

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 806 426**

51 Int. Cl.:

A61K 38/50 (2006.01)

A61K 9/50 (2006.01)

A61P 1/00 (2006.01)

A61P 1/14 (2006.01)

C12N 9/86 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.10.2015 PCT/US2015/054606**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.04.2016 WO16057744**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.10.2015 E 15849110 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.04.2020 EP 3204495**

54 Título: **Formulaciones de betalactamasas y usos de las mismas**

30 Prioridad:

08.10.2014 US 201462061507 P

28.02.2015 US 201562126556 P

14.08.2015 US 201562205443 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.02.2021

73 Titular/es:

SYNTHETIC BIOLOGICS INC. (100.0%)

9605 Medical Center Dr. Suite 270

Rockville, MD 20850, US

72 Inventor/es:

BRISTOL, ANDREW;

KALEKO, MICHAEL y

CONNELLY, SHEILA

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 806 426 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

Formulaciones de betalactamasas y usos de las mismas

Campo de la invención

La presente invención proporciona, en parte, formas de dosificación farmacéutica que comprenden betalactamasas y usos de las mismas.

Antecedentes

Los antibióticos betalactámicos se caracterizan por un anillo betalactámico en su estructura molecular. La integridad del anillo betalactámico es esencial para la actividad biológica, lo que da como resultado la inactivación de un conjunto de transpeptidasas que catalizan las reacciones de reticulación finales de la síntesis de peptidoglucano. Los miembros de la familia de los antibióticos betalactámicos incluyen penicilinas, cefalosporinas, clavams (u oxapenams), cefamicinas y carbapenems.

Las betalactamasas son enzimas defensivas bacterianas que hidrolizan los antibióticos betalactámicos. Las bacterias gramnegativas producen betalactamasas para lograr resistencia a los antibióticos betalactámicos. En particular, las betalactamasas son capaces de catalizar eficientemente la hidrólisis irreversible del enlace amida del anillo betalactámico lo que resulta en producto o productos biológicamente inactivos.

Puede considerarse que los humanos son un "superorganismo" que es un conglomerado de células de mamíferos y microbianas, estimándose que estas últimas superan en número al primero en diez a uno. Este componente microbiano y su repertorio genético microbiano, el microbioma, es aproximadamente 100 veces mayor que la del hospedador humano. Sorprendentemente, a pesar de esta enorme diversidad de organismos extraños, el sistema inmunitario humano generalmente mantiene un estado de sinergia. Esto es particularmente cierto en el tracto gastrointestinal (GI) distal, que alberga hasta 1000 especies bacterianas distintas y un exceso estimado de 1×10^{14} microorganismos, y parece ser central en la definición del estado de salud del hospedador humano. La pérdida del equilibrio cuidadoso en el microbioma, especialmente en el tracto GI, puede dar lugar a diversas enfermedades.

Sin embargo, los tratamientos médicos antibióticos, que son necesarios para tratar ciertos aspectos de la enfermedad, pueden inducir la interrupción en el microbioma, incluyendo en el tracto GI, y dar lugar a una enfermedad adicional. Por ejemplo, ciertos betalactámicos administrados por vía parenteral como ampicilina, ceftriaxona, cefoperazona y piperacilina son, en parte, eliminados por excreción biliar en la parte proximal del intestino delgado (duodeno). Los betalactámicos no absorbidos residuales en el tracto GI pueden provocar un efecto indeseable en el equilibrio ecológico de la microbiota intestinal normal dando como resultado, por ejemplo, infección por *Clostridium difficile* (CDI), diarrea asociada a antibióticos, sobrecrecimiento de bacterias patógenas tales como enterococos resistentes a vancomicina (VRE), bacilos gramnegativos productores de betalactamasa de espectro extendido (ESBL) y hongos, y selección de cepas resistentes a antibióticos entre la microbiota intestinal normal y las bacterias patógenas potenciales.

Un enfoque para evitar o reequilibrar el equilibrio ecológico de la microbiota intestinal normal es el uso terapéutico de betalactamasas, por ejemplo, inactivando antibióticos excretados o no absorbidos en el tracto GI, manteniendo de esta manera una microbiota intestinal normal y evitando su sobrecrecimiento con microorganismos potencialmente patógenos.

Tarkkanen y col. (Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2009, 53(6), 2455-2462) desvelan gránulos que comprenden P1A β -lactamasa y Eudragit L30 D-55 y su uso en la prevención de alteraciones inducidas por ampicilina en la microflora intestinal.

Por consiguiente, sigue existiendo la necesidad de formulaciones mejoradas de betalactamasa para su uso en la intervención terapéutica.

Sumario de la invención

La invención se define en las reivindicaciones adjuntas.

Por consiguiente, la presente invención proporciona formulaciones de liberación modificada que comprenden gránulos de liberación modificada que comprenden una beta-lactamasa (por ejemplo, "P3A", como se muestra en SEQ ID NO: 1 o variantes de la misma) y/o agentes terapéuticos adicionales. En diversas realizaciones, las formulaciones liberan una cantidad sustancial de betalactamasa en el tracto GI. En una realización, la formulación comprende al menos una partícula central y un recubrimiento base sobre la partícula central, en la que el recubrimiento base comprende una betalactamasa. En otra realización, la formulación comprende al menos una partícula central, en la que la betalactamasa está encapsulada dentro de la partícula central. En diversas realizaciones, la formulación comprende un recubrimiento de liberación modificada tal como un recubrimiento de liberación retardada dispuesto sobre la partícula central. En algunas realizaciones, el recubrimiento de liberación retardada es sustancialmente estable en el fluido gástrico. En una realización, el recubrimiento de liberación

retardada comprende un compuesto Eudragit. En diversas realizaciones, la formulación puede estar en forma de una cápsula o de un comprimido. En algunas realizaciones, la cápsula o el comprimido incluyen una pluralidad de partículas centrales.

