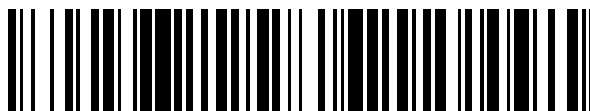


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 727 746**

51 Int. Cl.:

C07K 17/00 (2006.01)

A61K 38/47 (2006.01)

A61K 38/48 (2006.01)

A61K 38/46 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.01.2010 E 15152332 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.05.2019 EP 2947100**

54 Título: **Composiciones orales para el tratamiento o la prevención de infecciones por E. Coli**

30 Prioridad:

06.01.2009 US 142718 P

17.02.2009 US 153279 P

20.04.2009 US 170856 P

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

18.10.2019

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 727 746 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 orales para el tratamiento o la prevención de infecciones por *E. Coli*

5 Campo Técnico

Esta descripción se refiere a composiciones, que incluyen composiciones farmacéuticas tales como composiciones antibióticas, para usar en el tratamiento o la prevención de infecciones de *E. coli* en seres humanos y otros animales. Esta descripción se refiere, además, a composiciones, tales como desinfectantes, antibacteriales, antisépticos y detergentes, y métodos para el uso de las mismas para erradicar o reducir la presencia de *E. coli* en superficies, que incluyen superficies inanimadas y biológicas (por ejemplo, piel, heridas), y/o para atenuar la infectividad de *E. coli* para prevenir y/o para reducir la dispersión de infecciones de *E. coli*.

15 Antecedentes de la invención

Escherichia coli (*E. coli*) es un tipo de bacteria que puede causar enfermedades humanas graves. Si bien existen muchos tipos de bacterias *E. coli*, solo determinados tipos causan enfermedades transmitidas por alimentos. Cientos de cepas inofensivas de *E. coli* pueden encontrarse ampliamente en la naturaleza, incluidos los tractos intestinales de los seres humanos y otros animales de sangre caliente. Sin embargo, las cepas que causan enfermedades son una causa frecuente de infecciones tanto en el tracto intestinal como en el sistema genitourinario.

En 1982, los científicos identificaron la primera cepa dañina de *E. coli* transmitida por alimentos en los Estados Unidos. La *E. coli* transmitida por alimentos que provoca enfermedades y que se encuentra más comúnmente en este país se denomina 0157:H7. Los ganados son las fuentes principales de *E. coli* 0157:H7, pero estas bacterias también pueden encontrarse en otros mamíferos domésticos y silvestres. *E. coli* serotipo 0157:H7 es una variedad rara de *E. coli* que produce grandes cantidades de una o más toxinas potentes y relacionadas, que provocan un daño grave al revestimiento del intestino.

Varias cepas diferentes de *E. coli* dañina pueden provocar enfermedad diarreica. Los tipos particularmente peligrosos de *E. coli*, tales como *E. coli* 0157:H7, producen uno o más tipos de toxinas (venenos) denominadas toxinas Shiga. Las toxinas Shiga pueden dañar gravemente el revestimiento de los intestinos y los riñones. Estos tipos de bacterias se denominan *E. coli* productoras de toxinas Shiga (STEC). La STEC frecuentemente provoca diarrea con sangre y puede conducir a una insuficiencia renal en niños o en personas con sistemas inmunitarios debilitados. La STEC también se conoce como *E. coli* verocitotóxica (VTEC) o *E. coli* enterohemorrágica (EHEC); todas estas se refieren generalmente al mismo grupo de bacterias. La STEC más comúnmente identificada en América del Norte es *E. coli* 0157:H7 (frecuentemente acortado a *E. coli* 0157 o incluso "0157").

La *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), que produce una toxina diferente, puede provocar diarrea. Estas cepas típicamente provocan la denominada diarrea del viajero porque comúnmente contaminan los alimentos y el agua en los países en desarrollo. La *E. coli* enteropatógena (EPEC) provoca diarrea persistente (que dura 2 semanas o más) y es más común en países en desarrollo donde puede transmitirse a los seres humanos a través del agua contaminada o por el contacto con animales infectados. Otros tipos de *E. coli*, que incluyen 026:H11 y 0111:H8, también se han encontrado en los Estados Unidos y pueden provocar enfermedades en las personas.

La infección con *E. coli* se caracteriza por calambres severos (dolor abdominal) y diarrea que inicialmente es acuosa pero se vuelve muy sanguinolenta. Ocasionalmente se producen vómitos. La fiebre es de bajo grado o está ausente. La enfermedad suele ser autolimitada y dura un promedio de 8 días. Algunos individuos solamente presentan diarrea acuosa.

La colitis hemorrágica se diagnostica mediante el aislamiento de *E. coli* de serotipo 0157:H7 u otra *E. coli* productora de verotoxina a partir de heces diarreicas. Alternativamente, las heces pueden analizarse directamente para detectar la presencia de verotoxina. La confirmación se puede obtener mediante aislamiento de *E. coli* del mismo serotipo a partir del alimento incriminado.

Además de *E. coli* 0157, muchos otros tipos (denominados serogrupos) de STEC provocan enfermedades. Estos otros tipos a veces se denominan "STEC no-0157". Los serogrupos de *E. coli* 026, 0111 y 0103 son los serogrupos no-0157 que con mayor frecuencia provocan enfermedades en personas en los Estados Unidos.

Personas de cualquier edad pueden infectarse con STEC. Los niños muy pequeños y los ancianos son más propensos a desarrollar enfermedades graves y síndrome urémico hemolítico (HUS) que otros, pero incluso los niños mayores y los adultos jóvenes saludables pueden enfermarse gravemente. Los síntomas de las infecciones por STEC varían para cada persona pero frecuentemente incluyen calambres estomacales severos, diarrea (frecuentemente sanguinolenta) y vómitos.

Alrededor del 5 al 10 % de las personas diagnosticadas con infección por STEC desarrollan una complicación potencialmente mortal conocida como síndrome urémico hemolítico (HUS). Los indicios de que una persona está desarrollando HUS incluyen disminución de la frecuencia de micción, sensación de cansancio, y pérdida del color rosado

en las mejillas y dentro de los párpados inferiores. Las personas con HUS deben ser hospitalizadas porque sus riñones pueden dejar de funcionar y pueden desarrollar otros problemas graves. La mayoría de las personas con HUS se recuperan en unas pocas semanas, pero algunas sufren daño permanente o mueren.

5 Las STEC viven en los intestinos de animales rumiantes, que incluyen ganado vacuno, cabras, ovejas, ciervos y alces. La fuente principal de enfermedades humanas es el ganado vacuno. Las STEC que provocan enfermedades humanas generalmente no enferman a los animales. Otros tipos de animales, incluidos cerdos y aves, a veces adquieren STEC del medio ambiente y pueden transportarlas o dispersarlas.

10 Resumen

Esta descripción se refiere a la prevención y/o el tratamiento de infecciones de *E. coli*, que incluyen infecciones de *E. coli* virulentas y resistentes a antibióticos, tales como STEC, ETEC o EPEC, con el uso de una composición farmacéutica que comprende enzimas digestivas, tales como enzimas pancreáticas u otras del sistema digestivo (por ejemplo, enzimas pancreáticas porcinas) o enzimas derivadas de plantas, fúngicas o de microorganismos, que descomponen los componentes de los alimentos.

La invención proporciona composiciones farmacéuticas orales para su uso, como se define en las reivindicaciones.

20 Como se usa en la presente, una composición farmacéutica puede usarse para indicaciones humanas o veterinarias. En consecuencia, las composiciones farmacéuticas pueden ser útiles para tratamiento profiláctico y/o terapéutico de poblaciones humanas o de otros mamíferos (por ejemplo, cerdo, caballo, vaca, oveja, cabra, mono, rata, ratón, gato, perro) o de poblaciones de aves (por ejemplo, pato, ganso, pollo, pavo).

25 Las composiciones farmacéuticas pueden usarse solas, y/o en combinación con otros regímenes antibacterianos o antibióticos (por ejemplo, *anti-E. coli*), y/o con otros agentes terapéuticos o antibióticos después de la infección para tratar infecciones de *E. coli*.

30 Además, en la presente se describen composiciones bactericidas y/o bacteriostáticas que comprenden una o más enzimas digestivas para usar como o en desinfectantes, antibacteriales, detergentes y antisépticos, por ejemplo, en hospitales, hogares de ancianos, guarderías, centros de día, escuelas, ambientes de trabajo, entornos de servicio de alimentos, transporte público y servicios sanitarios, para reducir, atenuar y/o destruir las *E. coli* presentes en tales ambientes. Las superficies tratadas con las composiciones descritas pueden ser grandes (por ejemplo, mesas de quirófano, puertas, mesas de cambio, sistemas de ventilación) o pequeñas (por ejemplo, dispositivos médicos, manijas de puertas); inanimadas o no vivas (mesas) o tejido vivo (manos, por ejemplo, detergentes para lavarse las manos; heridas, por ejemplo, heridas quirúrgicas o heridas provocadas por accidentes/traumas). Por lo tanto las composiciones pueden ser útiles para tratar superficies para reducir o erradicar la *E. coli* en ellas, o para atenuar o reducir la infectividad de *E. coli*, y así prevenir o reducir la dispersión de *E. coli*.

40 En consecuencia, un objeto de la presente descripción es describir un método para el tratamiento o la prevención de una infección de *E. coli* en un ave o un mamífero, que comprende administrar al ave o al mamífero una cantidad con eficacia terapéutica de una composición farmacéutica que comprende enzimas digestivas de acuerdo con la invención. Las enzimas digestivas comprenden enzimas seleccionadas del grupo que consiste en proteasas, amilasas, celulasas, sacarasas, maltasas, papaína y lipasas. En algunas modalidades, las enzimas digestivas comprenden una o más enzimas pancreáticas. Las enzimas digestivas se derivan, independientemente, de una fuente animal, una fuente microbiana, una fuente vegetal, una fuente fúngica, o se preparan sintéticamente. En algunas modalidades, la fuente animal es páncreas de cerdo.

50 En algunas modalidades, una composición farmacéutica comprende al menos una amilasa, una mezcla de proteasas que comprende quimotripsina y tripsina, y al menos una lipasa. En algunas modalidades, una composición farmacéutica comprende al menos una proteasa y al menos una lipasa, y en donde la relación de proteasas totales a lipasas totales (en unidades USP) está en el intervalo de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 20:1.

55 En algunas modalidades, la composición farmacéutica es una formulación de dosificación seleccionada del grupo que consiste en: píldoras, tabletas, cápsulas, comprimidos de forma ovalada, rociados, cremas, lociones, aerosoles, emulsiones, polvos, líquidos, geles y una combinación de cualquiera de estos.

La composición farmacéutica se formula para una administración oral.

60 Se describe además un método para tratar un mamífero o ave que presente uno o más síntomas de una infección de *E. coli* que comprende administrar al mamífero o ave una cantidad con eficacia terapéutica de una composición que comprende enzimas digestivas de acuerdo con la invención.

65 Se describe además un método para el tratamiento de la diarrea que comprende administrar una composición farmacéutica que comprende enzimas digestivas de acuerdo con la invención a un individuo. La descripción, además, caracteriza un método para sanear o desinfectar una superficie para reducir la cantidad de *E. coli* en ella o para erradicar

las *E. coli* en ella, que comprende aplicar a la superficie una composición que comprende una o más enzimas digestivas. La superficie puede ser una superficie viva (por ejemplo, piel, herida) o una superficie inanimada o no viva (por ejemplo, dispositivo médico, producto alimenticio).

5 En la presente se describe además un método para reducir la cantidad de *E. coli* presente en una región de la piel, tejido, o herida de un mamífero o ave que comprende aplicar a la región de la piel, tejido, o herida una composición que comprende una o más enzimas digestivas.

10 Además se presenta un desinfectante que comprende una o más enzimas digestivas, en donde el desinfectante tiene un coeficiente fenólico de > 1 a aproximadamente 20 para *S. aureus* o *E. coli*.

La descripción proporciona, además, un antibiótico que comprende una o más enzimas digestivas, en donde el antibiótico es bactericida y/o bacteriostático para *E. coli*.

15 Similarmente, se describe también un detergente que comprende una o más enzimas digestivas, en donde el detergente es bactericida y/o bacteriostático para *E. coli*.

Además se proporciona un antiséptico que comprende una o más enzimas digestivas, en donde el antiséptico es bactericida y/o bacteriostático para *E. coli*.

20 La descripción describe, además, un desinfectante que comprende una o más enzimas digestivas, en donde el desinfectante es bactericida y/o bacteriostático para *E. coli*

25 Los detalles de una o más modalidades de la invención se exponen en los dibujos adjuntos y en la descripción más adelante. Otras características, objetos, y ventajas de la invención resultarán evidentes a partir de la descripción y los dibujos, y de las reivindicaciones.

Descripción detallada

30 El término "administración" o "administrar" se refiere a un método para dar una dosificación de una composición o composición farmacéutica a un vertebrado o invertebrado, que incluye un mamífero, un ave, un pez, o un anfibio, donde el método es mediante cualquier vía, por ejemplo, intrarrespiratoria, nasal, tópica, oral, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, transmucosal, bucal, rectal, vaginal o sublingual. El método de administración preferido puede variar en dependencia de diversos factores, por ejemplo, los componentes de la composición farmacéutica, el sitio de la enfermedad, la enfermedad implicada y la gravedad de la enfermedad.

El término "mamífero" se usa en su sentido biológico habitual. Por lo tanto, incluye específicamente seres humanos, ganado vacuno, caballos, perros y gatos, pero también incluye muchas otras especies.

40 El término "portador farmacéuticamente aceptable" o "excipiente farmacéuticamente aceptable" incluye cualquier y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes isotónicos y de retardo de la absorción y similares. El uso de tales medios y agentes para las sustancias farmacéuticamente activas es bien conocido en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con los ingredientes activos, se contempla su uso en las composiciones terapéuticas. Los ingredientes activos complementarios, tales como antibióticos, antifúngicos, antimicrobianos, también pueden incorporarse en las composiciones. Además, pueden incluirse diversos adyuvantes tales como los que se usan comúnmente en la técnica. Estos y otros compuestos similares se describen en la literatura, por ejemplo, en Merck Index, Merck & Company, Rahway, NJ. Consideraciones para la inclusión de diversos componentes en las composiciones farmacéuticas se describen, por ejemplo, en Gilman y otros (Eds.) (2006); Goodman and Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics, 11ma Ed., The McGraw-Hill Companies.

