especies de *Acinetobacter* (Donskey CJ. The role of the intestinal tract as a reservoir and source for transmission of nosocomial pathogens. Clin Infect Dis 2004;39:219-26). El patógeno oportunista humano, *Pseudomonas aeruginosa*, es una causa importante de mortalidad relacionada con infección entre los pacientes críticamente enfermos, y conlleva uno de los índices de letalidad más altos de todas las infecciones por Gram-negativos. Aunque tradicionalmente se ha considerado que los pulmones son un sitio importante de infección por *P. aeruginosa* entre pacientes críticamente enfermos, surgen un número significativo de estas infecciones como resultado de la contaminación directa de las vías respiratorias por la flora gastrointestinal o por la diseminación hematogena de los intestinos al parénquima del pulmón. Métodos eficaces para la inhibición, reducción y/o tratamiento de *P. aeruginosa* tendrían un impacto significativo para esta afección.

30 Con respecto a las biopelículas en el intestino, ahora se sabe que las bacterias pueden existir, por ejemplo, como biopelículas en el epitelio colónico, dentro de la capa de modo que lo cubre, y sobre partículas de comida en la luz (MacFarlane S, MacFarlane GT. Composition and metabolic activities of bacterial biofilms colonizing food residues in the gastrointestinal tract. Appl Environ Microbiol 2006;72:6204-II; Probert HM, Gibson GR. Bacterial biofilms in the human gastrointestinal tract. Curr Issues Intest Microbiol 2002;3:23-7). Las bacterias asociadas a biopelícula gastrointestinal incluyen *Bacteroides* spp., *Clostridium* spp., *Fusobacterium* spp., *Klebsiella* spp., *Spirochaetes* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Helicobacter pylori*, *Bifidobacterium* spp., y cocos Gram-positivos.

El documento WO 2004/066945 A2 se refiere a composiciones de enzima hidrolítica para reducir las condiciones de tejido implicadas en biopelículas, tales como trastornos gastrointestinales.

35 El documento US 6.759.040B1 se refiere a la preparación y el uso de mezclas de enzimas hidrolíticas que degradan biopelículas de especificidad múltiple.

Así, no se ha satisfecho una necesidad de composiciones mejoradas relacionadas con la reducción de biopelículas dentro del intestino de mamíferos. La presente invención proporciona estas y/u otras ventajas.

SUMARIO

La presente invención se refiere a una composición para su uso en la inhibición o el tratamiento de una infección por biopelícula gastrointestinal, que comprende combinar una cantidad farmacéuticamente eficaz de una celulasa estable a ácidos, una glucoamilasa, un complejo de hemicelulasa/pectinasa estable a ácidos, β -glucanasa, un complejo de proteasa/peptidasa que tiene actividad de dipeptidil peptidasa IV (DPP-IV), quitosanas, lisozima y *Serratia peptidasa* con al menos uno de un vehículo farmacéuticamente aceptable, adyuvante, excipiente, tampón y diluyente. Así, las presentes composiciones se refieren a la reducción de biopelícula(s) gastrointestinal(es) en el intestino de animales.

En la memoria descriptiva se describen métodos que incluyen el cribado de composiciones anti-biopelícula fisiológicamente aceptables, que incluyen, por ejemplo, composiciones nutracéuticas, terapéuticas o farmacéuticas, que comprenden enzimas anti-biopelícula y otros componentes adecuados para la ingestión oral por mamíferos tales como seres humanos, y métodos de preparación y uso o administración de tales composiciones. Estos métodos se refieren a cribar enzimas digestivas en modelos de biopelícula para identificar enzimas útiles y composiciones para las composiciones anti-biopelícula fisiológicamente aceptables y métodos de tratamiento tratados en el presente documento. Tales enzimas pueden cribarse como agentes únicos, mezclas de agentes, o en combinación con agentes antimicrobianos, agentes quelantes, lactoferrina, hierbas medicinales u otros componentes según se desee.

Las composiciones anti-biopelícula fisiológicamente aceptables usan enzimas digestivas para la inhibición y reducción de biopelícula patógena en el tubo gastrointestinal de seres humanos.

Por ejemplo, las composiciones anti-biopelícula fisiológicamente aceptables y métodos pueden referirse al uso de celulasas, hemicelulasas, lisozima, pectinasas, amilasas, DNasa I, *Serratia peptidasa*, y otras hidrolasas que son capaces de digerir la matriz de exopolisacárido y exoproteína de biopelículas.

En un aspecto de la presente invención, las presentes composiciones anti-biopelícula fisiológicamente aceptables se refieren a composiciones anti-biopelícula fisiológicamente aceptables orales para su uso en un método de inhibición y tratamiento de biopelículas gastrointestinales patógenas en seres humanos.

Las presentes composiciones anti-biopelícula fisiológicamente aceptables se refieren a agentes que son transmitidos por los alimentos, transmitidos por el agua o son nosocomiales. Infecciones por biopelícula adicionales pueden ser resistentes a antibióticos y/o recurrentes. Las composiciones anti-biopelícula fisiológicamente aceptables pueden usarse conjuntamente con antibióticos o antimicrobianos. Además, estas composiciones anti-biopelícula fisiológicamente aceptables pueden usarse en pacientes cuyas infecciones por biopelícula han dejado de responder a antibióticos o antimicrobianos.

Estos y otros aspectos, características y realizaciones se exponen dentro de la presente solicitud, que incluye la siguiente Descripción detallada. A menos que se establezca expresamente de otro modo, todas las realizaciones, aspectos, características, etc., pueden mezclarse y emparejarse, combinarse y permutarse de cualquier manera deseada.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Las biopelículas gastrointestinales en mamíferos participan en una variedad de posibles enfermedades, bien como causantes de tales enfermedades o bien haciéndolas empeorar. Las presentes composiciones se refieren a la reducción de biopelícula(s) gastrointestinal(es) en el intestino de animales y son para su uso en métodos que incluyen inhibir, tratar o reducir biopelículas en el sistema gastrointestinal.

Cribado de enzimas anti-biopelícula

Pueden modificarse dispositivos de biopelícula, tales como el dispositivo de biopelícula de Calgary (Ceri et al, 1999; documento US 7.041.470), por ejemplo, que va a usarse conjuntamente con los métodos anteriormente mencionados, para identificar composiciones anti-biopelícula fisiológicamente aceptables, para cribar para enzimas que (a) están disponibles por vía oral; (b) son generalmente reconocidas como seguras (GRAS); (c) son conocidas o puede establecerse que retienen su actividad durante el paso a través del estómago; y (d) son activas en romper biopelículas en sistemas modelo. Pueden usarse otros dispositivos que son adecuados para el estudio de biopelículas que afectan a los seres humanos. Como se trata en Ceri, un dispositivo de biopelícula de Calgary (CBD) proporciona ensayo rápido y reproducible de susceptibilidades de biopelículas a antibióticos usando 96 biopelículas equivalentes en una placa de 96 pocillos estándar (u otro número adecuado según se desee), cuyas biopelículas se exponen entonces a los antibióticos en investigación. En la presente discusión, tales biopelículas de cribado se exponen a concentraciones de enzima como se tratan en el presente documento. La formación de biopelículas puede ir, por ejemplo, seguida de microbiología cuantitativa y microscopía electrónica de barrido.

Enzimas a modo de ejemplo que tratan o inhiben biopelículas

El crecimiento bacteriano sobre una superficie gastrointestinal frecuentemente implica la auto-producción de una matriz extracelular rica en polisacáridos que proporciona soporte estructural para la formación de comunidades de

biopelícula. Enzimas que rompen las matrices de biopelícula de estos organismos dentro del tubo gastrointestinal son el objeto de los métodos en el presente documento.

La(s) enzima(s) particular(es) que van a usarse pueden seleccionarse según las propiedades, si se conocen, de la biopelícula específica que va a eliminarse, o puede usarse una combinación de varias enzimas que tienen diferentes actividades enzimáticas. La composición de la matriz extracelular es compleja y variable entre diferentes especies bacterianas e incluso dentro de las mismas especies en diferentes condiciones medioambientales. A pesar de su composición heterogénea, los exopolisacáridos son un compuesto típico de la matriz de biopelícula, que proporcionan el armazón en el que se insertan células microbianas. Entre los muchos diferentes exopolisacáridos que se han descrito, parece que la celulosa y la N-acetilglucosamina unida en β -1,6 son los componentes más comunes de la matriz de biopelícula de muchas bacterias diferentes.