Estas betalactamasas mejoradas encuentran usos en una serie de terapias, incluyendo la prevención o el tratamiento de CDI y/o una enfermedad asociada a *C. difficile* u otros efectos adversos inducidos por antibióticos en el tracto GI. Por ejemplo, las betalactamasas encuentran uso permitiendo que un paciente se someta a una terapia con antibióticos mientras se protege contra enfermedades que podrían resultar del exceso de antibióticos que afectan negativamente al microbioma. Tal uso no interfiere con la utilidad sistémica del antibiótico. En su lugar, las betalactamasas retiran el exceso de antibiótico que puede poblar partes del tracto GI y al hacerlo, previenen la interrupción de la microbiota que está ligada a los diversos estados de enfermedad descritos en el presente documento.

En algunos aspectos, la presente invención proporciona una formulación de liberación modificada de la invención para su uso en la prevención de la infección por *C. difficile* (CDI) y/o una enfermedad asociada a *C. difficile* en un paciente que está recibiendo terapia con un antibiótico primario, tales como uno o más de una ceftriaxona, cefotaxima, cefazolina, cefoperazona, cefuroxima y piperacilina, y el antibiótico primario se administra por vía intravenosa.

Descripción de las figuras

La **Figura 1A** representa una realización de un procedimiento de fabricación para producir cápsulas de liberación retardada de P3A.

La **Figura 1B** muestra fotografías de gránulos con recubrimiento entérico de P3A producidos de acuerdo con una realización de la invención.

La **Figura 2** representa el perfil de disolución de pH de los gránulos de P3A producidos de acuerdo con una realización de la invención.

La **Figura 3** representa la estabilidad de los gránulos de P3A en muestras de quimo humano de cinco donantes diferentes.

La **Figura 4** representa la estabilidad de P3A en cinco muestras de quimo humano y una muestra de quimo mixto.

La **Figura 5** representa la cantidad de ceftriaxona hidrolizada (nmoles) - a 30, 60, 90 y 120 segundos de digestión con sustancia farmacológica (Ref) P1A o P3A (también conocido como SYN-004) 10 nM o material de gránulos P1A o P3A disueltos (Gran).

La **Figura 6** representa realizaciones adicionales de un procedimiento de fabricación para producir cápsulas de liberación retardada de P3A.

La **Figura 7** muestra el diseño de un estudio en cerdos para evaluar la protección de microbioma mediada por P3A. "*" Indica que el Cerdo 9 estaba enfermo y no aumentó de peso. "****" indica que el Cerdo 8 estaba moribundo y se sacrificó el día 14, después de la administración de *C. difficile*. CDI no se confirmó. Aparte de los Cerdos 8 y 9, ningún otro animal se enfermó. CDI no se confirmó en ningún animal, incluyendo el Cerdo 8, a través de ELISA de toxina A de *C. difficile* o IL8 o mediante análisis histológicos del tracto intestinal.

La **Figura 8** muestra una línea temporal esquemática de un estudio en cerdos para evaluar la protección de microbioma mediada por P3A (SYN-004). Los cerdos nacieron por cesárea el Día 0 y se mantuvieron en microaisladores. El Día 5, los animales fueron sondados con un grupo de microflora fecal humana normal. La administración de P3A (75 mg/dosis, QID) se inició el Día 8 (Grupo 4) y continuó durante 7 días (hasta el Día 14). El antibiótico (clindamicina, 50 mg/kg; Grupo 2) o ceftriaxona (CRO, 50 mg/kg, Grupos 3 y 4) se administró mediante inyección IP una vez al día comenzando el Día 9 y se continuó durante 4 días hasta el Día 12. *C. difficile* (2,6 x 10⁶ ufc) se administró por vía oral a todos los animales el Día 13. Las heces se recogieron los Días 11, 12, 14, 18, 20 directamente del recto usando hisopos de algodón estériles y en la necropsia el Día 21 directamente del tracto intestinal.

La **Figura 9** muestra la clasificación taxonómica de los filos de bacterias identificados en el ADN aislado de las heces de cerdo en el Día de Estudio 14. En cada cerdo, de abajo hacia arriba, las barras representan la abundancia relativa de: bacteroidetes, proteobacterias, firmicutes y sin clasificar. Por ejemplo, en el Grupo 1, las bacterias presentes en la muestra de ADN fecal del cerdo 2 mostraron la presencia de todo tipo de bacterias. En el Grupo 2, los Cerdos 7 y 8 mostraron la presencia predominantemente de bacteroidetes y proteobacterias. En el Grupo 3, la muestra de ADN fecal del Cerdo 5 mostró predominantemente bacteroidetes, mientras que el cerdo 6 mostró predominantemente bacteroidetes, proteobacterias y firmicutes. En el Grupo 4, los Cerdos 10 y 12 mostraron la presencia de todo tipo de bacterias, mientras que el Cerdo 11 mostró la presencia predominantemente de bacteroidetes, proteobacterias y firmicutes.