50 "Sujeto" o "paciente" o "individuo" como se usa en la presente, significa un ser humano o un mamífero no humano, por ejemplo, un perro, un gato, un ratón, una rata, una vaca, una oveja, un cerdo, una cabra, un primate no humano o un ave, por ejemplo, un pollo, así como cualquier otro vertebrado o invertebrado.

55 Por "cantidad con eficacia terapéutica" o "cantidad farmacéuticamente eficaz" típicamente es una que es suficiente para lograr el efecto deseado y puede variar de acuerdo con la naturaleza y la gravedad de la enfermedad, la naturaleza del sujeto y la potencia de la composición. Se apreciará que pueden emplearse diferentes concentraciones para la profilaxis que para el tratamiento de una enfermedad activa. Esta cantidad puede depender, además, de la altura, el peso, el sexo, la edad y la historia clínica del paciente.

60 Un efecto terapéutico alivia, en cierta medida, uno o más de los síntomas de la enfermedad, e incluye curar una enfermedad. "Curar" significa que los síntomas de la enfermedad activa se eliminan. Sin embargo, pueden existir ciertos efectos a largo plazo o permanentes de la enfermedad incluso después de lograr una cura (tal como daño tisular).

65 "Tratar", "tratamiento", o "que trata", como se usan en la presente se refieren a administrar una composición farmacéutica con fines terapéuticos. El término "tratamiento terapéutico" se refiere a administrar un tratamiento a un paciente que ya

padece de una enfermedad lo que provoca un efecto terapéuticamente beneficioso, tal como mejorar los síntomas existentes, prevenir síntomas adicionales, mejorar o prevenir las causas metabólicas subyacentes de los síntomas, posponer o prevenir un mayor desarrollo de un trastorno y/o reducir la gravedad de los síntomas que se desarrollarán o se espera que se desarrollen.

La presente descripción proporciona composiciones que comprenden enzimas digestivas para usar en el tratamiento y/o la prevención de infecciones de *E. coli*, que incluyen formas resistentes a antibióticos de *E. coli* y formas virulentas tales como STEC, ETEC o EPEC. La presente descripción describe, además, composiciones que comprenden una o más enzimas digestivas y métodos para usar las mismas como antisépticos, detergentes, desinfectantes y antibacteriales, por ejemplo, como composiciones bactericidas y/o bacteriostáticas, para erradicar o atenuar la *E. coli* y/o para reducir su infectividad. Las composiciones descritas en la presente incluyen una o más enzimas digestivas, que se postula que ayudan a la reducción, el debilitamiento, o la erradicación de *E. coli*, y por lo tanto a prevenir la contracción de infecciones de *E. coli* o a tratar infecciones de *E. coli* (por ejemplo, mejorar o aliviar los síntomas o reducir el curso temporal de la infección).

Composiciones

Una composición para usar como se describe en la presente puede incluir una o más enzimas digestivas. Si bien no está limitado por la teoría, se considera que la(s) enzima(s) digestiva(s) en la composición puede(n) degradar la pared celular de *E. coli*, la membrana, y/o estructuras proteicas, lo que conduce a la actividad bacteriostática y/o bactericida. Las composiciones demuestran actividad bactericida/bacteriostática específica de la especie contra *S. aureus* y *E. coli*, pero no contra *S. enterica*, lo que demuestra posiblemente que la vulnerabilidad de los dos organismos deriva de la degradación proteolítica de una secuencia proteica similar presente en los dos organismos.

Una enzima digestiva como se describe en la presente es una enzima que puede descomponer uno o más componentes de los alimentos (por ejemplo, proteínas, grasas, carbohidratos). Las enzimas digestivas pueden ser enzimas de origen animal (por ejemplo, enzimas pancreáticas u otras digestivas), o de origen vegetal, fúngico o de microorganismos, o pueden prepararse sintéticamente. Muchas enzimas digestivas están disponibles comercialmente o pueden aislarse y purificarse de otras fuentes por métodos bien conocidos por los expertos en la técnica. La actividad enzimática de las enzimas también puede evaluarse mediante el uso de ensayos estándar.

Las enzimas digestivas pueden usarse en cualquier combinación de tipo de enzima y cualquier combinación de fuentes de enzimas. En modalidades, las enzimas digestivas comprenden enzimas seleccionadas del grupo que consiste en proteasas, amilasas, celulasas, sacarosas, maltasas, papaína (por ejemplo, a partir de la papaya), bromelina (por ejemplo, de la piña), hidrolasas y lipasas. En algunas modalidades, las enzimas digestivas comprenden una o más enzimas pancreáticas. En modalidades de la invención, la composición comprende una o más proteasas, una o más lipasas y una o más amilasas. En algunas modalidades, la una o más proteasas comprenden quimotripsina y tripsina. En algunas modalidades, una composición como se describe en la presente consiste esencialmente en, o consiste en, la o las enzimas digestivas.

En determinadas modalidades, la composición puede comprender al menos una amilasa, al menos dos proteasas y al menos una lipasa. En determinadas modalidades, la composición puede incluir, además, una o más hidrolasas, papaína, bromelina, papaya, celulasas, pancreatina, sacarosas y maltasas.

Como se indica, la o las enzimas digestivas pueden derivarse de una fuente animal. En algunas modalidades, la fuente animal es un cerdo, por ejemplo, un páncreas de cerdo. Los extractos y formulaciones de enzimas pancreáticas de cerdo son conocidos por los expertos en la técnica y están disponibles comercialmente o pueden prepararse mediante el uso de métodos conocidos. Por ejemplo, una composición de enzimas pancreáticas puede adquirirse de Scientific Protein Laboratories (designada PEC). Una composición de enzimas pancreáticas, o cualquier composición en la presente, puede ajustarse para modificar la cantidad de una o más enzimas digestivas contenidas en ella, por ejemplo, el contenido de lipasa, amilasa o proteasa, tal como por métodos de producción y/o procesamiento o mediante la adición selectiva de enzimas exógenas, activadores o inhibidores a la composición.

En determinadas circunstancias, puede ser conveniente tener una actividad relativamente mayor de proteasas que de lipasas. Por lo tanto, en algunas modalidades, una composición comprende al menos una proteasa y al menos una lipasa, en donde la relación de proteasas totales a lipasas totales (en unidades USP) está en el intervalo de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 20:1 que incluye 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, incluidos todos los valores intermedios. En algunas modalidades, la relación de proteasas a lipasas está en el intervalo de aproximadamente 4:1 a aproximadamente 10:1 que incluye 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1 y 10:1, incluidos todos los valores intermedios.

En determinadas circunstancias puede ser útil modificar la cantidad de una actividad enzimática en particular en una composición determinada. La actividad de la o las enzimas digestivas puede ajustarse en una variedad de maneras conocidas por el experto, por ejemplo, aumentando la cantidad de la enzima en particular, o ajustando los componentes de la composición, por ejemplo, mediante el uso de estabilizadores, inhibidores y activadores. En algunas modalidades, una composición descrita en la presente 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 (por ejemplo, 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 algunas modalidades, una composición descrita en la presente 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 (por ejemplo, 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 algunas modalidades, una composición descrita en la presente 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 (por ejemplo, 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 algunas modalidades, una composición descrita en la presente 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. Una modalidad ilustrativa 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 algunas modalidades, una composición puede formularse para estabilizar la o las enzimas digestivas, por ejemplo, para preservar la actividad enzimática de las enzimas. Las técnicas de estabilización pueden limitar o prevenir la autodegradación de la o las enzimas en una composición y ayudar a mantener la actividad enzimática, aumentar la vida útil, y ayudar en la tolerancia de la actividad de las composiciones a los cambios de temperatura, humedad y condiciones de almacenamiento. Por ejemplo, en algunas modalidades, la o las enzimas en la composición se encapsulan, por ejemplo, se encapsulan en lípidos. En otras aplicaciones, pueden emplearse variaciones en excipientes, pH, inhibidores de enzimas, etcétera, para ayudar en la estabilización de las enzimas. Las técnicas de estabilización apropiadas dependerán de la aplicación prevista para la composición (por ejemplo, antibiótico frente a detergente), la vía de administración, la forma de la composición, el sitio de administración/actividad previsto y otros factores, y pueden determinarse por los expertos en la técnica.

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

En determinadas modalidades, un estabilizador de la actividad enzimática puede ser una composición seleccionada de (1) composiciones que se sabe que son eficaces en estabilizar enzimas en soluciones acuosas líquidas, que incluyen compuestos y sistemas estabilizadores de enzimas, (2) "inhibidores de micelas" seleccionados y mezclas de (1) y (2). En algunas modalidades, el estabilizador de la actividad es una concentración adecuada de aniones de boro. En algunos casos, el estabilizador de la actividad se solvata en un poliol y puede combinarse con sinergistas estabilizadores de enzimas o adyuvantes que forman un sistema estabilizador de enzimas. Los "inhibidores de micelas" preferidos incluyen especies conocidas porque modifican así como inhiben la formación de micelas y pueden seleccionarse de disolventes miscibles en agua tales como alcanoles C1-C6, dioles C1-C6, alquilen C2-C24 glicol éteres, alquilenglicol alquil éteres y mezclas de estos. Un inhibidor de micelas muy preferido es el di-(propilenglicol) metil éter ("DPM") y análogos de este que modifican la formación de micelas.

Un ejemplo de un "sistema estabilizador de enzimas" es un compuesto de boro (por ejemplo ácido bórico) que en el pasado se ha usado solo o con otros adyuvantes y o sinergistas seleccionados (por ejemplo compuestos amino polifuncionales, antioxidantes, etcétera) para proteger enzimas proteolíticas y otras enzimas en el almacenamiento y en diversos productos.

Un estabilizador de la actividad puede escogerse para minimizar sustancialmente la concentración inhibitoria mínima ("MIC") de una enzima digestiva en la formulación. La MIC es una medida de la concentración mínima del biocida que logra prevenir el crecimiento bacteriano en un cultivo durante un periodo de tiempo especificado, por ejemplo 24 hrs. Los detalles de la prueba de MIC se muestran en "Bailey & Scott 'Diagnostic Microbiology', 8va edición, 1990 en la página 177.

En algunas modalidades, una composición descrita en la presente puede recubrirse con una variedad de recubrimientos naturales o sintéticos, por ejemplo, para proporcionar una liberación cronometrada de las enzimas, para proporcionar enmascaramiento del sabor o el olor, o para estabilizar las enzimas. Las preparaciones enzimáticas recubiertas, que incluyen composiciones enzimáticas recubiertas por lípidos o encapsuladas en lípidos, que comprenden una o más enzimas digestivas útiles para los métodos y las composiciones descritos en la presente se describen en el documento con núm. de serie U.S. 12/386,051, presentado el 13 de abril de 2009. Dichas preparaciones recubiertas pueden proporcionar características deseadas, que incluyen mayor estabilidad en almacenamiento, una aerosolización reducida de las formulaciones en polvo o sólidas, enmascaramiento del olor y el sabor, estabilización de enzimas, y liberación retardada o cronometrada de las enzimas.

Otros aditivos para su inclusión en las composiciones descritas en la presente pueden ser determinados por los expertos en la técnica, y se basarán en una serie de características, que incluyen aplicación prevista, por ejemplo, aplicaciones a seres humanos frente a veterinarias; perfil de liberación deseado; farmacocinética deseada; seguridad; estabilidad; y

características físicas (olor, color, sabor, vertido, aerosolización). Los ingredientes, excipientes, aglutinantes, agentes de carga, saborizantes, colorantes, etcétera, adecuados para la formulación, pueden determinarse y evaluarse por métodos conocidos por los expertos.

5 Composiciones farmacéuticas y antibióticos para uso humano y veterinario

Las composiciones descritas en la presente pueden formularse como composiciones farmacéuticas, por ejemplo, pueden incluir una composición como se describió previamente, formulada con uno o más portadores o excipientes farmacéuticamente aceptables. Las composiciones farmacéuticas son útiles para tratar o prevenir infecciones de *E. coli* en seres humanos y otros animales, tales como mamíferos (por ejemplo, vacas, caballos, cerdos, ovejas, cabras, monos, gatos, perros, ratones, ratas) y aves (pollos, pavos, patos, gansos). Una composición farmacéutica para el tratamiento de infecciones de *E. coli* pueden referirse, además, como un antibiótico o composición antibiótica en la presente.

La susceptibilidad de *E. coli*, que incluye formas virulentas y resistentes, a una composición antibiótica descrita en la presente puede determinarse por métodos conocidos por los expertos en la técnica. Un procedimiento rápido usa discos de papel de filtro comerciales que se han impregnado con una cantidad específica de la composición antibiótica. Estos discos se colocan sobre la superficie de placas de agar que se han sembrado en estrías con un cultivo de la *E. coli* que se analiza, y las placas se observan para detectar zonas de inhibición del crecimiento. La prueba de susceptibilidad a diluciones del caldo implica preparar tubos de ensayo que contienen diluciones en serie de la composición en medio de cultivo líquido, y después inocular el organismo que se analiza en los tubos. La más baja concentración del fármaco que inhibe el crecimiento de las bacterias después de un periodo de incubación adecuado se informa como la concentración inhibitoria mínima (MIC).

La resistencia o susceptibilidad de *E. coli* a un antibiótico descrito en la presente puede determinarse sobre la base de un resultado clínico, es decir, si la administración de ese antibiótico a un sujeto infectado por ese organismo curará con éxito al sujeto. Alternativamente, para facilitar la identificación de la resistencia o susceptibilidad a antibióticos mediante el uso de resultados de pruebas *in vitro*, el Comité Nacional de Estándares de Laboratorio Clínico (NCCLS) ha formulado estándares para la susceptibilidad a antibióticos que correlacionan el resultado clínico con determinaciones *in vitro* de la concentración inhibitoria mínima del antibiótico.

La administración de las composiciones farmacéuticas descritas en la presente puede ser por medio de cualquiera de los modos de administración aceptados para los agentes que tienen utilidades similares que incluyen, pero sin limitarse a, la vía oral, subcutánea, intravenosa, intranasal, tópica, transdérmica, transmucosal, intraperitoneal, intramuscular, intrapulmonar, vaginal, rectal o intraocular. Las administraciones oral, transmucosal, tópica y parenteral, por ejemplo, son habituales en el tratamiento de infecciones de *E. coli*. Las composiciones de la invención son composiciones farmacéuticas orales.