En un aspecto, las composiciones anti-biopelícula fisiológicamente aceptables adecuadas comprenden preferentemente una cantidad de agentes de β -1,6-N-acetil-D-glucosamina (poli- β -1,6-GlcNAc) anti-poliméricos para dispersar sustancialmente poli- β -1,6-GlcNAc y así capaces de degradación significativa de biopelícula. Por ejemplo, véase Itoh Y, Wang X, Hinnebusch BJ, Preston JF, Romeo T. Depolymerization of β -1,6-N-acetyl-D-glucosamine disrupts the integrity of diverse bacterial biofilms. *J Bacteriol* 2005;187:382-7). En algunas realizaciones, para este y otros agentes, tanto solos como en combinación, tal reducción significativa significa, si se mide *in vitro*, una reducción logarítmica de 1, normalmente 1,5, o 3,0-3,8 o mejor. *In vivo*, tal reducción significativa puede ser una reducción sustancial de uno o más síntomas asociados a una infección por biopelícula, o incluso eliminación sustancial de uno o más síntomas asociados a una infección por biopelícula. Agentes anti-GlcNAc a modo de ejemplo incluyen una β -hexosaminidasa previamente identificada y enzima dispersante de biopelícula de *A. actinomycetemcomitans*, DspB o dispersina B, que hidroliza específicamente los enlaces glucosídicos de poli- β -1,6-GlcNAc y rompe la biopelícula bacteriana (Kaplan JB, Ragunath C, Ramasubbu N, Fine DH. 2003. Detachment of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* biofilm cells by an endogenous β -hexosaminidase activity. *J Bacteriol* 2003;185:4693-8). La dispersina B escinde el polímero de N-acetilglucosamina unido en β (1,6) usando una maquinaria catalítica similar a otras hexosaminidasas de la familia 20 que escinden restos de N-acetilglucosamina unidos en β (1,4). La dispersina B y hexosaminidasas similares con actividad en biopelículas son adecuadas para su uso en los métodos, composiciones anti-biopelícula fisiológicamente aceptables tratadas en el presente documento. Los agentes anti-poli- β -1,6-GlcNAc pueden usarse junto con celulosa, tratada adicionalmente más adelante.

Según la presente invención, las composiciones anti-biopelícula fisiológicamente aceptables comprenden una celulosa en una cantidad capaz de degradación significativa de biopelícula. Tales celulasas pueden tener actividad contra, por ejemplo, celulosa en una biopelícula de *Salmonella* u otros. Celulasa se refiere a una clase de enzimas producidas principalmente por hongos, bacterias y protozoos que catalizan la hidrólisis de celulosa. Sin embargo, también son celulasas producidas por otros tipos de organismos tales como plantas y animales. Las celulasas que se han usado como enzimas digestivas son conocidas por ser estables a ácidos. Éstas incluyen, pero no se limitan a, celulasas de especies de *Aspergillus*. Se conocen varios tipos diferentes de celulasas, que se diferencian estructuralmente y mecanísticamente. El número EC para este grupo de enzimas es EC 3.2.1.4. La reacción catalizada es la endohidrólisis de enlaces 1,4- β -D-glucosídicos en celulosa. Otros nombres para las celulasa son: Endoglucanasa, endo-1,4- β -glucanasa, carboximetilcelulosa, endo-1,4- β -D-glucanasa, β -1,4-glucanasa, β -1,4-endoglucanohidrolasa, celudextrinasa, avicelasa. Se han usado celulasas *in vitro* en la rotura de biopelículas sobre implantes médicos a condiciones de pH ácido (Loiselle M, Anderson KW, The use of cellulase in inhibiting biofilm formation from organisms commonly found on medical implants. *Biofouling* 2003;19:77-85). En realizaciones típicas, la(s) celulasa(s) en el presente documento son resistentes a desnaturalización/inactivación a un intervalo de pH de 1,0 a 5,0 y 10 a 14, poseen actividad hidrolítica a través de un intervalo de pH de 1 a 14, tienen actividad hidrolítica eficaz dentro del entorno gástrico a un pH en ayunas de 1,0 a 3,0 y en presencia de comida y otro material ingerido, y/o poseen actividad hidrolítica eficaz a un pH de 6,5 a 7,5 que engloba pH fisiológico en el intestino delgado y colon.

Fuentes comerciales de celulasas, hemicelulasas y otras enzimas que pueden usarse incluyen las siguientes: Deerland Enzymes, Kennesaw, GA (www.deerland-enzymes.com); National Enzyme Company (www.nationaenzyme.com); Specialty Enzymes (www.specialtyenzymes.com); y otras. Las enzimas pueden derivarse de cualquier fuente adecuada tal como fuentes vegetales, bacterianas, fúngicas o animales.

Según la presente invención, la composición anti-biopelícula fisiológicamente aceptable comprende celulosa, glucoamilasa, complejo de hemicelulasa/pectinasa, β -gluconasa, un complejo de proteasa/peptidasa que tiene actividad de dipeptidil peptidasa IV (DPP-IV), quitosanas, lisozima y *Serratia* peptidasa con al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable, diluyentes, excipientes, tampones, o adyuvantes. Vehículos o diluyentes, excipientes, tampones, adyuvantes, y similares, farmacéuticamente aceptables son no tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas.

En una realización adicional, la cantidad de celulasa por dosis oral es aproximadamente 100-300 CU, y normalmente aproximadamente 200 CU; la cantidad de complejo de hemicelulasa/pectinasa es aproximadamente 60-100 HSU, y normalmente aproximadamente 80 HSU; la cantidad de β -gluconasa es aproximadamente 6-10 BGU, y normalmente aproximadamente 8 BGU; la cantidad de proteasa ácida es aproximadamente 15-25 SAP, y normalmente aproximadamente 20 SAP; y, la cantidad de proteasa alcalina es aproximadamente 15-25 HUT, y normalmente aproximadamente 20 HUT.

En todavía realizaciones adicionales, la cantidad de celulasa por dosis oral oscila de 1 a 10.000 CU, la cantidad de complejo de hemicelulasa/pectinasa oscila de 1 a 8.000 HSU, la cantidad de β -gluconasa oscila de 1 a 1000 BGU, la cantidad de proteasa ácida oscila de 1 a 10.000 SAP, y la cantidad de proteasa alcalina oscila de 1 a 40.000 HUT.

5 En una realización adicional, la composición anti-biopelícula fisiológicamente aceptable comprende además una cualquiera o más de las siguientes en una cantidad capaz de una cantidad capaz de degradación significativa de biopelícula: disacáridos, amilasa, α -amilasa, β -amilasa, endoglucanasa, xilanasa, lipasa, bromelaína, papaína, ficina, proteasa de kiwi, cualquier proteasa o proteinasa derivada de planta, o fitasa.

10 En una realización adicional, la composición anti-biopelícula fisiológicamente aceptable contiene además una cualquiera o más de las siguientes enzimas específicas en una cantidad capaz de degradación de biopelícula: 1,2-1,3- α -D-manano manohidrolasa, 1,3- β -D-xilano xilanhidrolasa, 1,3- β -D-glucano glucanohidrolasa, 1,3(1,3;1,4)- α -D-glucano 3-glucanohidrolasa, 1,3(1,3;1,4)- β -D-glucano 3(4)-glucanohidrolasa, 1,3-1,4- α -D-glucano 4-glucanohidrolasa, 1,4- α -D-glucano glucanohidrolasa, 1,4- α -D-glucano glucohidrolasa, 1,4-(1,3:1,4)- β -D-glucano 4-glucanohidrolasa, 1,4- β -D-glucano glucohidrolasa, 1,4- β -D-xilano xilanhidrolasa, 1,4- β -D-manano mananhidrolasa, 1,5- α -L-arabinanhidrolasa, 1,4- α -D-glucano maltohidrolasa, 1,6- α -D-glucano 6-glucanohidrolasa, 2,6- β -fructano fructanhidrolasa, α -dextrina 6-glucanohidrolasa, α -D-galactósido galactohidrolasa, α -D-glucósido glucohidrolasa, α -D-manósido manohidrolasa, acilneuraminil hidrolasa, galactohidrolasa de polisacárido capsular de *Aerobacter*, β -D-fructofuranósido fructohidrolasa, β -D-fucósido fucohidrolasa, α -D-fructano fructohidrolasa, β -D-galactósido galactohidrolasa, β -D-glucósido glucohidrolasa, β -D-glucuronósido, glucuronosohidrolasa, β -D-manósido manohidrolasa, β -N-acetil-D-hexosaminida N-acetilhexosamino hidrolasa, celulosa-sulfato sulfohidrolasa, colagenasa, dextrina 6- α -D-glucanohidrolasa, glucoproteína-fosfatidilinositol fosfatidohidrolasa, hialuronato 4-glucanohidrolasa, hialuronoglucuronidasa, pectina pectilhidrolasa, peptidoglicano N-acetilmuramoilhidrolasa, fosfatidilcolina 2-acilhidrolasa, fosfatidilcolina 1-acilhidrolasa, poli(1,4- α -D-galacturónido), poli(1,4-(N-acetil- β -D-glucosaminida))-glucanohidrolasa, proteasas, sacarosa α -glucosidasa, triacilglicerol acilhidrolasa, triacilglicerol proteína-acilhidrolasa.