Las **Figuras 10A y 10B** muestran la cuantificación del crecimiento bacteriano de muestras fecales recolectadas en la necropsia en el Día de Estudio 21. La **Figura 10A** muestra fotografías de las placas de LB+amp. La **Figura 10B** muestra la cuantificación de las colonias bacterianas en cada placa. Cantidades iguales de heces diluidas recolectadas de animales en la necropsia se colocaron en placas LB+amp y se cultivaron en condiciones aerobias a 37 °C. Las colonias se contaron teniendo en cuenta el factor de dilución.

La **Figura 11** proporciona un mapa de calor de cepas bacterianas en cada muestra fecal en función de la abundancia relativa. Las muestras se agruparon según la similitud composicional de los taxones bacterianos usando la función de distancia máxima y el algoritmo de agrupación jerárquica de Ward para crear el dendrograma que se muestra en la parte superior e izquierda de la figura. La identificación de la muestra se muestra a la derecha. El recuadro en la parte superior de la figura resalta que el Grupo 1 (Control) y el Grupo 4 (Ceftriaxona más P3A) son más similares entre sí que los Grupos 2 (Clindamicina) y 3 (Ceftriaxona sola).

La **Figura 12** proporciona un mapa de calor de géneros bacterianos en cada muestra fecal en función de la abundancia relativa. Las muestras se agruparon según la similitud composicional de los taxones bacterianos usando la función de distancia máxima y el algoritmo de agrupación jerárquica de Ward para crear el dendrograma que se muestra en la parte superior e izquierda de la figura.

La **Figura 13** proporciona un análisis metagenómico comparativo usando la clasificación del centroide para comparar la desviación promedio de la frecuencia de cada cepa bacteriana dentro de cada grupo de estudio de la frecuencia promedio general de todos los grupos de estudio.

La **Figura 14** muestra análisis metagenómicos comparativos usando la clasificación del centroide para comparar la desviación promedio de la frecuencia de cada cepa bacteriana dentro de cada grupo de estudio de la frecuencia promedio general de todos los grupos de estudio.

La **Figura 15** muestra la clasificación del centroide a nivel de especie de subconjuntos de muestras para comparar la desviación promedio de la frecuencia de cada especie bacteriana en el Grupo 3 (Ceftriaxona) y el Grupo 4 (Ceftriaxona más P3A) con el Grupo 1 (Control). Los recuadros en la parte superior e inferior de la parte de la figura resaltan la reducción en la abundancia de *Turicibacter* spp, una especie asociada a enfermedad inflamatoria idiopática del intestino y diarrea hemorrágica aguda en perros (Minamoto y col., 2015, Gut Microbes 6(1), 33-47; Rossi y col., 2014, PLoS ONE 9(4), e94699) y la sobreabundancia de la arquea metanogénica, *Methanobrevibacter smithii*, una especie que se ha informado estar ligada al estreñimiento, al síndrome del intestino irritable y la obesidad (Pimentel y col., 2002, Am. J. Gastroenter. Supple. 1:28).

La **Figura 16** muestra la clasificación centroide a nivel de especie de los subconjuntos de muestras para comparar la desviación promedio de la frecuencia de especies bacterianas anaerobias y aerobias facultativas de la frecuencia promedio única de especies de todos los grupos. Los óvalos resaltan que el Grupo 4 (Ceftriaxona más P3A) mostró un patrón más similar de especies bacterianas aeróbicas anaerobias y facultativas al del Grupo 1 (Control) que el Grupo 2 (Clindamicina) o el Grupo 3 (Ceftriaxona sola).

La **Figura 17** muestra la clasificación centroide a nivel de especie de los subconjuntos de muestras para comparar la desviación promedio de la frecuencia de especies bacterianas aerobias obligadas de la frecuencia promedio única de especies de todos los grupos.

La **Figura 18** muestra la clasificación centroide a nivel de especie de los subconjuntos de muestras para comparar la desviación promedio de la frecuencia de especies bacterianas grampositivas de la frecuencia promedio única de especies del Grupo 1, el Grupo 2 y el Grupo 3. El óvalo destaca que el Grupo 4 (Ceftriaxona más P3A) mostró una sobreabundancia de especies grampositivas en comparación con los Grupos 1 (Control) y el Grupo 3 (Ceftriaxona sola).

La **Figura 19** muestra la clasificación centroide a nivel de especie de los subconjuntos de muestras para comparar la desviación promedio de la frecuencia de especies bacterianas grampositivas de la frecuencia promedio única de especies del Grupo 1. El óvalo destaca que el Grupo 4 (Ceftriaxona más P3A) mostró una sobreabundancia de especies grampositivas en comparación con el Grupo 1 (Control).

La **Figura 20** muestra la clasificación centroide a nivel de especie de los subconjuntos de muestras para comparar la desviación promedio de la frecuencia de especies bacterianas gramnegativas de la frecuencia promedio única de especies de los Grupos 1, 2 y 3.

La **Figura 21** muestra la clasificación centroide a nivel de especie de los subconjuntos de muestras para comparar la desviación promedio de la frecuencia de especies bacterianas grampositivas de la frecuencia promedio única de especies de los Grupos 3 y 4.

La **Figura 22** muestra los niveles de ceftriaxona en el suero de los cerdos tratados. Un total de 10 cerdos fueron tratados una vez al día con ceftriaxona IV (CRO; 50 mg/kg) durante un total de 7 días. Una cohorte de 5 cerdos también recibió P3A oral (75 mg, cuatro veces al día), comenzando el día anterior al tratamiento con CRO y extendiéndose un día después de que se detuvo el CRO, durante un total de 9 días. En el Día 2 del tratamiento

con CRO, se recogió suero 1,6 y 19 horas después de la administración de CRO. El suero se analizó para determinar los niveles de CRO usando un ensayo de cromatografía líquida de alto rendimiento validado. Los datos se muestran como media y desviación estándar. Los niveles de CRO en el suero recogido a las 19 horas estaban por debajo del límite de detección del ensayo (0,5 ug/ml). Para ambos conjuntos de histogramas (1 hora y 6 horas), la barra izquierda es solo ceftriaxona y la barra derecha es ceftriaxona y P3A.