En las composiciones farmacéuticas, concentraciones eficaces de una o más enzimas digestivas se mezclan con un excipiente o portador farmacéutico adecuado. Las concentraciones de las enzimas digestivas en las composiciones son eficaces para suministrar una cantidad, después de la administración, que es útil en la reducción o erradicación de bacterias *E. coli*, y/o para tratar o mejorar uno o más de los síntomas asociados con una infección de *E. coli*.

Las composiciones antibióticas pueden formularse para una única administración de una dosificación. Para formular una composición, la fracción en peso de las enzimas digestivas se disuelve, suspende, dispersa o mezcla de cualquier otra manera en un portador seleccionado a una concentración eficaz de manera que las bacterias se reducen o erradican, la afección tratada se alivia, o uno o más síntomas se mejoran.

Las enzimas digestivas se incluyen en el portador farmacéuticamente aceptable en una cantidad suficiente para ejercer un efecto terapéuticamente útil en ausencia de efectos secundarios indeseables en el paciente tratado. La concentración terapéuticamente eficaz puede determinarse empíricamente probando las enzimas digestivas *in vitro* e *in vivo*, y después extrapolando para las dosificaciones en seres humanos.

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

La composición farmacéutica puede administrarse de una vez, o puede dividirse en un número de dosis más pequeñas para administrar a intervalos de tiempo. Se entiende que la dosificación precisa y la duración del tratamiento está en función de la enfermedad que se trata y puede determinarse empíricamente mediante el uso de protocolos de pruebas conocidos o mediante extrapolación a partir de datos de pruebas *in vivo* o *in vitro*. Debe señalarse que las concentraciones y los valores de dosificación también pueden variar con la gravedad de la afección que se va a aliviar. Se entiende además que para cualquier sujeto en particular, los regímenes de dosificación específicos deben ajustarse en el 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 expuestos en la presente son ilustrativos solamente y no están destinados a limitar el alcance o la práctica de las composiciones reivindicadas.

Tras el mezclado o la adición de las enzimas digestivas, la mezcla resultante puede ser una solución, suspensión, gel, polvo, emulsión o similares. La forma de la mezcla resultante depende de una serie de factores, que incluyen el modo de administración previsto y la solubilidad de las enzimas digestivas en el portador o vehículo seleccionado.

5 Las composiciones previstas para uso farmacéutico pueden administrarse como productos cristalinos o amorfos. Las composiciones farmacéuticamente aceptables incluyen formas de dosificación sólidas, semi-sólidas, líquidas, en gel, en polvo y en aerosol, tal como, *por ejemplo*, tabletas, cápsulas, comprimidos de forma ovalada, rociados, polvos, líquidos, suspensiones, emulsiones, geles, supositorios, aerosoles o similares. Pueden obtenerse, por ejemplo, como películas mediante métodos tales como precipitación, cristalización, liofilización, secado por rociado, o secado por evaporación. El
10 secado por microondas o radio frecuencia se puede usar para este propósito. Las composiciones también pueden administrarse en formas de dosificación de liberación sostenida o controlada, que incluyen inyecciones de depósito, bombas osmóticas, píldoras, recubrimientos especializados (por ejemplo, recubrimientos entéricos) en las formas de dosificación oral, parches transdérmicos (que incluyen electrotransporte) y similares, para una administración prolongada y/o cronometrada, por pulsos, a una velocidad predeterminada. En algunas modalidades, las composiciones se
15 proporcionan en formas de dosificación unitaria adecuadas para una administración única de una dosis precisa.

Las composiciones pueden administrarse solas o más típicamente en combinación con un portador o excipiente farmacéuticos convencionales o similares. El término "excipiente" se usa en la presente para describir cualquier ingrediente aparte del (de los) compuesto(s) (enzimas) usado(s) en la composición. Los excipientes farmacéuticamente
20 aceptables incluyen, pero no se limitan a, intercambiadores iónicos, alúmina, estearato de aluminio, lecitina, sistemas autoemulsionantes para la administración de fármacos (SEDSS) tales como succinato de d- α -tocoferol polietilenglicol 1000, tensoactivos usados en las formas de dosificación farmacéutica tales como Tweens u otras matrices poliméricas de administración similares, proteínas séricas, tales como albúmina sérica humana, sustancias tampón tales como fosfatos, glicina, ácido sórbico, sorbato de potasio, mezclas parciales de glicéridos de ácidos grasos vegetales saturados, agua,
25 sales o electrolitos, tales como sulfato de protamina, hidrógeno fosfato disódico, hidrógeno fosfato de potasio, cloruro de sodio, sales de zinc, sílice coloidal, trisilicato de magnesio, polivinil pirrolidona, sustancias basadas en celulosa, polietilenglicol, carboximetilcelulosa de sodio, poliácridatos, ceras, polímeros de bloque de polietileno-polioxipropileno y cera de lana. Las ciclodextrinas tales como α -, β y γ -ciclodextrina, o los derivados químicamente modificados tales como hidroxialquilciclodextrinas, que incluyen 2- y 3-hidroxipropil-b-ciclodextrinas, u otros derivados solubilizados también
30 pueden usarse ventajosamente para mejorar la administración de las composiciones descritas en la presente. Los métodos actuales para preparar tales formas de dosificación se conocen, o serán evidentes, para los expertos en esta técnica; por ejemplo, véase Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21ra Edición (Lippincott Williams & Wilkins. 2005).

35 En una modalidad preferida, las composiciones tomarán la forma de una forma de dosificación unitaria tal como una píldora o tableta y por lo 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 similares; y un aglutinante tal como almidón, goma acacia, polivinilpirrolidona, gelatina, celulosa, derivados de celulosa o similares. En otra forma de dosificación sólida, un polvo, solución o suspensión (*por ejemplo*, en carbonato de propileno, aceites vegetales o
40 triglicéridos) se encapsula en una cápsula de gelatina. También se contemplan formas de dosificación unitaria en las que dos o más ingredientes se separan físicamente; *por ejemplo*, cápsulas con gránulos de enzima(s) y gránulos de otros ingredientes; tabletas de dos capas; cápsulas de gel de dos compartimentos, etcétera.

Las composiciones líquidas administrables farmacéuticamente pueden prepararse, por ejemplo, mediante disolución, dispersión, etcétera, de una o más enzimas digestivas y adyuvantes farmacéuticos opcionales en un portador (*por
45 ejemplo*, agua, solución salina, dextrosa acuosa, glicerol, glicoles, etanol o similares) para formar una solución o suspensión. Si se desea, la composición farmacéutica puede contener, además, cantidades menores de sustancias auxiliares no tóxicas tales como agentes humectantes, agentes emulsionantes, agentes solubilizantes, agentes tamponantes del pH y similares (*por ejemplo*, acetato de sodio, citrato de sodio, derivados de ciclodextrina, monolaurato
50 de sorbitán, acetato de trietanolamina, oleato de trietanolamina y similares). Los inyectables pueden prepararse en formas convencionales, como soluciones líquidas o suspensiones, como emulsiones, o en formas sólidas adecuadas para la disolución o suspensión en líquido antes de la inyección.

Las composiciones sólidas pueden proporcionarse en varios tipos diferentes de formas de dosificación, en dependencia
55 de las propiedades fisicoquímicas de las enzimas, la velocidad de disolución deseada, las consideraciones de costo y otros criterios. En una de las modalidades, la composición sólida es una unidad individual. Esto implica que una dosis unitaria del fármaco está comprendida en una única forma o artículo sólido conformados físicamente. En otras palabras, la composición sólida es coherente, lo que contrasta con una forma de dosificación unitaria múltiple, en la que las unidades son incoherentes.

60 Ejemplos de unidades únicas que pueden usarse como formas de dosificación para la composición sólida incluyen tabletas, tales como tabletas comprimidas, unidades similares a películas, unidades similares a láminas, obleas, unidades de matriz liofilizada y similares. En una modalidad, la composición sólida es una forma liofilizada altamente porosa. Dichos liofilizados, también denominados a veces obleas o tabletas liofilizadas, son particularmente útiles por su rápida
65 desintegración, que además permite la disolución rápida del compuesto activo.

Por otra parte, para algunas aplicaciones la composición sólida también puede formarse como una forma de dosificación unitaria múltiple. Ejemplos de unidades múltiples son polvos, rociados, gránulos, micropartículas, microcápsulas, bolitas, perlas, polvos liofilizados y similares. En una modalidad, la composición sólida es un polvo liofilizado. Dicho sistema liofilizado disperso comprende a multitud de partículas de polvo, y debido al proceso de liofilización usado en la formación del polvo, cada partícula tiene una microestructura porosa e irregular, a través de la cual el polvo es capaz de absorber agua muy rápidamente, resultando en una disolución rápida. En otra modalidad, la composición sólida es una formulación para espolvorear.

Otro tipo de sistema multiparticulado que también es capaz de lograr una disolución rápida del fármaco es el de polvos, gránulos, o bolitas a partir de excipientes solubles en agua que se recubren con los ingredientes de la composición (por ejemplo, enzimas), de manera que las enzimas se ubican en la superficie exterior 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 pueden recubrirse posteriormente con una composición de recubrimiento que comprende la(s) enzima(s) y, preferentemente, uno o más excipientes adicionales, tales como un aglutinante, un formador de poros, un sacárido, un alcohol de azúcar, un polímero formador de películas, un plastificante, u otros excipientes usados en las composiciones farmacéuticas con recubrimiento.

Las dosificaciones apropiadas para tratar o prevenir las infecciones de *E. coli* dependerán del paciente (especies, edad, peso, estado de salud), la gravedad de la enfermedad, la cepa de *E. coli* presente, el tipo de formulación (por ejemplo, líquida o ungüento) y otros factores conocidos por los expertos en la técnica. Debe señalarse que las concentraciones y los valores de dosificación pueden variar con la gravedad de la afección que se va a tratar. Se entiende además que para cualquier paciente en particular, deben ajustarse regímenes de dosificación específicos en el tiempo de acuerdo con la necesidad individual y el criterio profesional de la persona que administra o supervisa la administración de las composiciones.

En algunas modalidades, la composición farmacéutica comprende por dosis: amilasas de aproximadamente 10 000 a aproximadamente 60 000 U.S.P, que incluye 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, que incluye 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 4000 a aproximadamente 30 000 U.S.P, que incluye, 4000, 5000, 10 000, 15 000, 20 000, 25 000 y 30 000, junto con todos los valores intermedios. Una composición farmacéutica puede incluir uno o más de: quimotripsina de aproximadamente 2 a aproximadamente 5 mg que incluye 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 que incluye 50, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 y 100 mg, que incluye todos los valores intermedios; papaína de aproximadamente 3000 a aproximadamente 10 000 unidades USP que incluye 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000 y 10 000 USP, junto con todos los valores intermedios; y papaya de aproximadamente 30 a aproximadamente 60 mg, que incluye 30, 35, 40, 45, 50, 55 y 60 mg, junto con todos los valores intermedios.

Más adelante se proporciona información adicional sobre formas de dosificación particulares de las composiciones.

1. Composiciones para administración oral

Las formas de dosificación farmacéutica orales son sólidas, en gel o líquidas. Las formas de dosificación sólidas son tabletas, cápsulas, gránulos y polvos a granel. Los tipos de tabletas orales incluyen pastillas comprimidas, masticables y tabletas que pueden tener una cubierta entérica, cubierta de azúcar o cubierta de película. Las cápsulas pueden ser cápsulas de gelatina dura o blanda, mientras que los gránulos y polvos pueden proporcionarse en forma efervescente o no con la combinación de otros ingredientes conocidos por los expertos en la técnica.

a. Composiciones sólidas para administración oral

En determinadas modalidades, las formulaciones son formas de dosificación sólidas, en una modalidad, cápsulas o tabletas. Las tabletas, píldoras, cápsulas, trociscos y similares pueden contener uno o más de los siguientes ingredientes, o compuestos de naturaleza similar: un aglutinante; un lubricante; un diluyente; un deslizante; un agente desintegrante; un agente colorante; un agente edulcorante; un agente saborizante; un agente humectante; un recubrimiento emético; y un recubrimiento tipo película. Los ejemplos de aglutinantes incluyen celulosa microcristalina, goma de tragacanto, solución de glucosa, mucílago de acacia, solución de gelatina, melazas, polvinilpirrolidona, povidona, crospovidonas, sacarosa y pasta de almidón. Los lubricantes incluyen talco, almidón, estearato de magnesio o calcio, licopodio y ácido esteárico. Los diluyentes incluyen, por ejemplo, lactosa, sacarosa, almidón, caolín, sal, manitol y fosfato dicálcico. Los deslizantes incluyen, pero no se limitan a, dióxido de silicio coloidal. Los agentes desintegrantes incluyen croscarmelosa sódica, glicolato de almidón sódico, ácido alginico, almidón de maíz, almidón de papa, bentonita, metilcelulosa, agar y carboximetilcelulosa. Los agentes colorantes incluyen, por ejemplo, cualquiera de los tintes FD y C solubles en agua, aprobados y certificados, mezclas de estos; y tintes 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 cantidad de sabores secados por rociado. Los agentes saborizantes incluyen sabores naturales extraídos de plantas tales como frutos y mezclas sintéticas de compuestos que producen una sensación agradable, tal como, pero sin limitarse a menta y salicilato de metilo. Los agentes humectantes incluyen monoestearato de propilenglicol, monooleato

de sorbitán, monolaurato de dietilenglicol y polioxietilen lauril éter. Los recubrimientos eméticos incluyen ácidos grasos, grasas, ceras, goma laca, goma laca amoniacada y acetato ftalato de celulosa. Los recubrimientos de tipo película incluyen hidroxietilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio, polietilenglicol 4000 y acetato ftalato de celulosa.

5 Las enzimas digestivas pueden proporcionarse en una composición que las protege del medio ambiente ácido del estómago. Por ejemplo, la composición puede formularse en un recubrimiento entérico que mantiene su integridad en el estómago y libera las enzimas digestivas en el intestino. La composición también puede formularse en combinación con un antiácido u otro ingrediente de ese tipo.

10 Cuando la forma unitaria de dosificación es una cápsula, puede contener, además del material del tipo anterior, un portador líquido tal como un aceite graso. Además, las formas unitarias de dosificación pueden contener varios otros materiales que modifican la forma física de la unidad de dosificación, por ejemplo, recubrimientos de azúcar y otros agentes entéricos. Las enzimas digestivas también pueden administrarse como un componente de un elixir, suspensión, jarabe, oblea, rociado, goma de mascar o similares. Un jarabe puede contener, además de las enzimas digestivas activas, sacarosa
15 como un agente edulcorante y determinados conservantes, tintes y colorantes y sabores.