25 Otro grupo de enzimas que puede emplearse en el presente documento es un sub-grupo de serina proteasas comúnmente designadas subtilisinas. Una subtilisina es una serina proteasa producida por bacterias Gram-positivas u hongos. Han sido determinadas las secuencias de aminoácidos de varias subtilisinas, que incluyen al menos seis subtilisinas de cepas de *Bacillus*, concretamente, subtilisina 168, subtilisina BPN, subtilisina Carlsberg, subtilisina DY, subtilisina amylosacchariticus y mesentericopeptidasa, una subtilisina de un actinomycetales, termitasa de *Teramoactinomyces vulgaris*, y una subtilisina fúngica, proteinasa K de *Tritirachium album*.

30 Una lipasa a modo de ejemplo como se trata anteriormente puede ser una lipasa microbiana. Como tal, la lipasa puede seleccionarse de lipasas de levadura, por ejemplo, *Candida*, y lipasas bacterianas, por ejemplo *Pseudomonas* o *Bacillus*, lipasas; o fúngicas, por ejemplo, *Humicola* o *Rhizomucor*.

35 Ejemplos de amilasas útiles en los métodos, etc., en el presente documento incluyen amilasas de *Bacillus*, por ejemplo, amilasa de *Bacillus stearothermophilus*, amilasa de *Bacillus amyloliquefaciens*, amilasa de *Bacillus subtilis* o amilasa de *Bacillus licheniformis* o amilasas de *Aspergillus*, por ejemplo amilasa de *Aspergillus niger* o *Aspergillus oryzae*.

40 Otro grupo de enzimas útiles en los métodos, etc., en el presente documento incluye pectinasas que pertenecen a las clases de enzimas poligalacturonasas (EC 3.2.1.15), pectinesterasas (EC 3.2.1.11), pectiniasas (EC 4.2.2.10) y hemicelulasas tales como endo-1,3- β -xilosidasa (EC 3.2.1.32), xilano 1,4- β -xilosidasa (EC 3.2.1.37) y α -L-arabinofuranosidasa (EC 3.2.1.55). Un organismo fuente adecuado para pectinasas puede ser *Aspergillus niger* o *Aspergillus aculeatus*.

45 La lisozima, también conocida como muramidasa o N-acetilmuramida glucanohidrolasa, es una enzima de 14,4 kilodalton (EC 3.2.1.17) que daña paredes de células bacterianas catalizando la hidrólisis de enlaces 1,4- β entre el ácido N-acetilmurámico y restos de N-acetil-D-glucosamina en un peptidoglicano y entre restos de N-acetil-D-glucosamina en quitodextrinas. La lisozima se encuentra en saliva, lágrimas y polimorfonucleocitos y tiene actividad antibacteriana conocida. La enzima funciona atacando peptidoglicanos (encontrados en las paredes celulares de bacterias, especialmente bacterias Gram-positivas) e hidrolizando el enlace glucosídico que conecta el ácido N-acetilmurámico con el cuarto átomo de carbono de la N-acetilglucosamina. La lisozima se ha usado en el tratamiento de otitis media y sinusitis (documento US 7.060.674). Se han usado composiciones de lisozima oral en el tratamiento de diversas afecciones en seres humanos, que incluye artritis (documento US 7.229.809).

55 Otra enzima que puede emplearse en las composiciones en el presente documento es la desoxirribonucleasa I (DNasa I), una fosfodiesterasa capaz de hidrolizar ácido polidesoxirribonucleico. La DNasa I se ha purificado de diversas especies a diversos grados. La DNasa I, cuando se inhala, afecta la capacidad de *P. aeruginosa* para formar biopelículas en los pulmones en los estadios de desarrollo iniciales. La DNasa I hidroliza el ADN presente en esputo/moco de pacientes con fibrosis quística y reduce la viscosidad en los pulmones, promoviendo la eliminación mejorada de secreciones. Enzimas que son estables a ácidos son candidatos para su uso conjuntamente con los métodos, composiciones anti-biopelícula fisiológicamente aceptables, etc., tratados en el presente documento. Las actividades de DNasa I son clasificables en tres grupos basándose en sus diferentes distribuciones en tejido de

DNasa I. La DNasa I de tipo parótida es secretada de la glándula parótida y debe pasar a través de las condiciones muy ácidas en el estómago.

Las composiciones anti-biopelícula fisiológicamente aceptables, en el presente documento van a ser tomadas por la boca, normalmente al menos 1 hora antes o 1 hora después de una comida o consumo de alimento. Las composiciones anti-biopelícula fisiológicamente aceptables, en el presente documento normalmente van a tomarse 2 a 4 veces por día (otros intervalos pueden ser apropiados en ciertas circunstancias), y el régimen normalmente va a ser seguido durante un periodo prolongado, por ejemplo al menos aproximadamente 1 o 2 meses.

La preparación de enzima puede combinarse con un antimicrobiano natural tal como aceite de orégano, berberina o ácido undecilénico, o con un antibiótico o antimicrobiano de venta con receta. La preparación de enzima puede combinarse con la ingestión oral de uno o más microorganismos probióticos. La Organización Mundial de la Salud define los organismos probióticos como microorganismos vivos que cuando se administran en cantidades adecuadas confieren un beneficio a la salud en el hospedador. La preparación de enzima puede combinarse con uno o más prebióticos. Un prebiótico se define como "componentes selectivamente fermentados que permiten cambios específicos, ya sea en la composición y/o la actividad en la microflora gastrointestinal que confieren beneficios al bienestar y la salud del hospedador" (Roberfroid M. Prebiotics: the concept revisited. JNutr 2007;137(3 Suppl 2):830S-7S).

Métodos relacionados con las composiciones en el presente documento incluyen métodos de cribado, preparación y uso, que incluyen la fabricación de medicamentos.

Por ejemplo, los métodos incluyen métodos de cribado de una composición anti-biopelícula fisiológicamente aceptable adecuada para administración por vía oral a un mamífero, mientras que retiene la eficacia en el intestino, comprendiendo el método proporcionar una pluralidad significativa de muestras de una biopelícula diana viva sobre al menos un sustrato; aplicar a cada una de la pluralidad de muestras uno del intervalo de dosis de un agente anti-biopelícula candidato seleccionado del grupo que comprende celulasa estable a ácidos y un agente de β -1,6-N-acetil-D-glucosamina (poli- β -1,6-GlcNAc) anti-biopelícula anti-polimérico, en condiciones tales que las muestras de la biopelícula diana puedan crecer ausentes de un efecto anti-biopelícula significativo debido al agente anti-biopelícula candidato; y, determinar si cada uno del intervalo de dosis de agente anti-biopelícula candidato inhibió o no el crecimiento de su muestra respectiva.

Los métodos pueden comprender además cribar tanto la celulasa estable a ácidos anti-biopelícula como el agente anti-poli- β -1,6-GlcNAc anti-biopelícula. El agente anti-poli- β -1,6-GlcNAc anti-biopelícula puede ser una hexosaminidasa tal como dispersina B. Los métodos puede comprender además cribar al menos uno de un complejo de hemicelulasa/pectinasa estable a ácidos, β -glucanasa, proteasa ácida, proteasa alcalina o Serratia peptidasa. La cantidad de celulasa puede ser equivalente a una dosis de aproximadamente 100-300 CU, la cantidad de complejo de hemicelulasa/pectinasa puede ser aproximadamente 60-100 HSU, la cantidad de β -glucanasa puede ser aproximadamente 6-10 BGU, la cantidad de proteasa ácida puede ser aproximadamente 15-25 SAP y la cantidad de proteasa alcalina puede ser aproximadamente 15-25 HUT.