Descripción detallada de la invención

Betalactamasas

En algunos aspectos, la presente invención está dirigida a composiciones y formulaciones y usos de una o más betalactamasas. Como se usa en el presente documento, una betalactamasa se refiere a una enzima, que hidroliza los betalactámicos. La hidrólisis del enlace amida del anillo betalactámico hace que los agentes antimicrobianos sean biológicamente inactivos. Como se usa en el presente documento, las betalactamasas de clase A (clasificación de Ambler) se refieren a las serina betalactamasas, en donde la hidrólisis de betalactámicos está mediada por serina en el sitio activo, generalmente en la posición de aminoácido 70 en la hélice alfa2. Las betalactamasas de clase A incluyen pero no se limitan a Len-1, SHV-1, TEM-1, PSE-3/PSE-3, ROB-1, *Bacillus cereus* tales como 5/B tipo 1, 569/H tipo 1 y 569/H tipo 3, *Bacillus anthracis* sp, *Bacillus licheniformis* tales como PenP, *Bacillus weihenstephanensis*, *Bacillus clausii*, *Staphylococcus aureus*, PC1, Sme-1, NmcA, IMI-, PER-, VEB-, GES-, KPC-, CME- y CTX-M de tipos de betalactamasas.

En diversos aspectos, las betalactamasas tienen la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 (es decir, "P3A" como se describe en el documento WO2011/148041). Pueden hacerse mutaciones en esta secuencia para generar derivados de betalactamasa que pueden utilizarse por los procedimientos de la invención.

SEQ ID NO: 1

TEMKDDFAKLEEQFDAKLGFALDTGTNRTVAYRPDERFAFASTIKALTVGVLLQQKS

IEDLNQRITYTRDDLVNYPITEKHVDTGMTLKLADASLRYSDNAAQNLIKQIGGPE

SLKKELRKIGDEVNPERFEPELNEVNPGETQDTSTARALVTSRAFAEDKLPSEKR

ELLIDWMKRNTTGDALIRAGVPDGWEVADKTGAASYGTRNDIAIWPPKGDPPVLAV

LSSRDKKDAKYDNKLIAEATKVMKALNMNGK.

En algunas realizaciones, la betalactamasa comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 95 % o aproximadamente un 96 %, o aproximadamente un 97 % o aproximadamente un 98 % o aproximadamente un 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1.

En algunas realizaciones, La SEQ ID NO: 1 puede tener una Met y/o Thr precediendo al primer resto de la secuencia. En diversas realizaciones, la Met puede escindirse. Como se describe en el presente documento, pueden hacerse mutaciones en la secuencia que comprende la Met y/o Thr que preceden al primer resto para generar derivados de betalactamasa. En algunas realizaciones, la Thr principal puede provocar una mayor estabilidad de la enzima en relación con otro aminoácido principal (por ejemplo, Lys). Por ejemplo, dicho resto puede conferir mayor resistencia a una amino peptidasa.

También se proporciona en el presente documento la secuencia de nucleótidos del P3A como SEQ ID NO: 2:

SEQ ID NO: 2

atgactgagatgaaagatgatttgcgaagctggaagaacagttgacgcaaaattgggcatttgcgctggacacgg
gtacgaatcgtacggttcctaccgtccggacgagcgcttcgccttcgcgagcacgatcaaagccctgaccgtcgcg
tgctgtccagcaaaagagcatcgaggacctgaaccagcgattacctacacccgtgatgatctggtgaactataatc
cgatcaccgagaaacacgttgataccggtatgacctgaaagaactggcagatgcaagcctgcgtacagcgataa
cgcggtcagaatctgattctgaagcaaatcggtggtccggagagctgaagaagaactgcgtaaatcgcgatg
aagtcactaatccggagcgttttagccggagctgaacgaagtgaatccgggtgaaacgcaagacacgagcaccg
cgcggtcgctgtcacctccctgcgcttcgcactggaagataagctgcggtcgagaaaacgagcgctgctgatcg
actggatgaagcgcaatacgaaccggcgacgctgattcgtgcggttcggacggttgggaagtggctgacaa

gaccggtgcggcgagctacggcaccgtaacgatatcgcatcattggccacctaaaggtagcccggtcgctggtg
ccgtactgagcagccgtgacaagaaagacgcaaatgatgataacaagctgattgcagaggcgaccaaagtgttat
gaaggcactgaacatgaatgtaag

Un polinucleótido puede tener al menos aproximadamente el 60 % (por ejemplo, aproximadamente el 60 %, o aproximadamente el 61 %, o aproximadamente el 62 %, o aproximadamente el 63 %, o aproximadamente el 64 %, o aproximadamente el 65 %, o aproximadamente el 66 %, o aproximadamente el 67 %, o aproximadamente el 68 %, o aproximadamente el 69 %, o aproximadamente el 70 %, o aproximadamente el 71 %, o aproximadamente el 72 %, o aproximadamente el 73 %, o aproximadamente el 74 %, o aproximadamente el 75 %, o aproximadamente el 76 %, o aproximadamente el 77 %, o aproximadamente el 78 %, o aproximadamente el 79 %, o aproximadamente el 80 %, o aproximadamente el 81 %, o aproximadamente el 82 %, o aproximadamente el 83 %, o aproximadamente el 84 %, o aproximadamente el 85 %, o aproximadamente el 86 %, o aproximadamente el 87 %, o aproximadamente el 88 %, o aproximadamente el 89 %, o aproximadamente el 90 %, o aproximadamente el 91 %, o aproximadamente el 92 %, o aproximadamente el 93 %, o aproximadamente el 94 %, o aproximadamente el 95 %, o aproximadamente el 96 %, o aproximadamente el 97 %, o aproximadamente el 98 %, o aproximadamente el 99 %) de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 2.