Las enzimas digestivas, además, pueden mezclarse con otros materiales activos que no afecten la acción deseada, o con materiales que complementen la acción deseada, tales como antiácidos, bloqueadores de H₂ y diuréticos. Pueden incluirse concentraciones más altas, hasta aproximadamente 98 % en peso de las enzimas digestivas.

20 En todas las modalidades, las formulaciones de tabletas y cápsulas pueden recubrirse como conocen los expertos en la técnica para modificar o mantener la disolución de las enzimas digestivas. Por lo tanto, por ejemplo, pueden recubrirse con un recubrimiento entéricamente digerible convencional, tal como fenilsalicilato, ceras y acetato ftalato de celulosa.

25 b. Composiciones líquidas para administración oral

Las formas de dosificación oral líquidas incluyen soluciones acuosas, emulsiones, suspensiones, 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 lo mismo
30 aceite en agua que agua en aceite.

Los elixires son preparaciones claras, edulcoradas, hidroalcohólicas. Los portadores farmacéuticamente aceptables usados 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 se dispersa
35 en la forma de pequeños glóbulos en otro líquido. Los portadores farmacéuticamente aceptables usados en emulsiones son líquidos, agentes emulsionantes y conservantes no acuosos. Las suspensiones usan agentes de suspensión y conservantes farmacéuticamente aceptables. Las sustancias farmacéuticamente aceptables usadas en los gránulos no efervescentes, para reconstituirse en una forma de dosificación oral líquida, incluyen diluyentes, edulcorantes y agentes humectantes. Las sustancias farmacéuticamente aceptables usadas en gránulos efervescentes, para reconstituirse en
40 una forma de dosificación oral líquida, incluyen ácidos orgánicos y una fuente de dióxido de carbono. Los agentes colorantes y saborizantes se usan en todas las formas de dosificación anteriores.

Los disolventes incluyen glicerina, sorbitol, alcohol etílico y jarabe. Los ejemplos de conservantes incluyen glicerina, metil y propilparabeno, ácido benzoico, benzoato de sodio y alcohol. Los ejemplos de líquidos no acuosos usados en
45 emulsiones incluyen aceite mineral y aceite de semilla de algodón. Los ejemplos de agentes emulsionantes incluyen gelatina, acacia, tragacanto, bentonita y tensoactivos tales como monooleato de polioxietilen sorbitán. Los agentes de suspensión incluyen carboximetilcelulosa de sodio, 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 polioxietilen lauril éter.
50 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 tintes FD y C solubles en agua, aprobados y certificados y mezclas de estos. Los agentes saborizantes incluyen sabores naturales extraídos de plantas tal como de frutas y mezclas sintéticas de compuestos que producen una sensación de sabor agradable.

55 Para una forma de dosificación sólida, la solución o suspensión, por ejemplo en carbonato de propileno, aceites vegetales o triglicéridos, en una modalidad está encapsulada en una cápsula de gelatina. Dichas soluciones, y su preparación y encapsulación, se describen en las patentes de Estados Unidos núms. 4,328,245; 4,409,239; y 4,410,545. Para una forma de dosificación líquida, la solución, por ejemplo, en un polietilenglicol, puede diluirse con una cantidad suficiente de un portador líquido farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, agua, de manera que pueda medirse fácilmente para su
60 administración.

Alternativamente, las formulaciones orales líquidas o semisólidas pueden prepararse disolviendo o dispersando las enzimas digestivas en aceites vegetales, glicoles, triglicéridos, ésteres de propilenglicol (por ejemplo, carbonato de propileno) y otros portadores similares, y encapsulando estas soluciones o suspensiones en envolturas de cápsulas de
65 gelatina dura o blanda. Otras formulaciones útiles incluyen las que se exponen en la patente de Estados Unidos núm. 4,358,603. Brevemente, tales formulaciones incluyen, pero no se limitan a, las que contienen enzimas digestivas

proporcionadas en la presente, un mono- o poli-alquilenglicol dialquilado, que incluye, pero sin limitarse a, 1,2-dimetoximetano, diglime, triglime, tetraglime, éter polietilenglicol-350-dimetílico, éter polietilenglicol-550-dimetílico, éter polietilenglicol-750-dimetílico en donde 350, 550 y 750 se refieren al peso molecular promedio 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 ditiocarbamatos.

Otras formulaciones incluyen, pero no se limitan a, soluciones alcohólicas acuosas que incluyen un acetal aceptable farmacéuticamente. Los alcoholes usados en estas formulaciones son cualquier disolvente miscible en agua aceptable farmacéuticamente que tenga uno o más grupos hidroxilo, que incluyen, pero sin limitarse a, propilenglicol y etanol. Los acetales incluyen, pero no se limitan a, di(alquilo inferior) acetales de aldehídos de alquilo inferior tales como acetaldehído dietilacetal.

2. Formulaciones de liberación sostenida

Además, se proporcionan formulaciones de liberación sostenida para administrar las enzimas digestivas al objetivo deseado. Se entiende que los niveles de enzimas digestivas se mantienen durante un determinado periodo de tiempo según se desee y pueden determinarse fácilmente por un experto en la técnica. Dichas formulaciones de liberación sostenida y/o cronometrada pueden producirse mediante medios de liberación sostenida de dispositivos de administración que son bien conocidos por los expertos en la técnica, tales como los descritos en las patentes de 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 pueden usarse para proporcionar una liberación lenta o sostenida de una o más enzimas digestivas mediante el uso, por ejemplo, de 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, que incluyen las descritas en la presente, pueden seleccionarse fácilmente para usar con las composiciones farmacéuticas proporcionadas en la presente. Por lo tanto, en la presente se contemplan formas de dosificación unitaria únicas adecuadas para la administración oral, tales como, pero sin limitarse a, tabletas, cápsulas, cápsulas de gel, comprimidos de forma ovalada, polvos y similares, que se adaptan para la liberación sostenida.

En una modalidad, la formulación de liberación sostenida contiene un compuesto activo tal como, pero sin limitarse a, celulosa microcristalina, maltodextrina, etilcelulosa y estearato de magnesio. Como se describió anteriormente, todos los métodos conocidos para la encapsulación que son compatibles con las propiedades de las enzimas digestivas descritas se contemplan en la presente. La formulación de liberación sostenida se encapsula recubriendo las partículas o gránulos de las composiciones farmacéuticas proporcionadas en la presente con un espesor variable de polímeros lentamente solubles o mediante microencapsulación. En una modalidad, la formulación de liberación sostenida se encapsula con un material de recubrimiento de espesor variable (por ejemplo 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 otra modalidad, el material de recubrimiento es un aditivo aprobado para alimentos.

En otra modalidad, la formulación de liberación sostenida es un dispositivo de disolución de matriz que se prepara comprimiendo el fármaco con un portador polimérico lentamente soluble para formar una tableta. En una modalidad, las partículas recubiertas tienen un intervalo de tamaño entre aproximadamente 0.1 a aproximadamente 300 micras, como se describe en las patentes de Estados Unidos núms. 4,710,384 y 5,354,556. Cada una de las partículas está en la forma de una micromatriz, con el ingrediente activo uniformemente distribuido por todo el polímero.

Las enzimas digestivas proporcionadas en la presente pueden formularse como una formulación de liberación sostenida y/o cronometrada. Todos los productos farmacéuticos de liberación sostenida tienen un objetivo común de mejorar el tratamiento con un fármaco más de lo logrado por sus contrapartes no sostenidas. Idealmente, el uso de una preparación de liberación sostenida diseñada óptimamente en el tratamiento médico se caracteriza por un mínimo de enzimas digestivas que se emplean para curar o controlar la afección. Las ventajas de las formulaciones de liberación sostenida pueden incluir: 1) prolongación de la actividad de la composición, 2) reducción de la frecuencia de dosificación y 3) aumento del cumplimiento del paciente. Además, las formulaciones de liberación sostenida pueden usarse para afectar el tiempo de inicio de la acción u otras características, tales como los niveles en sangre de la composición, y por lo tanto pueden afectar la ocurrencia de efectos secundarios.

Las formulaciones de liberación sostenida proporcionadas en la presente se diseñan para liberar inicialmente una cantidad de la composición terapéutica que rápidamente produce el efecto terapéutico deseado, y liberar gradual y continuamente otras cantidades de las composiciones para mantener este nivel de efecto terapéutico durante un periodo de tiempo prolongado. Para mantener este nivel constante en el cuerpo, la composición terapéutica debe ser liberada de la forma de dosificación a una velocidad que reemplace la composición que se metaboliza y excreta del cuerpo.

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.

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

El polvo puede dispersarse o suspenderse en un vehículo líquido y mantendrá sus características de liberación sostenida durante un periodo de tiempo útil. Estas dispersiones o suspensiones tienen tanto estabilidad química como 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 (por ejemplo, zeína), polisacáridos (por ejemplo, celulosa) y ácido alginico. Los polímeros sintéticos representativos incluyen, pero sin limitarse 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, pero sin limitarse a los descritos en la columna 3, línea 46-columna 4, línea 8 de la patente de Estados Unidos núm. 5,354,556.

Coadministración con otras composiciones farmacéuticas

Las composiciones farmacéuticas pueden usarse solas, y/o en combinación con otros regímenes terapéuticos o antibióticos (por ejemplo, *anti-E. coli*). Por ejemplo, a un paciente se le puede administrar otros agentes terapéuticos, tales como antiinflamatorios o anestésicos, para abordar otros aspectos de una infección de *E. coli* (por ejemplo, dolor, daño tisular) o incluso otras enfermedades que el paciente puede padecer. En otras modalidades, a un paciente se le puede administrar una composición farmacéutica como se describe en la presente y uno o más antibióticos adicionales. El o los antibióticos adicionales pueden ser eficaces contra *E. coli* u otras bacterias, o ambos (por ejemplo, si el paciente tiene múltiples infecciones) y pueden ser en el mismo formato o en uno diferente de las presentes composiciones farmacéuticas (por ejemplo, uno puede ser un antibiótico líquido y otro puede ser uno tópico). Las clases de antibióticos principales son (1) las 13-lactamas, que incluyen las penicilinas, cefalosporinas y monobactamas; (2) los aminoglucósidos, por ejemplo, gentamicina, tobramicina, netilmicina y ampicacina; (3) las tetraciclinas; (4) las sulfonamidas y trimetoprima; (5) las fluoroquinolonas, por ejemplo, ciprofloxacina, norfloxacina y ofloxacina; (6) vancomicina; (7) los macrólidos, que incluyen por ejemplo, eritromicina, azitromicina y claritromicina; y (8) otros antibióticos, por ejemplo, las polimixinas, cloranfenicol y las lincosamidas.

En algunas modalidades, el antibiótico adicional puede ser un antibiótico beta-lactámico (por ejemplo, una penicilina o derivados de la penicilina, una cefalosporina, un monobactámico, un penam, un penem, un oxapenam, un carbapenam o un cabapenam, un cephem, un carbacephem, un oxacephem, un monobactámico). En algunas modalidades, el antibiótico adicional puede ser un inhibidor de la beta-lactamasa. En algunas modalidades, el antibiótico adicional se selecciona de penicilina o un derivado de la penicilina, oxacilina, amoxicilina, naftilina, cloxacilina, metilicina, temocilina, ampicilina, co-amoxiclav, azlocilina, carbenicilina, ticarcilina, mezlocilina, piperacilina, cefalexina, cefalotina, cefazolina, cefaclor, cefuroxima, cefamandol, cefotetan, ceftioxitin, ceftriaxona, cefotaxima, cefpodoxima, ceftazidima, cefepima, ceftipiro, vancomicina, teicoplanina, telavancin, bleomicina, ramoplanina, decaplanina, oritavancin y dalbavancin.

Una composición antibiótica descrita en la presente y un antibiótico adicional pueden administrarse separadamente o en una forma de dosificación única. En caso de ser de manera separada, pueden administrarse en cualquier orden y frecuencia relativa.

Desinfectantes y antibacteriales

Las composiciones que comprenden una o más enzimas digestivas como se describen en la presente pueden usarse, además, como desinfectantes y antibacteriales, *por ejemplo*, para desinfectar objetos y superficies inanimados en, sin limitación, entornos hospitalarios, de cuidado médico, del hogar y comunitarios mediante la erradicación, atenuación o reducción de *E. coli* en tales ubicaciones. Los desinfectantes son agentes antimicrobianos que se aplican a objetos no vivos para destruir microorganismos. Los desinfectantes deben distinguirse generalmente de los antibióticos que destruyen los microorganismos dentro del cuerpo, y de los antisépticos, que destruyen los microorganismos sobre un tejido vivo. Los antibacteriales son desinfectantes que reducen la cantidad de microorganismos a un nivel seguro. Una definición de un antibacterial establece que un antibacterial debe ser capaz de matar el 99.999 %, que se conoce como una reducción de 5 log, de una población bacteriana de prueba específica, y hacerlo en 30 segundos. La diferencia principal entre una antibacterial y un desinfectante es que a una dilución de uso especificada, el desinfectante debe tener una mayor capacidad de eliminación para bacterias patógenas en comparación con la de una antibacterial.

Un desinfectante o antibacterial como se describe en la presente puede incluir una o más enzimas digestivas, en diversas modalidades como se describió anteriormente, y puede incluir opcionalmente otros ingredientes activos e inactivos, que incluyen estabilizadores (por ejemplo, estabilizadores de enzimas), otros desinfectantes conocidos por los expertos en la técnica, excipientes, colorantes, perfumes para formulaciones, etcétera. Un experto en la técnica puede seleccionar los ingredientes activos o inactivos adicionales para incluir en un desinfectante. Los ejemplos de desinfectantes adicionales incluyen: fuentes de cloro activo (es decir, hipocloritos, cloraminas, dicloroisocianurato y tricloroisocianurato, cloro húmedo, dióxido de cloro etcétera); fuentes de oxígeno activo (peróxidos, tales como ácido peracético, persulfato de

potasio, perborato de sodio, percarbonato de sodio y perhidrato de urea); soluciones de yodo y yodóforo (yodopovidona (povidona-yodada, Betadine), solución de Lugol, tintura de yodo, tensoactivos no iónicos yodados); alcoholes concentrados (principalmente etanol, 1-propanol, denominado además n-propanol y 2-propanol, denominado isopropanol y mezclas de estos; además, 2-fenoxietanol y 1- y 2-fenoxipropanoles); sustancias fenólicas (tales como fenol (denominado además "ácido carbólico"), cresoles (denominados "lisoles" en combinación con jabones líquidos de potasio), fenoles halogenados (clorados, bromados), tales como hexaclorofeno, triclosán, triclorofenol, tribromofenol, pentaclorofenol, Dibromol y sus sales); tensoactivos 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 soluciones de ozono y 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 cobre; ácidos fuertes concentrados (ácidos fosfórico, nítrico, sulfúrico, amidosulfúrico, toluenosulfónico) y álcalis (hidróxidos de sodio, potasio, calcio), tales como de pH < 1 o > 13, particularmente a temperatura elevada (por encima de 60 °C). En algunos casos, un desinfectante como se describe en la presente consistirá esencialmente de la o las enzimas digestivas. En algunos casos, un desinfectante consistirá esencialmente de la o las enzimas digestivas y no incluirá agentes desinfectantes adicionales.