Los métodos también pueden comprender cribar al menos un agente estable a ácidos seleccionado de los siguientes: un disacárido; amilasa; α -amilasa; β -amilasa; glucoamilasa; endoglucanasa; xilanasas; lipasa; lisozima; una enzima con actividad de dipeptidil peptidasa IV (DPP-IV); quitosanasa; bromelaina; papaína; ficina; proteasa de kiwi; cualquier proteasa o proteinasa derivada de planta, o fitasa. La lipasa puede ser una lipasa microbiana, tal como de al menos una de *Candida*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Humicola* o *Rhizomucor*. La amilasa puede ser al menos una de una amilasa de *Bacillus* o amilasa de *Aspergillus*. El cribado puede comprender al menos una pectinasa que puede ser al menos una de una poligalacturonasa (EC 3.2.1.15), pectinesterasa (EC 3.2.1.11), pectiniliasa (EC 4.2.2.10) o hemicelulasa. La pectinasa puede ser al menos una pectinasa de *Aspergillus niger* o pectinasa de *Aspergillus aculeatus*.

Los métodos pueden comprender además cribar al menos uno de los siguientes: 1,2-1,3- α -D-manano manohidrolasa, 1,3- β -D-xilano xilanhidrolasa, 1,3- β -D-glucano glucanhidrolasa, 1,3(1,3;1,4)- α -D-glucano 3-glucanhidrolasa, 1,3(1,3;1,4)- β -D-glucano 3(4)-glucanhidrolasa, 1,3-1,4- α -D-glucano 4-glucanhidrolasa, 1,4- α -D-glucano glucanhidrolasa, 1,4- α -D-glucano glucohidrolasa, 1,4-(1,3;1,4)- β -D-glucano 4-glucanhidrolasa, 1,4- β -D-glucano glucohidrolasa, 1,4- β -D-xilano xilanhidrolasa, 1,4- β -D-manano mananhidrolasa, 1,5- α -L-arabinanhidrolasa, 1,4- α -D-glucano maltohidrolasa, 1,6- α -D-glucano 6-glucanhidrolasa, 2,6- β -fructano fructanhidrolasa, α -dextrina 6-glucanhidrolasa, α -D-galactósido galactohidrolasa, α -D-glucósido glucohidrolasa, α -D-manósido manohidrolasa, acilneuraminil hidrolasa, galactohidrolasa de polisacárido capsular de *Aerobacter*, β -D-fructofuranósido fructohidrolasa, β -D-fucósido fucohidrolasa, α -D-fructano fructohidrolasa, β -D-galactósido galactohidrolasa, β -D-glucósido glucohidrolasa, β -D-glucuronósido, glucuronosohidrolasa, β -D-manósido manohidrolasa, β -N-acetil-D-hexosaminida N-acetilhexosamino hidrolasa, celulosa-sulfato sulfohidrolasa, colagenasa, dextrina 6- α -D-glucanhidrolasa, glucoproteína-fosfatidilinositol fosfatidohidrolasa, hialuronato 4-glucanhidrolasa, hialuronoglucuronidasa, pectina pectilhidrolasa, peptidoglicano N-acetilmuramoilhidrolasa, fosfatidilcolina 2-acilhidrolasa, fosfatidilcolina 1-acilhidrolasa, poli(1,4- α -D-galacturónido), poli(1,4-(N-acetil- β -D-glucosaminida))-glucanhidrolasa, proteasas, sacarosa α -glucosidasa, triacilglicerol acilhidrolasa, triacilglicerol proteína-acilhidrolasa.

Los métodos pueden comprender además cribar una subtilisina estable a ácidos, una DNasa I estable a ácidos, aceite de orégano, berberina, ácido undecilénico, un antibiótico de venta con receta, un antimicrobiano de venta con receta, un microorganismo probiótico o un prebiótico.

5 En algunos aspectos, los métodos comprenden inhibir una infección por biopelícula gastrointestinal en un mamífero, comprendiendo el método: identificar la presencia de la infección por biopelícula gastrointestinal, administrar por vía oral al mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un agente anti-biopelícula que comprende una celulasa estable a ácidos o un agente de β -1,6-N-acetil-D-glucosamina (poli- β -1,6-GlcNAc) anti-polimérico en al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable, en una cantidad y durante un tiempo suficiente para producir degradación significativa de biopelícula dentro del sistema gastrointestinal del mamífero. En realizaciones adicionales, los métodos comprenden administrar uno o más de los otros aspectos de las composiciones en el presente documento.

15 La composición puede ser para su uso como una sustancia terapéutica activa, para su uso en la fabricación de un medicamento para inhibir o tratar una biopelícula gastrointestinal en un mamífero, o para la fabricación de un medicamento capaz de reducir síntomas asociados a una biopelícula gastrointestinal en un paciente humano, por ejemplo que comprende combinar una cantidad farmacéuticamente eficaz de al menos uno de una celulasa estable a ácidos anti-biopelícula o un agente de β -1,6-N-acetil-D-glucosamina (poli- β -1,6-GlcNAc) anti-polimérico anti-biopelícula en una cantidad capaz de degradación significativa de biopelícula con al menos uno de un vehículo, adyuvante, excipiente, tampón y diluyente farmacéuticamente aceptable.

Dianas de biopelícula a modo de ejemplo

20 Organismos de biopelícula diana a modo de ejemplo, que incluyen tanto organismos nativos como infecciosos de biopelícula, se tratan a continuación.

Enterococos

25 Los enterococos, aunque parte de la flora normal del tubo gastrointestinal humano, han sido reconocidos como una importante causa de infección nosocomial durante dos décadas y comúnmente están implicados en infecciones de las vías urinarias, bacteremia, infecciones intrabdominales y de heridas quirúrgicas, infecciones relacionadas con catéteres y endocarditis.

Staphylococcus

30 Los estafilococos patógenos pueden formar biopelículas en las que muestran una resistencia más alta a los antibióticos y el sistema de defensa inmunitario que sus homólogos planctónicos. *Staphylococcus aureus* es un patógeno común asociado a infecciones nosocomiales. Puede persistir en la práctica clínica y obtener resistencia elevada a agentes antimicrobianos mediante la formación de biopelículas. *Staphylococcus aureus* está entre los principales patógenos que causan infecciones de la circulación sanguínea capaces de formar biopelículas en tejido de hospedador y dispositivos médicos permanentes y de persistir y producir enfermedad. Las infecciones producidas por *S. aureus* están siendo cada vez más difíciles de tratar debido a la creciente resistencia a antibióticos (por ejemplo, vancomicina o *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina). En un entorno de biopelícula particularmente, los microbios presentan resistencia potenciada a agentes antimicrobianos.

Pseudomonas

40 El patógeno oportunista humano, *Pseudomonas aeruginosa*, es una causa importante de mortalidad relacionada con infección entre los pacientes críticamente enfermos, y conlleva uno de los índices de letalidad más altos de todas las infecciones por Gram-negativos. Aunque tradicionalmente se ha considerado que los pulmones son un sitio importante de infección por *P. aeruginosa* entre pacientes críticamente enfermos, surgen un número significativo de estas infecciones como resultado de la contaminación directa de las vías respiratorias por la flora gastrointestinal o por la diseminación hematógena de los intestinos al parénquima del pulmón. *Pseudomonas aeruginosa* produce graves infecciones en pacientes inmunológicamente comprometidos y es un patógeno importante en pacientes con fibrosis quística. Un mecanismo de virulencia importante es la formación de una biopelícula mucoide. El alginato secretado es un constituyente crucial de la matriz de biopelícula mucoide. Sin embargo, los mutantes negativos para alginato de *P. aeruginosa* también son capaces de formar biopelículas no mucoides, que muestran una arquitectura diferente de la de biopelículas formadas por *P. aeruginosa* mucoide que produce en exceso alginato (Nivens DE, Ohman DE, Williams J, Franklin MJ. Role of alginate and its O acetylation in formation of *Pseudomonas aeruginosa* microcolonies and biofilms. J Bacteriol 2001;183: 1047-57; Wozniak DJ, Wyckoff TJ, Starkey M, Keyser R, Azadi P, OToole GA, Parsek MR. Alginate is not a significant component of the extracellular polysaccharide matrix of PAI 4 and PAOI *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. Proc Natl Acad Sci USA 2003;100:7907-12).