En algunas realizaciones, la betalactamasa, por ejemplo, P3A, tiene una actividad hidrolizante de ceftriaxona sustancial. En algunas realizaciones, la betalactamasa, por ejemplo, P3A, hidroliza la ceftriaxona de manera sustancialmente más eficiente que P1A.

En realizaciones ilustrativas, las betalactamasas comprenden una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1 y la siguiente clasificación de Ambler: un resto hidrófobo distinto de alanina (A) en la posición 232; un resto hidrófilo distinto de alanina (A) en la posición 237; un resto hidrófobo distinto de alanina (A) en la posición 238; un resto hidrófilo distinto de serina (S) en la posición 240; y un resto hidrófilo distinto de aspartato (D) en la posición 276. En algunas realizaciones, el resto hidrófobo distinto de alanina (A) en la posición 232 es glicina (G). En algunas realizaciones, el resto hidrófilo distinto de alanina (A) en la posición 237 es serina (S). En algunas realizaciones, el resto hidrófobo distinto de alanina (A) en la posición 238 es glicina (G). En algunas realizaciones, el resto hidrófilo distinto de serina (S) en la posición 240 es aspartato (D). En algunas realizaciones, el resto hidrófilo distinto de aspartato (D) en la posición 276 es asparagina (N). En algunas realizaciones, la betalactamasa comprende uno o más de A232G, A237S, A238G, S240D y D276N. En algunas realizaciones, la betalactamasa comprende todos de A232G, A237S, A238G, S240D y D276N, cuya secuencia es SEQ ID NO: 3, es decir, P4A. En algunas realizaciones, la betalactamasa y/o composición farmacéutica comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 95 % o un 97 % o un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia del con la SEQ ID NO: 3.

SEQ ID NO: 3

EMKDDFAKLEEQFADAKLGIFALDTGTNRTVAYRPDERFAFASTIKALTVGVLLQQKSIEDLNQR
ITTRDDLVNYPITEKHVDTGMTLKEADSLRYSDNAAQNLIKQIGGPESLKKELRKIGDEV
NPERFEPELNEVNPGETQDTSTARALVTSRAFALEDKLPSEKRELLIDWMKRNTTGALIRA
GVDPGWEVGDKTGSGDYGTRNDIAIWPPKGPVVLAVLSSRDKKDAKYDNKLIAEATKVM
KALNMNGK

En algunas realizaciones, el polipéptido betalactamasa de la invención comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 95 % o aproximadamente un 96 %, o aproximadamente un 97 % o aproximadamente un 98 % o aproximadamente un 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 3.

La SEQ ID NO: 4, deriva de SEQ ID NO: 3 e incluye además la señal y la adición de los aminoácidos QASKT (la región codificante está subrayada):

MIQKRKRTVSFRLVLMCTLLFVSLPITKTSAQASKTEMKDDFAKLEEQFDAKLG
IFALDTGTNRTVAYRPFDERFAFASTIKALTVGVLLQQKSIEDLNQRITYTRDDL
V
NYNPITEKHVDTGMTLKLADASLRYSDNAQNLIKQIGGPESLKKELRKIGD
EVTNPERFEPELNEVNPGETQDTSTARALVTSRAFALEDKLPSEKRELLIDW
MKRNTTGDALIRAGVPDGEVVDKGTSGDYGTRNDIAIWPPKGDPVVLAVL
SSRDKKDAKYDNKLIAEATKV/VMKALNMNGK

Un polinucleótido ilustrativo es SEQ ID NO: 5, que es la secuencia completa de nucleótidos de A232G, A237S, A238G, S240D y mutante D276N, el Sitio Hind III (AAGCTT-en negrita) y los aminoácidos K y T adicionales. La parte subrayada de SEQ ID NO: 5 puede omitirse. El líder y los nucleótidos adicionales (sitio Hind III y aminoácidos K y T para la adición de la secuencia de aminoácidos QASKT) están subrayados.

atgattcaaaaacgaaagcggacagttcggtcagactgtgcttatgtgcacgctgtattgtcagttgccc
attacaaaaacatcagcgaagcttccaagacggagatgaaagatgatttgcaaaacttgaggaaca
atttgatgcaaaactcgggatctttgcatggatacaggtacaaacccggacggtagcgatcgccggatg
agcgtttgtctttgcttcgacgattaaggcttaactgtaggcgtgtttgcaacagaaatcaatagaagatc
tgaaccagagaataacatatacagtgatgatctgttaaactacaacccgattacggaaaagcacggtga
tacgggaatgacgctcaaagagcttgcggatgcttcgctcgatagtgacaatgcggcacagaatctc
attcttaacaaattggcggacctgaaagttgaaaaaggaactgaggaagattggtgatgaggttaca
atcccgaacgattcgaaccagagtaaatgaagtgaatccgggtgaaactcaggataccagtacagca
agagcactgtgcacaagccttcgagccttctgtgaagataaactccaagtgaataacgcgagcttta
atcgattggatgaaacgaaataccactggagacgccttaacggtgcccgtgtgcccgcggttgaggaa
gtgggtgataaaactggaagcggagattatggaacccggaatgacattgccatcattggccgccaaaa
ggagatcctgtcgttcttcagttattccagcagggataaaaaggacgccaagtatgataataaacttatt
gcagaggcaacaaagggtggaatgaaagccttaaacatgaacggcaataa