Una composición desinfectante que comprende una o más enzimas digestivas como se describe en la presente puede incorporarse con otros ingredientes para formar una variedad de productos desinfectantes que incluyen pero sin limitarse a limpiadores de manos, enjuagues bucales, desinfecciones quirúrgicas, lociones corporales, geles y espumas antibacteriales para manos, toallitas desinfectantes y productos similares para el cuidado personal. Otros tipos de productos incluyen espumas, cremas, mousses desinfectantes y similares y composiciones que contienen materiales de relleno orgánicos e inorgánicos, tales como emulsiones, lociones, cremas, pastas y similares. Las composiciones también pueden usarse como un limpiador antibacteriano para superficies duras, por ejemplo, fregaderos y encimeras en hospitales, áreas de servicio de alimentos y plantas de procesamiento de carnes. Las composiciones desinfectantes pueden usarse, además, como nieblas desinfectantes y vaporizaciones desinfectantes. Las presentes composiciones de enzimas digestivas pueden fabricarse como composiciones listas para usar diluidas, o como concentrados que se diluyen antes del uso. Los diversos productos en que se usan los desinfectantes pueden incluir, además, fragancias, en dependencia de la naturaleza del producto. Por ejemplo, una fragancia de pino o limón puede ser conveniente para usar en toallitas para limpiar la cocina debido a su asociación atractiva con la limpieza para muchos consumidores. Además, los geles o aerosoles también pueden estar perfumados por razones similares u otras.

En un caso, las composiciones desinfectantes pueden usarse para producir toallitas desinfectantes. Una toallita desinfectante puede usarse para limpiar una variedad de superficies duras y otras, que incluyen, por ejemplo, manos y piel humanas, instrumentos y dispositivos médicos, encimeras, pisos, paredes y ventanas. Las toallitas pueden fabricarse de una variedad de telas. Se define que las telas incluyen paños y papeles, así como materiales tejidos y no tejidos. Las telas tejidas o no tejidas pueden fabricarse de materiales adecuados tales como rayón, nailon, o algodón y combinaciones de estos. Ejemplos de telas no tejidas se describen en las patentes de EE.UU. núms. 3,786,615; 4,395,454; y 4,199,322. Las telas o papeles pueden impregnarse con la solución desinfectante mediante cualquier método conocido en la técnica. Las toallitas pueden empacarse de cualquier manera conocida en la técnica que incluye paquetes tipo blíster individuales o múltiples paquetes envueltos o apilados.

En otro caso, la composición desinfectante que comprende una o más enzimas digestivas puede formularse como un gel o composición antibacterial gelatinosa. Además de las composiciones desinfectantes, los geles antibacteriales pueden incluir un agente espesante o gelificante, en donde "agente espesante" y "agente gelificante" se usan indistintamente. Como se usa en la presente, los términos composiciones antibacteriales "en gel" o "gelatinosas" se refieren a una sustancia líquida desinfectante que puede tener una viscosidad de aproximadamente 1000 centipoises a aproximadamente 100 000 centipoises, o de 2000 centipoises a 50 000 centipoises en otro caso, aunque no debe entenderse que estos intervalos sean limitantes. Por ejemplo, un gel para las manos puede ser considerablemente menos viscoso que un gel usado con fines de limpieza industrial o desinfectante. Ejemplos de agentes espesantes o gelificantes incluyen pero no se limitan a goma natural tal 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 pirógena, mezclas de estos y similares. El agente gelificante puede estar presente en la composición antibacterial 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 que incluyen el tipo de agente gelificante y la viscosidad deseada del gel. Los antibacteriales gelatinosos pueden usarse para una variedad de aplicaciones que incluyen saneamiento de la piel humana por ejemplo, gel antibacterial para las manos y saneamiento de superficies duras. En un caso en particular, la composición desinfectante puede mezclarse con gel de aloe natural para formar una formulación desinfectante de aloe. Una formulación de este tipo sería útil para la aplicación a quemaduras, infecciones cutáneas y otras irritaciones. El aloe puede actuar como un agente espesante, o puede incluir, además, otro agente espesante o gelificante como se describió anteriormente, en dependencia de la viscosidad deseada del gel desinfectante.

En otro caso, una composición desinfectante que comprende una o más enzimas digestivas puede formularse como una espuma desinfectante o composición espumante. Las espumas desinfectantes o composiciones espumantes incluyen la

composición desinfectante y agentes espumantes. Cualquier agente espumante conocido en la técnica puede usarse en dependencia de la aplicación y las características deseadas de la espuma desinfectante resultante. Similar a la composición desinfectante, las espumas desinfectantes de la presente invención pueden usarse en aplicaciones en humanos (por ejemplo lavado de las manos) e industriales.

En otro caso, la composición desinfectante que comprende una o más enzimas digestivas puede estar en la forma de un aerosol o niebla desinfectante. La nebulización, referido además como nebulización térmica, es el proceso mediante el cual los desinfectantes se aerosolizan. Las partículas de aerosol del desinfectante son suspendidas dentro del aire durante un periodo de tiempo para desinfectar tanto el propio aire como las superficies, incluidas las partes inaccesibles de una estructura tales como salidas de aire. Las partículas aerosolizadas de desinfectante pueden tener un tamaño de partícula de aproximadamente 5 µm a aproximadamente 200 µm. En otro caso, la partícula aerosolizada puede tener un tamaño de partícula de aproximadamente 20 µm a aproximadamente 150 µm.

Los métodos para evaluar la capacidad desinfectante de una composición en particular son conocidos por los expertos en la técnica. Típicamente, la efectividad relativa de un desinfectante puede medirse comparando la eficacia de desinfección en comparación con un desinfectante conocido. El fenol es un estándar de desinfectante conocido, y el sistema de calificación correspondiente se denomina el "coeficiente fenólico". El desinfectante que se va a analizar se compara con el fenol sobre un microbio estándar, por ejemplo, *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 fenólico, la concentración del compuesto de prueba a la cual el compuesto mata al organismo de prueba en 10 minutos, pero no en 5 minutos, se divide por la concentración de fenol que mata al organismo en las mismas condiciones. El coeficiente fenólico puede determinarse en presencia de una cantidad estándar de materia orgánica añadida o en ausencia de materia orgánica. Un ensayo de coeficiente fenólico en particular usa el método de Rideal-Walker. El Departamento de Agricultura de Estados Unidos también tiene un método que produce un coeficiente del Departamento de Agricultura de Estados Unidos. Los expertos en la técnica conocen otros métodos.

Un desinfectante como se describe en la presente puede tener un coeficiente fenólico para *S. aureus* que es > 1, por ejemplo, mayor que 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 fenólico está en el intervalo de aproximadamente 2 a aproximadamente 20, por ejemplo, aproximadamente 4 a aproximadamente 10, aproximadamente 2 a aproximadamente 6, aproximadamente 6 a aproximadamente 12, o aproximadamente 10 a aproximadamente 15.

Un desinfectante como se describe en la presente puede tener un coeficiente fenólico para *E. coli* que es > 1, por ejemplo, mayor que 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 fenólico está en el intervalo de aproximadamente 2 a aproximadamente 20, por ejemplo, aproximadamente 4 a aproximadamente 10, aproximadamente 2 a aproximadamente 6, aproximadamente 6 a aproximadamente 12, o aproximadamente 10 a aproximadamente 15.

Un desinfectante o antibacteriano como se describe en la presente puede ser bactericida y/o bacteriostático contra *E. coli*. En algunos casos, un desinfectante o antibacteriano como se describe en la presente puede ser bactericida y/o bacteriostático contra STEC, ETEC, o EPEC, o 2 cualquiera, o las 3.

Detergentes

Una composición desinfectante que comprende una o más enzimas digestivas descritas en la presente puede también formularse como un detergente. Un detergente es un material previsto para ayudar en la limpieza. Un detergente puede contener una o más enzimas digestivas, como se describió previamente, en una formulación adecuada para mantener su capacidad desinfectante, y puede contener ingredientes activos o inactivos opcionales, por ejemplo, estabilizadores de enzimas, desinfectantes adicionales, blanqueadores, jabones, tensoactivos, colorantes y perfumes, abrasivos, modificadores del pH, ácidos, álcalis, o compuestos cáusticos, ablandadores de agua, oxidantes, agentes de suspensión, suavizantes de tela, agentes espumantes o agentes antiespumantes, modificadores de la viscosidad, inhibidores de la corrosión y abrillantadores ópticos. Un detergente como se describe en la presente puede ser bacteriostático y/o bactericida contra *E. coli*, y en algunas modalidades puede ser bacteriostático y/o bactericida contra STEC, ETEC, o EPEC, o 2 cualquiera, o las 3.

Una composición detergente que comprende una o más enzimas digestivas, especialmente las producidas para usar con agua, puede incluir componentes adicionales tales como tensoactivos para "cortar" (disolver) la grasa y para humedecer superficies, abrasivos para fregar, sustancias para modificar el pH o para afectar el rendimiento o la estabilidad, ácidos para quitar el sarro o cáusticos para descomponer compuestos orgánicos, ablandadores de agua para contrarrestar el efecto de iones de "dureza", oxidantes (oxidantes) para blanquear, desinfectar y descomponer compuestos orgánicos, materiales no tensoactivos que mantienen la suciedad en la suspensión, enzimas para digerir proteínas, grasas, o carbohidratos en las manchas o para modificar la sensación de la tela, ingredientes que modifican las propiedades espumantes de los tensoactivos 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 una solución o gel acuosos, ingredientes que afectan las propiedades estéticas del artículo que se va a limpiar, o del propio detergente antes o durante el uso, tal como abrillantadores ópticos, suavizantes de tela, colores y perfumes,

ingredientes tales como inhibidores de la corrosión para contrarrestar el daño al equipo con que se usa el detergente, ingredientes para reducir el daño o producir beneficios a la piel, cuando el detergente se usa con las propias manos en objetos inanimados o se usa para limpiar la piel, y conservantes para prevenir el deterioro de otros ingredientes.

- 5 La composición detergente puede estar en cualquier forma seca conveniente, por ejemplo, una barra, una tableta, un polvo, un gránulo o una pasta. También puede ser un detergente líquido.

10 La(s) enzima(s) digestiva(s) de la composición de detergente puede(n) estabilizarse mediante el uso de agentes estabilizantes convencionales, por ejemplo, un poliol tal como propilenglicol o glicerol, un azúcar o alcohol de azúcar, ácido láctico, ácido bórico, o un derivado de ácido bórico, por ejemplo, un éster de borato aromático, o un derivado de ácido fenil borónico tal como ácido 4-formilfenil borónico, y la composición puede formularse como se describe por ejemplo en en los documentos WO 92/19709 y WO 92/19708.

Antisépticos

15 Varias modalidades de composiciones que comprenden una o más enzimas digestivas también pueden usarse como agentes antisépticos, por ejemplo, para reducir, erradicar, o atenuar *E. coli* 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 deben distinguirse de los antibióticos que destruyen bacterias dentro del cuerpo, y de los

20 desinfectantes, que destruyen microorganismos que se encuentran sobre objetos no vivos. Algunos antisépticos son verdaderos germicidas, capaces de destruir microbios (bactericidas), mientras otros son bacteriostáticos y solo previenen o inhiben su crecimiento.

25 Los antisépticos descritos en la presente pueden encontrar uso particular en entornos hospitalarios o de atención médica, por ejemplo, en formulaciones para el lavado facial, de las manos o el cuerpo; como antisépticos para usar antes y después de un tratamiento quirúrgico; y como antisépticos para usar en la limpieza y el tratamiento de heridas, tales como heridas traumáticas o quirúrgicas. En el entorno comunitario, los antisépticos son útiles en cualquier entorno donde las infecciones adquiridas en la comunidad son importantes, por ejemplo, guarderías, instituciones grandes, escuelas, etcétera. Los

30 antisépticos también pueden ser útiles en el hogar en formulaciones para el lavado facial, de las manos o el cuerpo, o para el tratamiento de heridas.

Un antiséptico puede incluir una o más enzimas digestivas, en diversas modalidades como se describió previamente, y opcionalmente puede incluir uno o más ingredientes activos o inactivos, tales como otros agentes antisépticos conocidos por los expertos en la técnica, estabilizadores (por ejemplo, estabilizadores de enzimas), colorantes, perfumes y otros

35 excipientes. Los ejemplos de agentes antisépticos para incluir con la o las enzimas digestivas incluyen alcoholes (por ejemplo, etanol, 1- y 2-propanol, o mezclas de estos), compuestos de amonio cuaternario (cloruro de benzalconio, bromuro de cetil trimetilamonio, cloruro de cetilpiridinio y cloruro de benzetonio), ácido bórico, gluconato de clorhexidina, peróxidos (por ejemplo, peróxido de hidrógeno, peróxido de benzoilo); soluciones de yodo y yodóforo (por ejemplo, yodo povidona), dihidrocloruro de octenidina, compuestos fenólicos (ácido carbólico) y derivados de compuestos fenólicos, cloruro de

40 sodio, hipoclorito de sodio e hipoclorito de calcio.

Un antiséptico como se describe en la presente puede ser bactericida y/o bacteriostático para *E. coli*, y en algunas modalidades puede ser bactericida y/o bacteriostático para STEC, ETEC, o EPEC, o 2 cualquiera, o las 3.