Helicobacter pylori

55 *H. pylori* es uno de los patógenos humanos más comunes que infectan al 50 % de la población mundial. Está asociado con úlceras duodenales, úlceras gástricas, gastritis y carcinoma gástrico. El tratamiento de *H. pylori* es difícil, implicando regímenes multifármaco y periodos de tratamiento extensos. Hay una tasa de recaída del 10-20 %.

Estudios recientes documentan la importancia de biopelículas en la patogénesis de la enfermedad por *H. pylori* (Coticchia JM et al. Presence and density of Helicobacter pylori biofilms in human gastric mucosa in patients with peptic ulcer disease. J Gastrointest Surg. 2006;10:883-9). Una formulación multienzimática oral mantiene la gran promesa de facilitar la eliminación de biopelícula de *H. pylori* y la erradicación de patógenos de *H. pylori*, reduciendo así el riesgo de gastritis, enfermedad de úlcera péptica y cáncer gástrico.

Listeria

El patógeno transmitido por los alimentos *Listeria* es el agente causante de la listeriosis, una enfermedad grave donde la forma abierta tiene una grave mortalidad superior al 25 %. *Listeria monocytogenes* puede sobrevivir y crecer durante un amplio intervalo de condiciones medioambientales tales como temperaturas de refrigeración, pH bajo y alta concentración de sales. Esto permite al patógeno vencer la preservación de alimentos y las barreras de seguridad, y plantea un posible riesgo para la salud humana. *Listeria monocytogenes* puede encontrarse específicamente en alimentos crudos, tales como leche líquida sin pasteurizar, verduras crudas y aves de corral cocinadas. Tiene la capacidad de crecer a bajas temperaturas; permitiendo así que crezca en alimentos refrigerados. Se creyó que *Listeria monocytogenes* estaba exclusivamente asociado a infecciones en animales, pero recientemente esta especie patógena también ha sido aislada, en su forma durmiente, en el tubo digestivo de pequeños porcentajes de la población humana (Rouquette C, Berche P. The pathogenesis of infection by Listeria monocytogenes. Microbiologia 1996;12:245-58).

Campylobacter

Campylobacter jejuni es una especie de bacterias microaerófilas Gram-negativas en forma de bastones curvadas comúnmente encontradas en heces de animales. Es una de las causas más comunes de gastroenteritis humana en el mundo. La intoxicación alimentaria producida por especies de *Campylobacter* puede ser gravemente debilitante, pero es raramente potencialmente mortal. Se ha asociado con el posterior desarrollo de síndrome de Guillain-Barre (GBS), que normalmente se desarrolla dos a tres semanas después de la enfermedad inicial. El alimento contaminado es una fuente importante de infecciones aisladas, con comida incorrectamente preparada y aves de corral normalmente la fuente de las bacterias. La infección con *C. jejuni* normalmente produce enteritis, que se caracteriza por dolor abdominal, diarrea, fiebre y malestar general. Se muestra que el principal patógeno gastrointestinal, *Campylobacter jejuni*, existe como tres formas de biopelícula de monoespecie en cultivo líquido (Joshua GW, Guthrie-Irons C, Karlyshev AV, Wren BW. Biofilm formation in Campylobacter jejuni. Microbiology 2006;152(Pt 2):387-96).

Bacillus anthracis

Bacillus anthracis es una bacteria formadora de endosporas Gram-positiva y es el agente etiológico del carbunco pulmonar, gastrointestinal y cutáneo. En áreas endémicas en las que interaccionan seres humanos y ganado, se informan comúnmente casos crónicos de carbunco cutáneo. Actualmente, hay algunos datos conocidos por el inventor que explican la importancia del modo de vida de la biopelícula de *B. anthracis*, incluso se han caracterizado biopelículas en otros patógenos y especies de *Bacillus* no patógenas, que incluyen *Bacillus cereus* y *Bacillus subtilis*, respectivamente. *B. anthracis* forma fácilmente biopelículas que son inherentemente resistentes a los antibióticos comúnmente recetados (Lee K, Costerton JW, Ravel J, Auerbach RK, Wagner DM, Keim P, Leid JG. Phenotypic and functional characterization of Bacillus anthracis biofilms. Microbiology 2007;153(Pt 6): 1693-701).

Yersinia

La yersiniosis es una enfermedad infecciosa producida por una bacteria del género *Yersinia*. En los Estados Unidos, la mayoría de las enfermedades humanas son causadas por una especie, *Y. enterocolitica*. La infección por *Y. enterocolitica* se produce casi siempre en niños jóvenes. Síntomas comunes en niños son fiebre, dolor abdominal y diarrea. Los síntomas gastrointestinales son comunes en tanto los estados agudos como crónicos de la yersiniosis. La infección es casi siempre adquirida por comer alimento contaminado, especialmente productos de cerdo crudos o poco cocinados. El beber leche sin pasteurizar contaminada o agua sin tratar también puede transmitir la infección.

Yersinia pestis, el agente causante de la peste bubónica, se transmite a roedores y seres humanos por las picaduras de pulgas cuyos proventrículos están bloqueados por una densa masa de bacterias de biopelícula. (Tan L, Darby C. A movable surface: formation of Yersinia sp. biofilms on motile Caenorhabditis elegans. J Bacteriol. 2004; 186:5087-92). El bloqueo priva de comida a la pulga y la estimula para picar repetidamente en búsqueda de comidas de sangre, extendiendo así las bacterias a nuevos hospedadores. Los modelos de biopelícula usando *Caenorhabditis elegans* pueden usarse para identificar enzimas que matan biopelículas de *Yersinia* (Styer KL, Hopkins GW, Bartra SS , Piano GV, Frothingham R, Aballay A. Yersinia pestis kills Caenorhabditis elegans by a biofilm-independent process that involves novel virulence factors. EMBO reports 2005;10:992-7).

Especies de Brucella

Los seres humanos son generalmente infectados por una de tres vías: comer o beber algo que está contaminado con *Brucella*, respirar el organismo (inhalación), o haber entrado las bacterias en el cuerpo a través de heridas de la piel. La forma más común de infectarse es por comer o beber productos de leche contaminados.

Salmonella

Salmonella enterica, un patógeno transmitido por los alimentos que produce salmonelosis, se produce por la ingestión de bacterias que invaden el epitelio intestinal y se multiplican allí. *Salmonella enterica* es conocida por formar biopelículas, y su unión a, y crecimiento sobre, células eucariotas se facilita por exopolisacáridos (Ledebor & Jones, 2005). La mayoría de las personas infectadas con *Salmonella* desarrollan diarrea, fiebre y calambres abdominales 12 a 72 horas después de la infección. La enfermedad normalmente dura 4 a 7 días, y la mayoría de las personas se recuperan sin tratamiento. Sin embargo, en algunas personas la diarrea puede ser tan grave que el paciente necesita ser hospitalizado. En estos pacientes, la infección por *Salmonella* puede extenderse de los intestinos a la corriente sanguínea, y entonces a otros sitios del cuerpo y puede producir la muerte, a menos que la persona se trate inmediatamente.

Shigella

Hay varios tipos diferentes de bacterias *Shigella*: *Shigella sonnei*, también conocida como *Shigella* del "grupo D", representa dos tercios de la shigelosis en los Estados Unidos. La shigelosis es una enfermedad infecciosa producida por un grupo de bacterias llamadas *Shigella*. La mayoría de los infectados por *Shigella* desarrollan diarrea, fiebre y cólicos a partir de un día o dos después de que se expongan a las bacterias. Algunas bacterias de *Shigella* han llegado a ser resistentes a los antibióticos. Un segundo tipo, *Shigella flexneri*, o *Shigella* del "grupo B", representa casi todo el resto. Otros tipos de *Shigella* continúan siendo causas importantes de enfermedad en el mundo en desarrollo. Un tipo encontrado en el mundo en desarrollo, *Shigella dysenteriae* tipo 1, produce epidemias mortales allí.