El polinucleótido puede tener al menos aproximadamente el 60 % (por ejemplo, aproximadamente el 60 %, o aproximadamente el 61 %, o aproximadamente el 62 %, o aproximadamente el 63 %, o aproximadamente el 64 %, o aproximadamente el 65 %, o aproximadamente el 66 %, o aproximadamente el 67 %, o aproximadamente el 68 %, o aproximadamente el 69 %, o aproximadamente el 70 %, o aproximadamente el 71 %, o aproximadamente el 72 %, o aproximadamente el 73 %, o aproximadamente el 74 %, o aproximadamente el 75 %, o aproximadamente el 76 %, o aproximadamente el 77 %, o aproximadamente el 78 %, o aproximadamente el 79 %, o aproximadamente el 80 %, o aproximadamente el 81 %, o aproximadamente el 82 %, o aproximadamente el 83 %, o aproximadamente el 84 %, o aproximadamente el 85 %, o aproximadamente el 86 %, o aproximadamente el 87 %, o aproximadamente el 88 %, o aproximadamente el 89 %, o aproximadamente el 90 %, o aproximadamente el 91 %, o aproximadamente el 92 %, o aproximadamente el 93 %, o aproximadamente el 94 %, o aproximadamente el 95 %, o aproximadamente el 96 %, o aproximadamente el 97 %, o aproximadamente el 98 %, o aproximadamente el 99 %) de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 5 (con o sin la parte subrayada).

En diversos aspectos, el polipéptido betalactamasa tiene la secuencia de SEQ ID NO: 6 (es decir, P2A) o derivado por una o más mutaciones de SEQ ID NO: 6:

ETGTISISQLNKNVWVHTELGYNFNGEAVPSNGLVLNTSKGLVLVDSSWDNK
 LTKELIEMVEKKFQKRVTDVIIITHAHADRIGGITALKERGIKAHSTALTAELAK
 NSGYEEPLGDLQTITSLKFGNTKVETFYPGKGHTEDNIVVWLPQYQILAGG
 CLVKSAEAKDLGNVADAYVNEWSTSIENVLKRYGNINSVVPGHGEVGDKG
 LLLHTLDDLK.

En algunas realizaciones, el polipéptido betalactamasa de la invención comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 95 % o aproximadamente un 96 %, o aproximadamente un 97 % o aproximadamente un 98 % o aproximadamente un 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 6.

- 5 En algunas realizaciones, la betalactamasa y/o composición farmacéutica comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 95 % o un 97 % o un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 6.

Las secuencias adicionales de betalactamasas que incluyen P1A (es decir, SEQ ID NO: 1 excepto que la posición 276 es D y no N), P2A, P3A y P4A y derivados de las mismas se describen, por ejemplo, en los documentos WO 2011/148041 y PCT/US2015/026457.

- 10 Además, el polipéptido betalactamasa puede incluir restos adicionales cadena arriba del primer resto de SEQ ID NO: 1 (véase, por ejemplo, JBC 258 (18): 11211, 1983 - incluyendo las versiones exo-grande y exo-pequeña de penP y penP1). Además, el polipéptido betalactamasa también puede incluir restos adicionales corriente abajo del último resto de SEQ ID NO: 1.

- 15 En algunas realizaciones, la betalactamasa incluye una o más mutaciones (por ejemplo, aproximadamente 1, o aproximadamente 2, o aproximadamente 3, o aproximadamente 4, o aproximadamente 5, o aproximadamente 6, o aproximadamente 7, o aproximadamente 8, o aproximadamente 9, o aproximadamente 10) con respecto a la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, la betalactamasa incluye una variante de P3A, por ejemplo, una secuencia con al menos un 95, un 96, un 97, un 98, un 99, un 99,5, un 99,8, un 99,9 % de identidad con la SEQ ID NO: 1. En diversas realizaciones, uno o más aminoácidos de SEQ ID NO: 1 se sustituyen con un aminoácido de origen natural, tales como un aminoácido hidrófilo (por ejemplo, un aminoácido hidrófilo polar y cargado positivamente, tales como arginina (R) o lisina (K); un aminoácido hidrófilo polar y neutro de carga, tales como asparagina (N), glutamina (Q), serina (S), treonina (T), prolina (P) y cisteína (C), un aminoácido hidrófilo polar y cargado negativamente, tales como aspartato (D) o glutamato (E), o un aminoácido hidrófilo aromático, polar y cargado positivamente, tales como histidina (H)) o un aminoácido hidrófobo (por ejemplo, un aminoácido hidrófobo alifático tales como glicina (G), alanina (A), leucina (L), isoleucina (I), metionina (M) o valina (V), un aminoácido hidrófobo, aromático, tales como fenilalanina (F), triptófano (W) o tirosina (Y) o un aminoácido no clásico (por ejemplo, selenocisteína, pirrolisina, N-formilmetionina β -alanina, GABA y ácido δ -aminolevulínico. Ácido 4-aminobenzoico (PABA), D-isómeros de los aminoácidos comunes, ácido 2,4-diaminobutírico, ácido α -aminoisobutírico, ácido 4-aminobutírico, Abu, ácido 2-aminobutírico, γ -Abu, ϵ -Ahx, ácido 6-aminohexanoico, Aib, ácido 2-aminoisobutírico, ácido 3-aminopropiónico, ornitina, norleucina, norvalina, hidroxiprolina, sarcosme, citrulina, homocitrulina, ácido cisteico, t-butilglicina, t-butilalanina, fenilglicina, ciclohexilalanina, β -alanina, fluoroaminoácidos, aminoácidos diseñados tales como β -metilaminoácidos, C α -metilaminoácidos, N α -metilaminoácidos y análogos de aminoácidos en general). En algunas realizaciones, La SEQ ID NO: 1 puede tener una Met y/o Thr precediendo al primer resto de la secuencia. Estos residuos pueden estar mutados de manera similar como anteriormente.