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

Un agente antiinflamatorio puede incluir compuestos antiinflamatorios esteroideos y no esteroideos. En un caso, la composición antiséptica incluye uno o más esteroides. En un caso, las composiciones antisépticas pueden comprender

50 un agente antiinflamatorio que es un fármaco antiinflamatorio no esteroideo. Los ejemplos no limitantes de fármacos antiinflamatorios no esteroideos adecuados incluyen aspirina (Anacin, Ascriptin, Bayer, Bufferin, Ecotrin, Excedrin), salicilatos de colina y magnesio (CMT, Tricosal, Trilisate), salicilato de colina (Artliropan), celecoxib (Celebrex), diclofenaco potásico (Cataflam), diclofenaco sódico (Voltaren, Voltaren XR), diclofenaco sódico con misoprostol (Arthrotec), difiunisal (Dolobid), etodolac (Lodine, Lodine XL), fenoprofeno de calcio (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 de sodio (Meclomen), ácido mefenámico (Ponstel), meloxicam (Mobic), nabumetona (Relafen), naproxeno (Naprosyn, Naprelan), naproxeno sódico (Aleve, Anaprox), oxaprozina (Daypro), piroxicam (Feldene), rofecoxib (Vioxx), salsalato (Amigesic, Anaflex 750, Disalcid, Marthritic, Mono-Gesic, Salflex, Salsitab), salicilato de sodio, sulindac (Clinoril), tolmetin sódico (Tolectin), valdecoxib (Bextra), o una combinación de estos.

60

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

Más adelante se proporcionan métodos ilustrativos de las composiciones antisépticas candidatas para pruebas. Un experto en la técnica comprenderá que otros métodos para probar las composiciones antisépticas se conocen en la técnica y también son adecuados para las composiciones antisépticas candidatas para pruebas.

5 *Los métodos in vitro* para determinar la capacidad de las composiciones antisépticas candidatas para matar o inhibir el crecimiento de células microbianas tales como *E. coli* se conocen bien 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 monitorear el crecimiento del cultivo celular con respecto a un cultivo de control no tratado. Un segundo cultivo de control que comprende células en contacto con un agente antimicrobiano conocido también puede incluirse en
10 tales pruebas, si se desea.

Por ejemplo, la capacidad de una composición antiséptica candidata para inhibir el crecimiento de células microbianas puede determinarse fácilmente mediante la medición de la concentración inhibitoria mínima (MIC) para la composición antiséptica. La MIC se define como la concentración más baja que inhibe el crecimiento del organismo en una medida
15 predeterminada. Por ejemplo, un valor de MIC₁₀₀ se define como la concentración más baja que inhibe completamente el crecimiento del organismo, mientras que un valor de MIC₉₀ se define como la concentración más baja que inhibe el crecimiento en un 90 % y un valor de MIC₅₀ se define como la concentración más baja que inhibe el crecimiento en un 50 %. Los valores de MIC se expresan a veces como intervalos, por ejemplo, la MIC₁₀₀ para una composición antiséptica puede expresarse como la concentración a la cual no se observa crecimiento o como un intervalo entre la concentración
20 a la cual no se observa crecimiento y la concentración de la dilución que le continúa inmediatamente.

Las MIC antibacterianas para las composiciones antisépticas candidatas pueden medirse mediante el uso de un ensayo de macro o microdilución del caldo (véase Amsterdam, D. (1996) "Susceptibility testing of antimicrobials in liquid media", pp.52-111. En Loman, V., ed. Antibiotics in Laboratory Medicine, 4ta ed. Williams and Wilkins, Baltimore, MD). Una prueba
25 de susceptibilidad antibacteriana estandarizada se proporciona por el Comité Nacional para Estándares de Laboratorio Clínico (NCCLS) como NCCLS, 2000; documento M7-A5 8.

En el método clásico de microdilución del caldo, la composición antiséptica candidata se diluye en medio de cultivo en una placa de microtitulación de 96 pocillos, cubierta y estéril. Un cultivo durante la noche de una única colonia bacteriana se diluye en medio estéril de manera que, después de la inoculación, cada pocillo en la placa de microtitulación contiene una cantidad adecuada de unidades formadoras de colonias (CFU)Anl (típicamente, aproximadamente 5×10^5 CFU/ml). El medio de cultivo solo (que no contiene bacterias) también se incluye como un control negativo para cada placa y frecuentemente se incluyen antibióticos conocidos como controles positivos. La placa de microtitulación inoculada se
30 incuba posteriormente a una temperatura adecuada (por ejemplo, 35 °C - 37 °C durante 16-48 horas). La turbidez de cada pocillo se determina después mediante inspección visual y/o mediante la medición de la absorbancia, o la densidad óptica (OD), a 595 nm o 600 nm mediante el uso de un lector de microplacas y se usa como una indicación del grado de crecimiento bacteriano.

Los efectos antimicrobianos también pueden expresarse como el porcentaje (%) de inhibición del crecimiento de un microorganismo determinado durante un periodo de tiempo predeterminado mediante el tratamiento con una
40 concentración única de una composición antiséptica candidata. Este método proporciona un método rápido de evaluar la capacidad de una composición antiséptica para inhibir el crecimiento microbiano, por ejemplo, antes de realizar pruebas más profundas, tales como determinaciones de MIC o pruebas *in vivo*.

La capacidad de cualquiera de las presentes composiciones desinfectantes, detergentes, antibacteriales y antisépticas para matar o inhibir el crecimiento de bacterias de *E. coli* puede analizarse mediante el uso de métodos bien conocidos en la técnica, que incluyen los diversos métodos descritos anteriormente. Los métodos y protocolos para probar las composiciones contra bacterias específicas pueden encontrarse, por ejemplo, en Official Methods of Analysis of the AOAC, 15ta Ed., Arlington Virginia 22201, Estados Unidos (Association of Official Analytical Chemists (AOAC), Inc. 1990), Designación: E 1054-91 "Practices for Evaluation Inactivators of Antimicrobial Agents Used in Disinfectant, Sanitizer,
50 Antiseptic, or Preserved Products" (American Society for Testing and Materials (ASTM), 1991). Como también se conoce en la técnica, las evaluaciones de muerte en el tiempo *in vitro* pueden realizarse mediante el uso de una modificación de los métodos descritos en el Proyecto de norma europea, prEN 12054, "Chemical Disinfectants and Antiseptics - Products for Hygienic and Surgical Handrub and Handwash - Bactericidal Activity – Test Method and Requirements (1995)." Otros métodos que pueden usarse incluyen la prueba de reducción de log, las pruebas de proliferación, la prueba de dilución de uso de la AOAC, o la prueba de la zona de inhibición. Otros métodos se describen en los ejemplos más adelante.

Kits

60 En la presente descripción también se proporcionan kits. Típicamente, un kit incluye una o más composiciones como se describen en la presente. En determinadas modalidades, un kit puede incluir uno o más sistemas de suministro o administración, por ejemplo, para suministrar o administrar una composición como se proporcionó anteriormente, y/o instrucciones para el uso del kit (por ejemplo, instrucciones para tratar un paciente; instrucciones para desinfectar una superficie). En otra modalidad, el kit puede incluir una composición como se describe en la presente y una etiqueta, por
65 ejemplo, una etiqueta que indica que los contenidos son para administrarse a un paciente con una infección de *E. coli*.

Métodos de uso

Las composiciones farmacéuticas (por ejemplo, composiciones antibióticas) descritas previamente pueden usarse para tratar o prevenir infecciones de *E. coli* en animales, por ejemplo, mamíferos y aves. En particular, las composiciones farmacéuticas pueden usarse para mejorar uno o más síntomas y efectos secundarios de tales infecciones y/o para reducir o erradicar la bacteria *E. coli* que provoca la infección. Las composiciones farmacéuticas pueden estar en cualquier forma de dosificación adecuada, como se describió previamente. Las composiciones antibióticas descritas en la presente pueden usarse para tratar heridas o lesiones que se han infectado, por ejemplo, heridas producidas por un trauma o cirugía. Dicho uso puede reducir la cicatrización y promover la cicatrización de heridas en pacientes con heridas infectadas. Las composiciones formuladas para uso farmacéutico pueden emplearse, además, profilácticamente, por ejemplo, como antisépticos. Dichas composiciones encuentran un uso particular en el tratamiento profiláctico de incisiones quirúrgicas y otras heridas, para prevenir una infección de *E. coli*.

Las enzimas digestivas proporcionadas en la presente pueden usarse para tratar una variedad de enfermedades y trastornos asociados con una infección por bacterias *E. coli* o en las cuales las bacterias *E. coli* están implicadas. Ciertos casos incluyen infecciones asociadas con dispositivos médicos o prótesis, por ejemplo catéter, injertos, válvulas cardíacas protésicas, articulaciones artificiales, etcétera. Una composición que comprende una o más enzimas digestivas puede recubrir el dispositivo médico lo mismo durante la fabricación del dispositivo que después de la fabricación pero antes de la inserción del dispositivo.

Las heridas quirúrgicas, especialmente las asociadas con material foráneo, por ejemplo suturas, también pueden ser tratadas con las composiciones descritas en la presente. Tanto como el 71 % de todas las infecciones nosocomiales ocurren en pacientes quirúrgicos, de las cuales el 40 % 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 en heridas quirúrgicas complican los aproximadamente 23 millones de procedimientos quirúrgicos realizados anualmente en los Estados Unidos.

Las enzimas digestivas solas o con un antibiótico, anestésico, o antiinflamatorio pueden aplicarse como un ungüento, crema o líquido al sitio de la herida o como un líquido en la herida antes y durante el cierre de la herida. Después del cierre, una composición que comprende una o más enzimas digestivas puede aplicarse a los cambios de apósitos. Para las heridas que se infectan, la composición puede aplicarse por vía tópica y/o sistémica.

En un inicio agudo temprano de osteomielitis el suministro vascular al hueso se ve comprometido por la infección que se extiende hacia el tejido adyacente. Dentro de este tejido necrótico e isquémico, las bacterias pueden ser difíciles de erradicar incluso después de una respuesta fuerte del huésped, cirugía, y/o terapia con antibióticos. Los principales organismos responsables son SA y *E. coli*.

Las enzimas digestivas pueden administrarse por vía sistémica solas o en combinación con otros antibióticos. El tratamiento puede ser de 2-6 semanas de duración. El antibiótico puede administrarse como una infusión continua o administración múltiple durante el día. Una composición que comprende una o más enzimas digestivas puede usarse como un cemento impregnado con antibiótico o como perlas recubiertas con antibiótico para procedimientos de reemplazo de articulaciones.

También se proporciona tratamiento o prevención de la sepsis en un huésped inmunodeprimido. El tratamiento de infecciones en pacientes que están inmunodeprimidos en virtud de la granulocitopenia inducida por la quimioterapia y la inmunosupresión relacionada con el trasplante de órganos o médula ósea representa un reto importante. El paciente neutropénico es especialmente susceptible a una infección bacteriana, por lo que debe iniciarse rápidamente un tratamiento con antibióticos para cubrir probables patógenos, si se sospecha una infección. Los organismos que probablemente provocan infecciones en los pacientes granulocitopénicos son: SA y *E. coli*.

La composición de enzimas digestivas sola o con un antibiótico se administra preferentemente por vía oral o sistémica durante 2-6 semanas de duración. Las enzimas digestivas pueden administrarse como una infusión continua o por medio de administraciones múltiples durante el día.

Las composiciones desinfectantes, antibacteriales y detergentes como se describen en la presente pueden aplicarse a superficies no vivas en las cantidades y maneras adecuadas para reducir o erradicar la *E. coli* en tales superficies, y por lo tanto poder reducir o prevenir la transmisión y/o infectividad de *E. coli*. Las concentraciones, el tiempo y la frecuencia del tratamiento son parámetros que pueden ser determinados por un experto en la técnica.

Cualquier superficie puede desinfectarse con las composiciones descritas, que incluyen una variedad de dispositivos médicos usados en los entornos hospitalarios o de cuidado médico. Como se usa en la presente, "dispositivo médico" se refiere a cualquier dispositivo para usar en o sobre un paciente, tal como un implante o prótesis. Dichos dispositivos incluyen, sin limitación, injertos vasculares sintéticos, dispositivos de monitoreo sanguíneo, válvulas cardíacas artificiales, bisturí, cuchillo, tijeras, espátula, expansor, presilla, pinza pequeña, espéculo, retractor, sutura, malla quirúrgica, cincel, taladro, nivel, escofina, sierra, férula, calibre, pinza, fórceps, gancho, lanceta, aguja, cánula, cureta, depresor, dilatador, elevador, articulador, extractor, sonda, grapa, válvula, catéter, stent, tubo, tazón, bandeja, esponja, asa, cuchara, jeringa, marcapasos, tornillo, placa o pasador.

Pueden desinfectarse otras superficies comunitarios y hospitalarias o de cuidado médico sospechosas de albergar *E. coli*, que incluyen superficies grandes o pequeñas (pisos, mesas, mesas de cambio, camas, sistemas de ventilación, bañeras, manijas de puertas, mostradores, superficies de servicio de alimentos, etcétera). Las composiciones, además, pueden encontrar uso en lavados de las manos o el cuerpo, por ejemplo, en puntos de entrada a entornos comunitarios, cuartos de hospitales o baños.

Las composiciones descritas en la presente pueden usarse a la manera de desinfectantes comunes o en cualquier situación en que los microorganismos sean indeseables. Por ejemplo, pueden usarse como desinfectantes de superficies, en recubrimientos para dispositivos médicos, en recubrimientos para ropas, tal como para inhibir el crecimiento de bacterias o repeler mosquitos, en filtros para la purificación del aire, tal como en un avión o en entornos comunitarios u hospitalarios, en sistema de purificación de agua, como constituyentes de champús y jabones, como conservantes de alimentos, conservantes cosméticos, conservantes de medios, en herbicidas o insecticidas, como constituyentes de materiales de instalaciones, tales como en sellante de silicona y en el procesamiento de productos animales, tal como el curado de pieles animales o en mataderos.

Con 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 adecuado. También pueden incorporarse o impregnarse en el material durante la fabricación, tal como para un filtro de aire, o aplicarse de cualquier otra manera al material o al objeto.