Typhi (fiebre tifoidea)

Salmonella enterica serovariedad Typhi produce la fiebre tifoidea, una fiebre entérica que es posiblemente mortal. Portadores asintomáticos pueden portar bacterias en la vesícula biliar. *Salmonella typhi* vive solo en seres humanos. Personas con fiebre tifoidea portan las bacterias en su circulación sanguínea y tubo digestivo. Además, un pequeño número de personas, llamados portadores, se recuperan de la fiebre tifoidea, pero continúan portando las bacterias. Tanto las personas enfermas como los portadores excretaron *S. typhi* en sus heces (excrementos). *Salmonella typhi* se transmite en alimentos contaminados, agua y bebidas. Recientemente se desarrolló un sistema para analizar la formación de biopelículas de *Salmonella* sobre cubreobjetos de vidrio (Prouty AM, Schwesinger WH, Gunn JS. Biofilm formation and interaction with the surfaces of gallstones by *Salmonella* spp. Infect Immun 2002;70:2640-9).

Escherichia coli

Escherichia coli enterotoxigénica se dirige al intestino delgado donde el efecto de barrera de la microflora autóctona es bajo debido a la acidez y los movimientos peristálticos más altos en esta región. Este organismo se adhiere a y coloniza el moco con el fin de provocar un efecto patógeno (Knutton S, Lloyd DR, Candy DC, McNeish AS. In vitro adhesion of enterotoxigenic *Escherichia coli* to human intestinal epithelial cells from mucosal biopsies. Infect Immun 1984;44:514-8). Esto significa que el patógeno y/o sus toxinas pueden adherirse fácilmente a enterocitos expuestos e invadir el hospedador.

Vibrio cholerae (cólera)

Vibrio cholerae es un patógeno facultativo Gram-negativo que es el agente causante del cólera, una enfermedad diarreica devastadora que afecta a millones de personas en el mundo en desarrollo cada año; sobrevive en reservorios acuáticos, probablemente en forma de biopelículas.

Entamoeba histolytica

La amebiasis intestinal invasiva, producida por *Entamoeba histolytica*, se inicia con la unión de trofozoítos a la capa de moco colónico, rotura de moco y/o agotamiento, y adherencia a y citólisis de células epiteliales e inflamatorias hospedadoras. Un modelo de trabajo actual de la amebiasis intestinal sugiere que el microentorno del intestino hospedador, particularmente las mucinas intestinales y la biopelícula bacteriana, pueden influir en el comportamiento de las amebas patógenas. Las enzimas que rompen la biopelícula bacteriana serán útiles en la inhibición y el tratamiento de la amebiasis.

EJEMPLOS**EJEMPLO 1:****Documentación de una actividad anti-biopelícula de formulación multienzimática**

Se realizaron experimentos iniciales con una formulación multienzimática que consistía en celulasa - 2000 CU, glucoamilasa - 50 AGU, hemicelulasa/pectinasa - 300 HSU, beta-glucanasa - 100 BGU, complejo de proteasa/peptidasa con actividad de DPP-IV - 100.000 HUT, quitosanas - 100 unidades, lisozima - 200.000 SHU y Serratia peptidasa - 1000 unidades. Estas actividades enzimáticas estuvieron contenidas en una mezcla de 500 mg que incluyó 20 mg de L-leucina. La formulación multienzimática se probó durante una serie de diluciones de

ES 2 645 062 T3

50 mg/ml a 0,34 mg/ml. Las diluciones se hicieron en caldo de Mueller Hinton con ajuste de cationes estéril (CAMHB) o caldo de dextrosa de Sabouraud (SDB) para levaduras.

La formulación multienzimática se probó *in vitro* contra *Escherichia coli* O157:H7, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 4352, *Candida paratropicalis* ATCC 99916 y *Candida albicans* SJ2083133. Aunque *Candida albicans* forma biopelículas significativas *in vivo*, no es un formador predecible de biopelículas *in vitro*, pero se incorporó en el experimento debido a su importancia clínica.

El proceso experimental para la prueba de susceptibilidad antimicrobiana de alto rendimiento usó un ensayo de dispositivo de biopelícula de Calgary (MBEC™ P&G, Innovatech). El protocolo estándar puede dividirse en una serie de etapas, que se detallan a continuación.

10 Cultivo de organismos y formación de las biopelículas.

a. Usar una reserva criogénica (a -70 °C), extender un primer sub-cultivo de los organismos bacterianos enumerados anteriormente sobre agar triticasa de soja (TSA).

b. Incubar a 37 °C durante 24 horas y guardar la placa envuelta en parafilm a 4 °C.

c. Del primer sub-cultivo, extender un segundo sub-cultivo sobre TSA.

15 Incubar a 37 °C durante 24 horas. El segundo sub-cultivo debe usarse en el plazo de 24 horas a partir del momento en el que se sacó por primera vez de la incubación.

d. Usar el segundo sub-cultivo para crear un inóculo en 3 ml de agua de estéril que se corresponde con un patrón 0,5 de McFarland ($1,5 \times 10^8$ células por ml) en un tubo de ensayo de vidrio usando un hisopo de algodón estéril.

20 e. Diluir esta disolución 1:30 en CAMHB (o 1:10 en SDB para levadura).

f. Invertir el organismo diluido 3-5 veces para lograr la mezcla uniforme del organismo.

g. La densidad celular será confirmada por dilución en serie y depositar en placa muestras por triplicado del inóculo sobre TSA o SA.

25 h. El organismo diluido restante (22 ml) se colocará en las depresiones de un dispositivo MBEC HTP de 96 pocillos.

i. Poner la tapa del dispositivo de MBEC de 96 pocillos sobre la placa de fondo que contiene el organismo.

j. Poner el dispositivo en un agitador de balanceo en una estufa de incubación humidificada a 37 °C durante 24 horas establecida a 3-4 balanceos por minuto.

30 k. Se usaron placas de poli-L-lisina para cultivar *C. paratropicalis* y *C. albicans*. Éstas se prepararon diluyendo 0,1 % (peso/volumen) de disolución de poli-L-lisina (Sigma P8920) 10X en agua desionizada que se esterilizó por filtración.

Se prepararon placas de microtitulación de 96 pocillos estériles bajo una campana de flujo laminar.

35 Cada placa incluyó controles de esterilidad, controles de crecimiento y pocillo de exposición a antibióticos. Se usó gentamicina para las bacterias y anfotericina B para *Candida* en intervalos de concentración de 1024 mcg/ml a 1 mcg/ml. Los organismos se probaron usando momentos de tiempo de exposición de 24 horas. Se evaluó una placa por organismo por momento de tiempo. Se usaron muestras por triplicado para evaluar el impacto de la formulación multienzimática sobre la formación de biopelículas.

40 Se determinaron la concentración inhibitoria mínima planctónica (MIC) y la concentración bactericida mínima MBC después de incubar la placa de exposición a 35 ± 2 °C durante 24 horas. La determinación de MIC se hizo por inspección visual. La MIC se define como la concentración mínima que inhibe el crecimiento del organismo. Los resultados de MBC se determinan tras la incubación de 24 horas por +/- crecimiento.

45 Los resultados de concentración de erradicación de biopelícula mínima (MBEC) se determinaron tras la incubación de 24 horas a partir de los paneles de MBEC usando el lector de placas conjuntamente con los datos de reducción de log₁₀. La turbidez se evaluó visualmente en los pocillos de la placa de recuperación. Alternativamente, se usó un lector de placas de microtitulación para obtener mediciones de densidad óptica a 630 nm (DO₆₃₀). Pocillos transparentes (DO₆₃₀ < 0,1) son evidencia de la erradicación de biopelículas. La MBEC se define como la concentración mínima de antibiótico que inhibe el crecimiento de la biopelícula.