- 35 Los mutantes ilustrativos incluyen:

Mutaciones relativas a P1A (basándose en la clasificación de Ambler)	Nombre
Tipo silvestre	RS310 (o P1A)
D276N	IS118 (o P3A)
I72S	IS222
T160F	IS203
R244T	IS217
R244T D276K	IS215
Q135M	IS197
G156R A238T	IS235
F33Y D276N	IS158
F33Y S240P D276N	IS230 (o IS181)
F33Y A238T D276N	IS232 (o IS180)
I72S Q135M T160F (mutantes del Bloque 1)	IS227
A232G A237S A238G S240D (mutantes del Bloque 2)	IS191
A232G A237S A238G S240D R244T	IS229

(continuación)

Mutaciones relativas a P1A (basándose en la clasificación de Ambler)	Nombre
A232G A237S A238G S240D D276R	IS219
A232G A237S A238G S240D D276K	IS221
A232G A237S A238G S240D Q135M	IS224
A238T	IS233
T243I S266N D276N	IS234 (o IS176)
A232G A237S A238G S240D D276N	IS288 (o P4A)

En todos estos mutantes, la numeración de los restos corresponde a la SEQ ID NO: 1. Estos números de restos pueden convertirse en números de Ambler (Ambler y col., 1991, A standard numbering scheme for the Class A β -lactamases, Biochem. J. 276:269-272) mediante el uso de cualquier procedimiento bioinformático convencional, por ejemplo usando BLAST (por sus siglas en inglés, Basic Local Alignment Search Tools) o FASTA (FAST-All).

En diversas realizaciones, la betalactamasa usada en la invención se produce en células bacterianas tales como una célula de *E. coli* (véase, por ejemplo, el documento PCT/US15/47187).

Perfil de lanzamiento modificado

En un aspecto, la presente invención proporciona formulaciones de liberación modificada que comprenden al menos una betalactamasa, en las que la formulación libera una cantidad sustancial de la betalactamasa en una o más regiones del tracto GI. En algunas realizaciones, la betalactamasa es P3A, o los otros agentes de betalactamasa descritos en el presente documento, y variantes de los mismos (por ejemplo, como se describió anteriormente). Por ejemplo, la formulación puede liberar al menos aproximadamente el 60 % de la betalactamasa, por ejemplo, P3A, después del estómago y en una o más regiones del tracto GI.

En diversas realizaciones, Las formulaciones de liberación modificada de la presente invención están diseñadas para liberación inmediata (por ejemplo, tras la ingestión). En diversas realizaciones, las formulaciones de liberación modificada pueden tener perfiles de liberación sostenida, es decir, liberación lenta del principio o principios activos en el cuerpo (por ejemplo, el tracto GI) durante un período prolongado de tiempo. En diversas realizaciones, las formulaciones de liberación modificada pueden tener un perfil de liberación retardada, es decir, no liberar inmediatamente el principio o principios activos tras la ingestión; en su lugar, el aplazamiento de la liberación del principio o principios activos hasta que la composición sea más baja en el tracto gastrointestinal; por ejemplo, para la liberación en el intestino delgado (por ejemplo, uno o más de duodeno, yeyuno, íleon) o el intestino grueso (por ejemplo, uno o más de ciego, porciones ascendente, transversa, descendente o sigmoidea del colon, y recto). Por ejemplo, una composición puede tener un recubrimiento entérico para retrasar la liberación del principio o principios activos hasta que llegue al intestino delgado o al intestino grueso. En algunas realizaciones, no hay una cantidad sustancial del principio o principios activos de las presentes formulaciones en las heces.

En diversas realizaciones, la formulación de liberación modificada de la presente invención libera al menos el 60 % de la betalactamasa (por ejemplo, P3A, o los otros agentes de betalactamasa descritos en el presente documento y variantes de los mismos) después del estómago en una o más regiones del intestino. Por ejemplo, la formulación de liberación modificada libera al menos el 60 %, al menos el 61 %, al menos el 62 %, al menos el 63 %, al menos el 64 %, al menos el 65 %, al menos el 66 %, al menos el 67 %, al menos el 68 %, al menos el 69 %, al menos el 70 %, al menos el 71 %, al menos el 72 %, al menos el 73 %, al menos el 74 %, al menos el 75 %, al menos el 76 %, al menos el 77 %, al menos el 78 %, al menos el 79 %, al menos el 80 %, al menos el 81 %, al menos el 82 %, al menos el 83 %, al menos el 84 %, al menos el 85 %, al menos el 86 %, al menos el 87 %, al menos el 88 %, al menos el 89 %, al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 % o el 100 % de la betalactamasa (por ejemplo, P3A, o los otros agentes de betalactamasa descritos en el presente documento y variantes de los mismos) en el intestino.