Por ejemplo, en algunos casos, una composición descrita en la presente puede mezclarse con el material, por ejemplo durante la fabricación del material o en un momento posterior. Además, una composición puede aplicarse a la superficie de un material, lo mismo durante la fabricación que en un momento posterior. Como se usa en la presente, el término "material adecuado" significa cualquier material sobre, para o en el cual las enzimas digestivas pueden aplicarse o incorporarse, incorporando así una actividad antimicrobiana en/sobre el material. Por ejemplo, una almohadilla de gasa sobre un vendaje puede fabricarse con una composición que comprende una o más enzimas digestivas en o sobre la gasa, y/o puede aplicarse un ungüento que comprende una o más enzimas digestivas a la gasa incorporando así actividad antimicrobiana a la gasa. Los ejemplos de materiales adecuados en los que pueden usarse enzimas digestivas, incluyen, pero no se limitan a: alimentos, líquidos, un dispositivo médico (por ejemplo instrumentos quirúrgicos), una perla, una película, un monofilamento, una tela no tejida, esponja, paño, una tela de punto, una fibra corta, un tubo, una fibra hueca, un órgano artificial, un catéter, una sutura, una membrana, un vendaje y gasa. Las enzimas digestivas pueden aplicarse o mezclarse con otros numerosos tipos de materiales que son adecuados para usar en actividades médicas, de salud, seguridad de los alimentos o limpieza ambiental.

Aplicaciones Veterinarias

Las composiciones descritas en la presente, en formatos farmacéutico o desinfectante/antibacterial, detergente o antiséptico, pueden usarse, además, en una variedad de aplicaciones veterinarias. Por ejemplo, muchos mamíferos, que incluyen perros, gatos y vacas, pueden infectarse con *E. coli* o actuar como portadores de las bacterias. En consecuencia, las presentes composiciones pueden usarse para tratar animales infectados con o sospechosos de transportar *E. coli* para tratar la infección o para prevenir la transmisión a otros animales, incluidos los seres humanos. Las composiciones desinfectantes y detergentes pueden usarse para tratar viviendas de animales y equipos que tienen contacto con los animales, mientras que las formulaciones antisépticas y antibióticas pueden usarse para tratar animales para prevenir o tratar una infección.

Por ejemplo, las enzimas digestivas proporcionadas en la presente pueden usarse para la prevención y el tratamiento de mastitis, particularmente mastitis en ganado lechero, aunque puede tratarse cualquier mastitis mediante el uso de las enzimas digestivas proporcionadas en la presente. La mastitis en el ganado lechero es una inflamación de las glándulas mamarias en respuesta a una infección bacteriana intramamaria, trauma mecánico o trauma químico. Se piensa que la mastitis contagiosa es principalmente provocada por *S. aureus* y *Streptococcal agalactiae*. La mastitis ambiental puede ser provocada por una variedad de bacterias diferentes, que incluyen, pero sin limitarse a, *K. pneumoniae*, *E. coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter aerogenes*, *Streptococcal uberis*, *Streptococcal bovis*, y *Streptococcal dysgalactia*.

En algunos casos, la prevención de la mastitis bovina puede incluir sumergir las mamas diariamente con una solución que comprende una o más enzimas digestivas. En algunos casos, la solución que comprende una o más enzimas digestivas puede incluir, además, uno o más antibióticos adicionales. Cuando ocurre una infección, puede implementarse la infusión intramamaria de una o más enzimas digestivas. Como se planteó anteriormente, los antibióticos adicionales también pueden administrarse junto con las enzimas digestivas. Típicamente, las enzimas digestivas se administran mediante inyección intramamaria; sin embargo, pueden administrarse dosificaciones eficaces por vía parenteral, percutánea, mediante implante y además mediante inmersión. En algunos casos, la mastitis bovina puede tratarse administrando una cantidad eficaz de una o más enzimas digestivas a una vaca. La administración puede ser una administración profiláctica, en la que todo el ganado en la manada es tratado con una composición de enzimas digestivas, o la administración puede ocurrir cuando la infección se produce en vacas individuales.

La introducción de bacterias de *S. aureus* (referido además como SA en la presente) y bacterias de *E. coli* puede ocurrir durante la preparación de productos de carne de res, pollo, pescado y cerdo. En consecuencia, en algunos casos, puede

proporcionarse una reducción de la infección mediante la administración de una o más enzimas digestivas a un animal (por ejemplo, vaca, pollo, pavo, pez o cerdo) para reducir la presencia de bacterias *de E. coli* o SA en los intestinos del animal. La administración puede realizarse a través de cualquier método disponible que incluye inyección y a través de la introducción de una o más enzimas digestivas en la alimentación.

En algunas modalidades, la administración de una o más enzimas digestivas a un animal puede usarse para prevenir o reducir la transmisión de bacterias SA o *E. coli* del animal a otros animales o seres humanos. La administración de las enzimas digestivas puede lograrse a través de cualquier método disponible conocido en la técnica.

Aplicaciones en alimentos

En la presente se proporciona, además, un método para prevenir una infección por SA o *E. coli* de carne de res, pollo, pez y cerdo. El procesamiento de la carne de res es un punto de contaminación común: durante el proceso de sacrificio, el contenido de los intestinos o material fecal en la piel puede mezclarse con la carne, lo que permite así que las bacterias florezcan en las condiciones cálidas y húmedas. Si después las partes infectadas se muelen, las bacterias pasan de la superficie del corte al interior de la masa molida. Adicionalmente, en la producción de carne de res molida, la carne de múltiples ganados frecuentemente se muele junta, lo que permite que la contaminación de un solo animal infecte un lote completo de carne de res molida. En consecuencia, en algunos casos, puede proporcionarse una reducción de la infección mediante la administración de una o más enzimas digestivas a una vaca para reducir la presencia de bacterias en los intestinos de la vaca. La administración puede realizarse a través de cualquier método disponible que incluye inyección y a través de la introducción de una o más enzimas digestivas en la alimentación. En otro caso, la reducción de la contaminación de carne durante el sacrificio y la molienda puede proporcionarse a través del uso de aerosoles que contienen una o más enzimas digestivas como se proporciona en la presente. Dichos aerosoles pueden usarse, por ejemplo, en la desinfección de instrumentos para el sacrificio y la molienda o en la desinfección de la propia carne molida. Los métodos descritos anteriormente también pueden usarse durante el sacrificio y la preparación de productos de pollos, peces y cerdos (por ejemplo, a través de la administración de una o más enzimas digestivas a pollos, peces y/o cerdos antes del sacrificio).

Las bacterias *de E. coli* y SA también pueden dispersarse a través de frutos y vegetales sin lavar. En consecuencia, en la presente se proporciona, además, un método para lavar frutos y vegetales frescos mediante el uso de una solución, lavado, aerosol, niebla, gel, o polvo que comprende una o más enzimas digestivas como se proporciona en la presente. Un producto de lavado es una solución que se usa para bañar la superficie del producto, y típicamente está en contacto con el producto de aproximadamente 30 seg a aproximadamente 5 min. Un producto para empapar es una solución en la que los elementos del producto se sumergen durante un tiempo de aproximadamente 30 seg a aproximadamente 30 min. Sin embargo, los términos y soluciones pueden usarse indistintamente a menos que se distinga de cualquier otra manera. Se entiende que la temperatura a la cual el producto se lava o empapa influirá en la cantidad de tiempo necesaria para reducir o inactivar las bacterias en él, donde las temperaturas más cálidas conducen a la necesidad de un menor tiempo para el tratamiento.

Las soluciones para lavar o empapar descritas en la presente pueden usarse para reducir la cantidad bacteriana, especialmente la cantidad de patógenos bacterianos, sobre las superficies de frutos, vegetales, productos de carne cruda, pescado, mariscos, a nivel del consumidor (en el doméstico), en entornos de preparación de alimentos comerciales, en frutos y/o vegetales antes de la extracción de jugo, por parte de operadores mayoristas o minoristas, y/o al nivel de la cosecha, planta empacadora de carne o matadero, barco de pesca y así sucesivamente, sin limitación. Los presentes métodos son particularmente útiles para inactivar *E. coli* en las superficies de frutos y vegetales frescos.

Métodos para evaluar la actividad

Las composiciones descritas en la presente pueden evaluarse para determinar una variedad de actividades mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, las actividades enzimáticas pueden evaluarse mediante el uso de ensayos enzimáticos estándar. Las concentraciones inhibitorias mínimas (MIC) de las composiciones pueden evaluarse, además, mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica, como se describió anteriormente. Otros ensayos, que incluyen el coeficiente fenólico, también son conocidos bien por el experto. Véase además los ejemplos más adelante.

EJEMPLOS

Composiciones líquidas

Una composición seca de enzimas pancreáticas que contiene aproximadamente 200 unidades USP/mg de proteasa, aproximadamente 40 unidades USP/mg de lipasa y aproximadamente 250 unidades USP/mg de amilasa puede diluirse con diversos diluyentes (agua, solución salina, soluciones tamponadas con fosfato, soluciones estabilizadoras del pH) y opcionalmente con otros aditivos activos o inactivos (sistemas de estabilización de enzimas, tampones, colorantes, antibacteriales, detergentes, desinfectantes, antisépticos) para formar composiciones líquidas para los usos descritos en la presente. La composición enzimática seca puede diluirse en una relación de mg de la composición enzimática seca a los ml del diluyente total en el intervalo de 1 mg de composición enzimática:1 ml de diluyente total a 1 mg de composición

enzimática: 10 000 ml de diluyente total, o cualquier valor intermedio, por ejemplo, 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

Una composición seca de enzimas pancreáticas que contiene aproximadamente 200 unidades USP/mg de proteasa, aproximadamente 40 unidades USP/mg de lipasa y aproximadamente 250 unidades USP/mg de amilasa puede mezclarse con diversos ingredientes y aditivos secos activos o inactivos (por ejemplo, detergentes secos, desinfectantes, antisépticos y antibacteriales, tales como alquil etoxilato sulfato, SDS, laureth sulfato de sodio, dodecilbenceno, 4-dodecilbencenosulfonato de sodio, sistemas de estabilización de enzimas, excipientes, colorantes) para formar composiciones sólidas. La composición enzimática seca puede mezclarse con los mg totales de los aditivos en el intervalo de 1 mg de composición enzimática: 1 mg de aditivos totales a 1 mg de composición enzimática: 10 000 mg de aditivos totales, o cualquier valor intermedio, por ejemplo, 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.

Formulaciones tópicas

Una composición seca de enzimas pancreáticas que contiene aproximadamente 200 unidades USP/mg de proteasa, aproximadamente 40 unidades USP/mg de lipasa y aproximadamente 250 unidades USP/mg de amilasa puede mezclarse con diversos portadores adecuados para formulaciones farmacéuticas tópicas en relaciones en el intervalo de aproximadamente 1 mg de la composición enzimática a 1 mg del portador a aproximadamente 1 mg de la composición enzimática a aproximadamente 200 mg del portador, o cualquier relación intermedia (por ejemplo, 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 un caso se emplea una relación de 1:25, y el portador es petróleo.

Pruebas del límite bacteriano- Evaluación de las propiedades bactericidas y bacteriostáticas

Los presentes inventores han encontrado sorprendentemente durante la realización de las pruebas de límite bacteriano en una composición seca de enzimas pancreáticas de cerdo que comprendía 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 las bacterias *E. coli* no crecen en presencia de diversas diluciones de este material. La recuperación de las CFU de *E. coli* a partir de los controles positivos "enriquecidos" con *E. coli* fue de consistentemente baja a ausente. Las pruebas de límite bacteriano por dilución de la composición seca tanto en una forma no encapsulada como encapsulada en lípidos (aceite de soya al 20 % en peso de la composición) demuestran una recuperación de la bacteria de mínima a ninguna a partir de los controles positivos a los que se había añadido una cantidad conocida de CFU de *E. coli*. Una ausencia de recuperación durante tales métodos de recuperación sugiere una naturaleza bacteriostática y/o bactericida de la composición.

Material y métodos

Materiales de muestra – Un concentrado de enzimas pancreáticas porcinas no encapsuladas (uPEC) aislado a partir de cerdo (*Sus scrofa*) fue producido por un proveedor comercial (Scientific Protein Labs) para contener aproximadamente 200 U/mg de actividad proteasa, 40 U de actividad lipasa/mg y 250 U de actividad amilasa/mg. Una versión encapsulada en lípidos de este material (ePEC) se obtuvo mediante el uso de un proceso de lecho fluidizado modificado y un aceite orgánico altamente purificado y completamente hidrogenado (aceite de soya completamente hidrogenado) que se usó después para recubrir las partículas enzimáticas a un porcentaje en peso de aproximadamente 20 % de las partículas finales.

Métodos: Tanto ePEC como uPEC experimentaron un análisis microbiano estándar para la detección de microbios. Ninguna de las composiciones mostró contaminación significativa mediante el uso de las Pruebas de límite bacteriano por métodos de USP. Adicionalmente, ambas muestras fueron negativas/10 g para especies de *Salmonella* y *E. coli*. Brevemente, el procedimiento para el examen de las composiciones de prueba para la idoneidad microbiológica (es decir, estimación de la cantidad total de microorganismos viables y la ausencia de organismos específicos) se explica en la USP, capítulo 61, "Microbial Limit Tests." La USP 61 describe pruebas preparatorias, durante las cuales se determinan los parámetros de la prueba en donde la propia composición de prueba ya no inhibe la multiplicación de organismos viables. La USP 1227 ("Validación") proporciona, además, una guía para validar los métodos de recuperación. Se realizaron métodos para evaluar el Conteo total de microbios aerobios, *E. Coli*, y especies de *Salmonella*.

Conteo total de microbios aerobios: Preparación de las diluciones de prueba - Se prepararon diluciones volumétricas de ePEC y uPEC a 1:10, 1:50, 1:100 y 1:200 en caldo de soya tríptico que contenía polisorbato 20 al 4 % y lecitina al 0.5 %. La dilución volumétrica de la muestra de prueba se dividió después en alícuotas de 10 ml separadas, donde se inocularon después con un bajo número de unidades formadoras de colonias (CFU < 100/ml) de los microorganismos adecuados (*S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. enterica*). Un milímetro de las alícuotas inoculadas se sembró por duplicado mediante el uso del medio sólido adecuado (agar). Los controles positivos se prepararon, se inocularon y se sembraron de una manera similar a las muestras de prueba. Los controles negativos se prepararon, se inocularon con reactivo estéril y se sembraron de una manera similar a las muestras de prueba. Las placas se incubaron de 30 °C a 35 °C durante dos días. Al final del periodo se calculó la recuperación. La recuperación de los organismos inoculados debe ser al menos 70 % del

control positivo para mostrar que no hubo inhibición del crecimiento por parte de la composición de prueba. Se usó cloruro de trifeniltetrazolio para contar las placas.