Los resultados del experimento 1 fueron los siguientes:

a. **Escherichia coli O157:H7** - No se observaron puntos de corte de MIC, MBC y MBEC con la multienzima probada. La formulación multienzimática no tuvo actividad anti-biopelícula en absoluto, excepto las 2 concentraciones probadas más bajas. Los datos se tabulan a continuación:

							Estadística*	
Reducción logarítmica	Placa - Reducción logarítmica de enzima (prueba de GC)						Reducción logarítmica frente a GC	
Dilución (mg/ml)	Filtrada	1	2	3	Mean	± DE	P	S/NS*
50,00	-0,42	0,70	0,31	0,16	0,39	0,28	0,00	S
25,00	0,53	1,18	1,37	1,53	1,36	0,17	0,00	S
12,50	1,70	1,64	2,00	1,64	1,76	0,21	0,00	S
6,25	2,78	1,70	2,00	1,58	1,76	0,22	0,00	S
3,13	0,78	0,20	0,53	0,78	0,50	0,29	0,00	S
1,56	0,58	0,78	1,00	0,88	0,89	0,11	0,00	S
0,78	0,14	0,25	0,23	0,23	0,23	0,01	0,00	S

*Prueba de la T de Student bilateral de datos no emparejados (para significación estadística, $p \leq 0,05$)

5 b. **Klebsiella pneumoniae ATCC 4352** - Para MIC y MBC no se observaron puntos de corte a las concentraciones probadas. El valor de MBEC para la formulación multienzimática fue 6,25 mg/ml. La formulación multienzimática tuvo actividad anti-biopelícula con reducciones logarítmicas de 3,0 - 3,8 a las concentraciones de 50 - 6,25 mg/ml y ~1,5 para las concentraciones más bajas. Los datos se tabulan a continuación:

							Estadística*	
Reducción logarítmica	Placa - Reducción logarítmica de enzima (prueba de GC)						Reducción logarítmica frente a GC	
Dilución (mg/ml)	Filtrada	1	2	3	Media	± DE	p	S/NS*
50,00	3,65	3,87	3,39	4,35	3,87	0,48	0,00	S
25,00	3,02	3,35	3,65	3,57	3,52	0,16	0,00	S
12,50	2,87	3,17	3,04	3,04	3,09	0,07	0,00	S
6,25	2,04	3,65	3,44	3,35	3,48	0,15	0,00	S
3,13	1,57	1,23	2,35	1,50	1,69	0,58	0,00	S
1,56	0,44	1,39	1,50	1,50	1,46	0,06	0,00	S
0,78	0,44	1,50	1,74	1,74	1,66	0,14	0,00	S
0,39	1,65	1,14	2,04	1,57	1,58	0,45	0,00	S

*Prueba de la T de Student bilateral de datos no emparejados (para significación estadística, $p \leq 0,05$)

10 c. **Candida paratropicalis ATCC 99916** - No se observaron valores de corte de MIC, MBC y MBEC a las concentraciones probadas. La formulación multienzimática tuvo actividad anti-biopelícula con una reducción logarítmica a las concentraciones entre 25 mg/ml y 1,56 mg/ml. Los datos se tabulan a continuación:

							Estadística*	
Reducción logarítmica	Placa - Reducción logarítmica de enzima (prueba de GC)						Reducción logarítmica frente a GC	
Dilución (mg/ml)	Filtrada	1	2	3	Media	± DE	p	S/NS*
50,00	-0,40	-0,36	-0,51	-0,36	-0,41	0,08	0,00	S
25,00	-0,54	-0,06	0,16	-0,27	-0,06	0,21	0,00	S
12,50	0,94	1,34	1,16	1,64	1,38	0,24	0,00	S
6,25	1,16	0,94	1,64	1,34	1,30	0,35	0,00	S
3,13	1,34	1,16	1,04	1,64	1,28	0,32	0,00	S
1,56	0,46	1,34	1,16	1,16	1,22	0,10	0,00	S
0,78	0,94	1,04	0,60	-0,06	0,52	0,55	0,00	S
0,39	0,04	0,34	1,04	-0,06	0,44	0,56	0,00	S

*Prueba de la T de Student bilateral de datos no emparejados (para significación estadística, $p \leq 0,05$)

d. *Candida albicans* SJ2083133 no formó de forma fiable biopelícula y no pudo evaluarse la multienzima.

EJEMPLO 2:

- 5 El Experimento 2 evaluó la formulación multienzimática anterior sin y con 125 mg de ácido etilendiaminatetraacético disódico para la actividad anti-biopelícula contra *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 y *Staphylococcus aureus* MRSA U de C #18. El medio de crecimiento y las condiciones fueron TSB/TSA, aerobias y 35 ± 2 °C. El diseño experimental y las condiciones fueron como se han descrito anteriormente para el experimento 1.

Los resultados del experimento 2 fueron los siguientes:

- 10 *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 - Se encontró que MIC, MBC y MBEC para la formulación multienzimática no tenía puntos de corte a las concentraciones probadas. La formulación multienzimática no tuvo actividad anti-biopelícula en absoluto, excepto las concentraciones probadas más bajas. Las reducciones logarítmicas frente a los controles de crecimiento (GC) fueron significativos al nivel de $P \leq 0,05$. Los datos se tabulan a continuación:

Reducción logarítmica	Placa - Reducción logarítmica de enzima (prueba de GC)					
Dilución (mg/ml)	Filtrada	1	2	3	Media	± DE
50,00	2,38	1,90	1,90	1,58	1,79	0,19
25,00	3,15	3,01	2,81	2,38	2,73	0,32
12,50	3,55	1,65	1,81	0,53	1,33	0,70
6,25	1,38	1,78	2,74	2,08	2,20	0,49
3,13	0,85	3,01	1,55	1,74	2,10	0,79
1,56	1,85	2,16	2,01	1,81	1,99	0,17
0,78	0,44	-0,19	2,65	0,78	1,08	1,44
0,34	0,08	0,38	-0,10	0,53	0,27	0,33

- 15 *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 - Se encontró que la MBEC para la formulación multienzimática con EDTA no tenía punto de corte a las concentraciones probadas. Se observó que la MBC para multienzima/EDTA tenía el punto de corte a 3,13 mg/ml y se encontró que la MIC para multienzima/EDTA tenía el punto de corte a 1,56 mg/ml. La reducción logarítmica para multienzima/EDTA muy superior a la reducción logarítmica para la formulación

multienzimática y a una concentración mucho más baja para multienzima/EDTA que muestra que multienzima/EDTA tiene un efecto mucho mayor en la erradicación de la biopelícula bacteriana. Los datos se tabulan a continuación.

Reducción logarítmica	Placa - Reducción logarítmica de enzima/EDTA (prueba de GC)					
	Filtrada	1	2	3	Media	± DE
Dilución (mg/ml)						
50,00	2,85	2,38	3,85	1,85	2,69	1,03
25,00	3,55	2,81	5,85	5,85	4,84	1,76
12,50	2,38	3,55	5,85	5,85	5,09	1,33
6,25	2,71	3,38	3,85	5,85	4,36	1,32
3,13	3,85	5,85	5,85	5,85	5,83	0,00
1,56	2,65	3,85	3,38	3,55	3,59	0,24
0,78	2,16	5,85	5,85	3,85	5,19	1,16
0,34	0,95	0,30	0,65	0,49	0,48	0,18

- 5 **Staphylococcus aureus** MRSA 399 - Se encontró que MIC, MBC y MBEC para la formulación multienzimática no tenían punto de corte a las concentraciones probadas. La formulación multienzimática presentó actividad anti-biopelícula a través de un intervalo de concentraciones, aunque la actividad era incoherente. Se indica la variabilidad entre las muestras por triplicado. Los datos se tabulan a continuación.

Reducción logarítmica	Placa - Reducción logarítmica de enzima (prueba de GC)					
	Filtrada	1	2	3	Media	± DE
Dilución (mg/ml)						
50,00	-1,27	3,73	0,73	3,73	2,73	1,73
25,00	3,73	3,73	0,25	3,73	2,57	2,01
12,50	-0,75	-2,75	3,73	-0,88	0,03	3,33
6,25	1,72	3,73	3,73	-0,05	2,47	2,18
3,13	1,42	1,72	0,42	3,73	1,96	1,66
1,56	-0,48	-0,32	-1,88	-0,12	-0,77	0,96
0,78	-1,88	-0,27	-1,45	0,65	-0,36	1,05
0,34	-1,39	1,72	-0,27	3,73	1,72	2,00

EJEMPLO 3:

- 10 **Staphylococcus aureus** MRSA 399 - Se encontró que la MBEC para la formulación multienzimática con EDTA no tenía punto de corte a las concentraciones probadas. Se observó que MIC y MBC para la formulación multienzimática con EDTA tenían el punto de corte a 1,56 mg/ml. La formulación multienzimática con EDTA más potente y más eficaz en la erradicación de la biopelícula bacteriana en comparación con la multienzima ya que la formulación multienzimática con la reducción logarítmica más grande de EDTA es a una concentración más baja que la reducción logarítmica más grande de multienzima. La observación es que la enzima/EDTA para actividades de MIC y MBC indica propiedades antimicrobianas significativas, además de anti-biopelícula. Los datos se tabulan a continuación.