Prueba para especies de *Salmonella* - Las diluciones preparadas con caldo de lactosa que contenía polisorbato 20 al 4 % y lecitina al 0.5 % se inocularon con ≤ 100 CFU de *Salmonella enterica*. Las diluciones inoculadas se incubaron de 30 °C a 35 °C durante 24 horas antes de transferir 1 ml a ambos caldos de selenita y cistina y tetratiónato. Los caldos selectivos se incubaron durante 18 horas de 30 °C a 35 °C antes de sembrarse en estrías en agares verde brillante, de sulfito de bismuto y de xilosa, lisina y desoxicolato. Las placas de agar selectivas se incubaron de 30 °C a 35 °C durante 24 horas. Las placas se observaron para detectar colonias características de especies de *Salmonella*. Cuando se observaron, se confirmó que una colonia representativa era de especies de *Salmonella* mediante el uso de una prueba bioquímica de identificación API 20e.

Prueba 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 CFU de *E. coli*. Las diluciones inoculadas se incubaron de 30 °C a 35 °C durante 24 horas antes de ser sembradas en estrías en agar MacKonkey. Las placas se observaron para detectar colonias características de *E. coli*. Cuando se observaron, se confirmó que una colonia representativa era de *E. coli* mediante el uso de una prueba bioquímica de identificación API 20e.

Resultados

Conteo aeróbico total: Los resultados de la prueba con el uso de la PEC no recubierta (uPEC) se muestran en la **tabla 1**, más adelante. Como se muestra, para las diluciones de 1:50, 1:100 y 1:200 el por ciento de recuperación de *S. aureus* fue 0 %, lo que demuestra 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 de la prueba	Recuperación
<i>S. aureus</i>	0 CFU	57 CFU	1:50	0 CFU	0 %
			1:100	0 CFU	0 %
			1:200	0 CFU	0 %
<i>E. coli</i>	0 CFU	63 CFU	1:50	0 CFU	0 %
			1:100	1 CFU	2 %
			1:200	1 CFU	2 %
<i>S. enterica</i>	0 CFU	66 CFU	1:50	48 CFU	73 %
			1:100	62 CFU	94 %
			1:200	56 CFU	85 %

El por ciento de recuperación de uPEC para *E. coli* también se determina en la tabla 1. Para una dilución de 1:50 la recuperación fue 0 %, para una dilución de 1:100 la recuperación fue 2 % y para una dilución de 1:200 la recuperación fue 2 %.

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

Los resultados de la prueba con el uso de la PEC encapsulada en lípidos (ePEC) se proporcionan en la tabla 2, más adelante. Como se muestra, para las diluciones de 1:50 la recuperación de *S. aureus* fue 29 %, para una dilución de 1:100 la recuperación fue 0 % y para 1:200 el por ciento de recuperación de *S. aureus* también fue 0 %.

Tabla 2

Recuperación de microorganismos después de la incubación con ePEC						
5	Organismo	Control negativo	Control positivo	Dilución	Promedio de la prueba	Recuperación de 0 %
	<i>S. aureus</i>	0 CFU	34 CFU	1:50	10 CFU	29 %
				1:100	0 CFU	0 %
10				1:200	0 CFU	0 %
	<i>E. coli</i>	0 CFU	38 CFU	1:50	12 CFU	32 %
				1:100	9 CFU	17 %
15				1:200	28 CFU	78 %
	<i>S. enterica</i>	0 CFU	61 CFU	1:50	53 CFU	87 %
				1:100	N/P	N/P
20				1:200	N/P	N/P

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

El por ciento de recuperación de ePEC para *S. enterica* también se proporciona en la tabla 2. Para una dilución de 1:50 la recuperación fue 87 %, para una dilución de 1:100 y 1:200 las pruebas no se realizaron.

Los controles positivos como se informan en las tablas 1 y 2 demuestran claramente que los medios de cultivo para todos los cultivos microbiológicos funcionaron eficazmente. En la tabla 1, puede observarse que la composición uPEC fue muy eficaz en *S. aureus* y *E. coli*. Esto se confirma por el hecho de que la recuperación de controles enriquecidos positivamente no cumplió el criterio de la USP de recuperación positiva (al menos 70 % de recuperación de las CFU de la muestra enriquecida).

También es importante tener en cuenta que la actividad bacteriostática/bactericida mostró especificidad de especie. Las muestras de *S. enterica* mostraron una recuperación excelente mediante el uso tanto de PEC recubierta como no cubierta. Dado que las bacterias comparten estructuras comunes de la pared celular y la membrana tal como lípidos y peptidoglicanos, es posible que estos resultados apunten a la sensibilidad de un componente celular más específico de la especie tal como una proteína. Si la acción de la lipasa o amilasa solas fuese suficiente para inducir muerte bacteriana o supresión del crecimiento, entonces sería poco probable lograr la recuperación de *S. enterica* a niveles tan robustos. Es posible que proteína(s) específica(s) de la especie en *S. aureus* y *E. coli* compartan secuencias peptídicas similares y la estructura terciaria local adecuada para permitir el ataque enzimático de una o numerosas de las proteasas presentes en la PEC, lo que conduce a una posterior destrucción de la bacteria. Sin embargo, estos resultados no descartan un evento de múltiples etapas donde la acción de lipasas y amilasas contra la pared celular y la membrana bacterianas primero exponga proteínas extracelulares o de transmembrana que tengan la estructura primaria y terciaria adecuadas para prestarse a la degradación enzimática por una o muchas de las proteasas de PEC.

Estos resultados demuestran un claro efecto bacteriostático sobre *S. aureus* y *E. coli* para ambas PEC recubiertas por lípido y no cubiertas. Dado que este experimento se basa en una lectura de un punto final del crecimiento de colonias bacterianas mientras las bacterias objetivo permanecen en presencia de PEC, no es posible sobre la base de estos resultados descartar la posibilidad de un efecto bacteriostático solo. Por lo tanto, el fracaso en la recuperación de una cantidad suficiente de unidades formadoras de colonias viables puede ser el resultado de la presencia supresora continua del material de PEC, contrario a la inducción de muerte bacteriana. En consecuencia, se llevaron a cabo otras pruebas experimentales para evaluar más conclusivamente las capacidades bactericidas de la PEC.

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

Preparación de las diluciones de prueba - Las diluciones volumétricas de uPEC se prepararon a 1:100 y 1:200 en caldo de soya tríptico que contenía polisorbato 20 al 4 % y lecitina al 0.5 %. La dilución volumétrica se dividió después en alícuotas separadas de 10 ml, donde después se inocularon con un número bajo de unidades formadoras de colonias (CFU <100) de los microorganismos adecuados. Un milímetro de las alícuotas inoculadas se sembró por duplicado mediante el uso del medio sólido adecuado (agar). Los controles positivos se prepararon, se inocularon y se sembraron de una manera similar a las muestras de prueba. Los controles negativos se prepararon, se inocularon con reactivo estéril y se sembraron de una manera similar a las muestras de prueba. Las placas se incubaron de 30 °C a 35 °C durante dos días. Después de esta incubación inicial, el material cultivado se recolectó después y se lavó en solución salina tamponada

con fosfato (PBS) y se filtró para eliminar la PEC. El material se resuspendió en caldo de soya tríptico diluido como se indicó anteriormente y se volvió a sembrar en medio sólido fresco (agar) y se incubó durante unos 2 días adicionales. Al final de este periodo, las colonias se cuantificaron y se calculó el porcentaje de recuperación. Al final del periodo se calculó la recuperación. La recuperación de organismos inoculados debe ser al menos 70 % para demostrar que no hubo inhibición del crecimiento. Se usó cloruro de trifeniltetrazolio para contar las placas.

Pruebas para *E. coli* - Las diluciones preparadas con caldo de lactosa que contenían polisorbato 20 al 4 % y lecitina al 0.5 % se inocularon con ≤ 100 CFU de *E. coli*. Las diluciones inoculadas se incubaron de 30 °C a 35 °C durante 24 horas antes de ser sembradas en estrías en agar MacKonkey. Las placas se observaron para detectar colonias características de *E. coli*. Cuando se observaron, se confirmó que una colonia representativa era de *E. coli* mediante el uso de una prueba bioquímica de identificación API 20e.

Las pruebas también se repitieron para *S. aureus* y *E. coli* a las diluciones de 1:20, 1:40 y 1:80.

Resultados de la prueba

Los resultados de la prueba con el uso de la uPEC no cubierta se proporcionan en las tablas 3 y 4, más adelante, los que demuestran la recuperación de bacterias luego de volver a sembrar las bacterias solas, después de la incubación con uPEC y lavado. Como se muestra en la tabla 3, para las diluciones de 1:100 y 1:200, el por ciento de recuperación de *S. aureus* fue 13 % y 48 %, respectivamente, lo que demuestra claramente la acción bactericida de uPEC sobre *S. aureus*. Como se muestra en la tabla 4, el por ciento de recuperación de *S. aureus* a una dilución de 1:20 es 2 %, para una dilución de 1:40 es 4 % y para una dilución de 1:80 es 23 %.

Tabla 3

Acción bactericida después del lavado / Recuperación de microorganismos					
Organismo	Control negativo	Control positivo	Dilución	Promedio de la prueba	% de recuperación
<i>S. aureus</i>	0 CFU	48 CFU	1:100	6 CFU	13 %
			1:200	23 CFU	48 %
<i>E. coli</i>	0 CFU	46 CFU	1:100	1 CFU	2 %
			1:200	13 CFU	28 %

Tabla 4

Acción bactericida después del lavado / Recuperación de microorganismos					
Organismo	Control negativo	Control positivo	Dilución	Promedio de la prueba	% de recuperación
<i>S. aureus</i>	0 CFU	47 CFU	1:20	1 CFU	2 %
			1:40	2 CFU	4 %
			1:80	11 CFU	23 %
<i>E. coli</i>	0 CFU	43 CFU	1:20	0 CFU	0 %
			1:40	0 CFU	0 %
			1:80	5 CFU	12 %

La recuperación de *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 2 % y para una dilución de 1:200 la recuperación fue 28 %. Como se muestra en la tabla 4, el por ciento de recuperación de *E. coli* a una dilución de 1:20 es 0 %, para una dilución de 1:40 es 0 % y para una dilución de 1:80 es 12 %.

Los controles positivos demuestran que los medios de cultivo para todos los cultivos microbiológicos funcionaron eficazmente. Esto argumenta un verdadero efecto bactericida cuando los organismos seleccionados se exponen a PEC. Si la acción de la PEC fuese meramente bacteriostática, retirar la PEC del cocultivo con las bacterias de prueba daría como resultado una liberación de cualquier acción supresora por parte de la PEC con una recuperación de un crecimiento activo. Sin embargo, la eliminación de PEC no produce ningún tipo de recuperación, aunque los cultivos se dejaron crecer durante un periodo completo de 24 horas. Esto apoya firmemente la idea de que el motivo por el cual los organismos seleccionados no logran mostrar una recuperación de las CFU tras la exposición a la PEC se debe a una acción bactericida.

de la PEC. Esta acción podría incluir mecanismos tales como daño físico e irreversible a lípidos de la superficie celular, proteínas de membrana o cápsula bacteriana por degradación enzimática, lo que conduce a desequilibrios de electrolitos iónicos extracelulares e intercelulares, cambios en la acidez y daño al material genético.

- 5 Se ha descrito un número de modalidades de la invención. Sin embargo, se entenderá que pueden hacerse varias modificaciones sin apartarse del alcance de la invención. En consecuencia, otras modalidades están dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

10

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica oral para usar en el tratamiento o la prevención de una infección de *Escherichia coli* (*E. coli*) en un ave o un mamífero, que comprende enzimas digestivas que comprenden una proteasa, una amilasa y una lipasa, en donde las enzimas digestivas son bactericidas.
5
2. La composición farmacéutica oral para usar de conformidad con la reivindicación 1, que comprende, además, una celulasa, una sacarasa, papaína, o una maltasa.
3. La composición farmacéutica oral para usar de conformidad con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde la proteasa comprende quimotripsina y tripsina.
10
4. La composición farmacéutica oral para usar de conformidad con cualquier reivindicación anterior, en donde las enzimas digestivas se obtienen, independientemente, de una fuente animal, una fuente microbiana, una fuente vegetal, una fuente fúngica, o se preparan sintéticamente.
15
5. La composición farmacéutica oral para usar de conformidad con cualquier reivindicación anterior, en donde la relación de proteasa total a lipasa total en unidades U.S.P. en la composición farmacéutica varía de 1:1 a 20:1.
6. La composición farmacéutica oral para usar de conformidad con la reivindicación 5, en donde la relación de proteasa total a lipasa total varía de 4:1 a 10:1.
20
7. La composición farmacéutica oral para usar de conformidad con la reivindicación 5, en donde la relación de proteasa total a lipasa total es 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 o 20:1.
25
8. La composición farmacéutica oral para usar de conformidad con la reivindicación 6, en donde la relación de proteasa total a lipasa total es 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1 o 10:1.
9. La composición farmacéutica oral para usar de conformidad con cualquier reivindicación anterior, en donde la composición farmacéutica es una formulación de dosificación seleccionada del grupo que consiste en una píldora, una tableta, una cápsula, un comprimido de forma ovalada, un rociado, una emulsión, un polvo, un líquido y una combinación de cualquiera de estos.
30
10. Una composición farmacéutica oral para usar en el tratamiento de un mamífero o un ave que muestra uno o más síntomas debido a una infección de *E. coli*, que comprende enzimas digestivas que comprenden una proteasa, una amilasa y una lipasa.
35
11. La composición farmacéutica oral para usar de conformidad con la reivindicación 1 o 10, que comprende, además, un recubrimiento.
40
12. La composición farmacéutica oral para usar de conformidad con la reivindicación 1 o 10, en donde la proteasa está presente en la composición en una cantidad de 45 000, 50 000, 55 000, 60 000, 65 000 o 70 000 unidades USP/dosis.
45
13. Una composición farmacéutica oral para usar en el tratamiento de la diarrea en un individuo, que comprende enzimas digestivas bactericidas que comprenden una proteasa, una amilasa y una lipasa.
14. La composición farmacéutica oral para usar de conformidad con cualquier reivindicación anterior, en donde la *E. coli* es *E. coli* productora de toxinas Shiga (STEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC) o *E. coli* enteropatógena (EPEC).
50