Reducción logarítmica	Placa - Reducción logarítmica de enzima/EDTA (prueba de GC)					
	Filtrada	1	2	3	Media	± DE
Dilución (mg/ml)						
50,00	-1,60	0,61	3,73	-0,27	1,35	2,10

Reducción logarítmica	Placa - Reducción logarítmica de enzima/EDTA (prueba de GC)					
25,00	-2,97	3,73	3,73	-1,75	1,90	3,16
12,50	0,95	3,73	3,73	3,73	3,73	0,00
6,25	3,73	0,73	3,73	0,42	1,63	1,83
3,13	3,73	3,73	3,73	1,72	3,06	1,16
1,56	1,72	1,72	3,73	3,73	3,06	1,16
0,78	0,73	3,73	3,73	3,73	3,73	0,00
0,34	3,73	3,73	3,73	3,73	3,73	0,00

5 Todos los términos usados en el presente documento se usan según sus significados habituales, a menos que el contexto o definición indique claramente de otro modo. También a menos que se indique expresamente de otro modo, el uso de "o" incluye "y" y viceversa. Términos no limitantes no deben interpretarse como limitantes, a menos que se establezca expresamente, o el contexto indique claramente, de otro modo (por ejemplo, "que incluye", "que tiene" y "que comprende" normalmente indican "que incluye sin limitación"). Formas en singular, incluyendo en las reivindicaciones, tales como "un", "una", "el" y "la" incluyen la referencia en plural, a menos que se establezca expresamente, o el contexto indique claramente, de otro modo.

10 El alcance de las presentes composiciones anti-biopelícula fisiológicamente aceptables, sistemas y métodos, etc., incluye tanto conceptos de medios más función como etapa más función. Sin embargo, las reivindicaciones no deben interpretarse como que indican una relación "medios más función", a menos que la palabra "medios" esté específicamente citada en una reivindicación, y no deben interpretarse como que indican una relación de "medios más función" donde la palabra "medios" está citada específicamente en una reivindicación. Similarmente, las reivindicaciones no deben interpretarse como que indican una relación de "etapa más función", a menos que la palabra "etapa" esté específicamente citada en una reivindicación, y deben interpretarse como que indican una relación de "etapa más función" donde la palabra "etapa" está específicamente citada en una reivindicación.

20 De lo anterior se apreciará que, aunque realizaciones específicas han sido tratadas en el presente documento para fines de ilustración, pueden hacerse diversas modificaciones sin desviarse del espíritu y alcance de la discusión en el presente documento. Por consiguiente, los sistemas y métodos, etc., incluyen tales modificaciones, además que no deben interpretarse como limitantes, a menos que se establezca expresamente, o el contexto indique claramente, de otro modo (por ejemplo, "que incluye", "que tiene" y "que comprende" normalmente indican "que incluye sin limitación"). Formas en singular, incluyendo en las reivindicaciones, tales como "un", "una", "el" y "la" incluyen la referencia en plural, a menos que se establezca expresamente, o el contexto indique claramente, de otro modo.

25 De lo anterior se apreciará que, aunque realizaciones específicas han sido tratadas en el presente documento para fines de ilustración, pueden hacerse diversas modificaciones.

REIVINDICACIONES

1. Una composición para su uso en la inhibición o el tratamiento de una infección por biopelícula gastrointestinal, que comprende combinar una cantidad farmacéuticamente eficaz de una celulasa estable a ácidos, una glucoamilasa, un complejo de hemicelulasa/pectinasa estable a ácidos, β -glucanasa, un complejo de proteasa/peptidasa que tiene actividad de dipeptidil peptidasa IV (DPP-IV), quitosanasa, lisozima y *Serratia* peptidasa con al menos uno de un vehículo, adyuvante, excipiente, tampón y diluyente farmacéuticamente aceptable.
2. La composición para su uso en la inhibición o el tratamiento de una infección por biopelícula gastrointestinal según la reivindicación 1, en la que la composición comprende además un agente anti-poli- β -1,6-*N*-acetil-D-glucosamina (anti-poli- β -1,6-GlcNAc) seleccionado de hexosaminidasa o dispersina B.
3. La composición para su uso en la inhibición o el tratamiento de una infección por biopelícula gastrointestinal según la reivindicación 1 o 2, en la que la cantidad de celulasa por dosis oscila de 1 a 10.000 CU, la cantidad de complejo de hemicelulasa/pectinasa oscila de 1 a 8.000 HSU y la cantidad de β -glucanasa oscila de 1 a 1000 BGU.
4. La composición para su uso en la inhibición o el tratamiento de una infección por biopelícula gastrointestinal según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que la composición comprende además una cantidad eficaz de al menos un agente estable a ácidos seleccionado de los siguientes: un disacárido; α -amilasa; β -amilasa; endoglucanasa; xilanasas; lipasa; bromelaína; papaína; ficina; proteasa de kiwi; cualquier proteasa o proteinasa derivada de planta; o fitasa.
5. La composición para su uso en la inhibición o el tratamiento de una infección por biopelícula gastrointestinal según la reivindicación 1 a 4, en la que la composición comprende además al menos una enzima estable a ácidos en una cantidad capaz de degradación de biopelícula, la al menos una enzima seleccionada de las siguientes: 1,2-1,3- α -D-manano manohidrolasa, 1,3- β -D-xilano xilanhidrolasa, 1,3- β -D-glucano glucanhidrolasa, 1,3(1,3;1,4)- α -D-glucano 3-glucanhidrolasa, 1,3(1,3;1,4)- β -D-glucano 3(4)-glucanhidrolasa, 1,3-1,4- α -D-glucano 4-glucanhidrolasa, 1,4- α -D-glucano glucanhidrolasa, 1,4- α -D-glucano glucohidrolasa, 1,4-(1,3;1,4)- β -D-glucano 4-glucanhidrolasa, 1,4- β -D-glucano glucohidrolasa, 1,4- β -D-xilano xilanhidrolasa, 1,4- β -D-manano mananhidrolasa, 1,5- α -L-arabinanhidrolasa, 1,4- α -D-glucano maltohidrolasa, 1,6- α -D-glucano 6-glucanhidrolasa, 2,6- β -fructano fructanhidrolasa, α -dextrina 6-glucanhidrolasa, α -D-galactósido galactohidrolasa, α -D-glucósido glucohidrolasa, α -D-manósido manohidrolasa, acilneuraminil hidrolasa, galactohidrolasa de polisacárido capsular de *Aerobacter*, β -D-fructofuranósido fructohidrolasa, 1-D-fucósido fucohidrolasa, α -D-fructano fructohidrolasa, β -D-galactósido galactohidrolasa, 1,3-D-glucósido glucohidrolasa, β -D-glucuronósido, glucuronosohidrolasa, β -D-manósido manohidrolasa, β -N-acetil-D-hexosaminida N-acetilhexosamino hidrolasa, celulosa-sulfato sulfohidrolasa, colagenasa, dextrina 6- α -D-glucanhidrolasa, glucoproteína-fosfatidilinositol fosfatidohidrolasa, hialuronato 4-glucanhidrolasa, hialuronoglucuronidasa, pectina pectilhidrolasa, peptidoglicano N-acetilmuramoilhidrolasa, fosfatidilcolina 2-acilhidrolasa, fosfatidilcolina 1-acilhidrolasa, poli(1,4- α -D-galacturónido), poli(1,4-(N-acetil- β -D-glucosaminida))-glucanhidrolasa, proteasas, sacarosa α -glucosidasa, triacilglicerol acilhidrolasa, triacilglicerol proteína-acilhidrolasa.
6. La composición para su uso en la inhibición o el tratamiento de una infección por biopelícula gastrointestinal según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que la composición comprende además una subtilisina estable a ácidos en una cantidad capaz de degradación de biopelícula.
7. La composición para su uso en la inhibición o el tratamiento de una infección por biopelícula gastrointestinal según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que la composición comprende además DNasa I estable a ácidos en una cantidad capaz de degradación de biopelícula.
8. La composición para su uso en la inhibición o el tratamiento de una infección por biopelícula gastrointestinal según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que la composición comprende además al menos uno de aceite de orégano, berberina, ácido undecilénico, un antibiótico de venta con receta, un antimicrobiano de venta con receta, un microorganismo probiótico o un prebiótico.