En diversas realizaciones, la formulación de liberación modificada de la presente invención libera al menos el 60 % de la betalactamasa (por ejemplo, P3A, o los otros agentes de betalactamasa descritos en el presente documento y variantes de los mismos) en el intestino delgado. Por ejemplo, la formulación de liberación modificada libera al menos el 60 %, al menos el 61 %, al menos el 62 %, al menos el 63 %, al menos el 64 %, al menos el 65 %, al menos el 66 %, al menos el 67 %, al menos el 68 %, al menos el 69 %, al menos el 70 %, al menos el 71 %, al menos el 72 %, al menos el 73 %, al menos el 74 %, al menos el 75 %, al menos el 76 %, al menos el 77 %, al menos el 78 %, al menos el 79 %, al menos el 80 %, al menos el 81 %, al menos el 82 %, al menos el 83 %, al menos el 84 %, al menos el 85 %, al menos el 86 %, al menos el 87 %, al menos el 88 %, al menos el 89 %, al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 % o el 100 % de la betalactamasa (por ejemplo, P3A, o los otros agentes de betalactamasa descritos en el presente documento y variantes de los mismos) en el intestino delgado.

En una realización, la formulación de liberación modificada de la presente invención libera al menos el 60 % de la

menos el 84 %, al menos el 85 %, al menos el 86 %, al menos el 87 %, al menos el 88 %, al menos el 89 %, al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 % o el 100 % de la betalactamasa (por ejemplo, P3A, o los otros agentes de betalactamasa descritos en el presente documento y variantes de los mismos) en el colon ascendente.

En una realización, la formulación de liberación modificada de la presente invención libera al menos el 60 % de la betalactamasa (por ejemplo, P3A, o los otros agentes de betalactamasa descritos en el presente documento y variantes de los mismos) en el colon transversal. Por ejemplo, la formulación de liberación modificada libera al menos el 60 %, al menos el 61 %, al menos el 62 %, al menos el 63 %, al menos el 64 %, al menos el 65 %, al menos el 66 %, al menos el 67 %, al menos el 68 %, al menos el 69 %, al menos el 70 %, al menos el 71 %, al menos el 72 %, al menos el 73 %, al menos el 74 %, al menos el 75 %, al menos el 76 %, al menos el 77 %, al menos el 78 %, al menos el 79 %, al menos el 80 %, al menos el 81 %, al menos el 82 %, al menos el 83 %, al menos el 84 %, al menos el 85 %, al menos el 86 %, al menos el 87 %, al menos el 88 %, al menos el 89 %, al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 % o el 100 % de la betalactamasa (por ejemplo, P3A, o los otros agentes de betalactamasa descritos en el presente documento y variantes de los mismos) en el colon transversal.

En una realización, la formulación de liberación modificada de la presente invención libera al menos el 60 % de la betalactamasa (por ejemplo, P3A, o los otros agentes de betalactamasa descritos en el presente documento y variantes de los mismos) en el colon descendente. Por ejemplo, la formulación de liberación modificada libera al menos el 60 %, al menos el 61 %, al menos el 62 %, al menos el 63 %, al menos el 64 %, al menos el 65 %, al menos el 66 %, al menos el 67 %, al menos el 68 %, al menos el 69 %, al menos el 70 %, al menos el 71 %, al menos el 72 %, al menos el 73 %, al menos el 74 %, al menos el 75 %, al menos el 76 %, al menos el 77 %, al menos el 78 %, al menos el 79 %, al menos el 80 %, al menos el 81 %, al menos el 82 %, al menos el 83 %, al menos el 84 %, al menos el 85 %, al menos el 86 %, al menos el 87 %, al menos el 88 %, al menos el 89 %, al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 % o el 100 % de la betalactamasa (por ejemplo, P3A, o los otros agentes de betalactamasa descritos en el presente documento y variantes de los mismos) en el colon descendente.

En una realización, la formulación de liberación modificada de la presente invención libera al menos el 60 % de la betalactamasa (por ejemplo, P3A, o los otros agentes de betalactamasa descritos en el presente documento y variantes de los mismos) en el colon sigmoide. Por ejemplo, la formulación de liberación modificada libera al menos el 60 %, al menos el 61 %, al menos el 62 %, al menos el 63 %, al menos el 64 %, al menos el 65 %, al menos el 66 %, al menos el 67 %, al menos el 68 %, al menos el 69 %, al menos el 70 %, al menos el 71 %, al menos el 72 %, al menos el 73 %, al menos el 74 %, al menos el 75 %, al menos el 76 %, al menos el 77 %, al menos el 78 %, al menos el 79 %, al menos el 80 %, al menos el 81 %, al menos el 82 %, al menos el 83 %, al menos el 84 %, al menos el 85 %, al menos el 86 %, al menos el 87 %, al menos el 88 %, al menos el 89 %, al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 % o el 100 % de la betalactamasa (por ejemplo, P3A, o los otros agentes de betalactamasa descritos en el presente documento y variantes de los mismos) en el colon sigmoide.

En diversas realizaciones, la formulación de liberación modificada no libera sustancialmente la betalactamasa (por ejemplo, P3A u otros agentes de betalactamasa descritos en el presente documento y variantes de los mismos) en el estómago.

En determinadas realizaciones, la formulación de liberación modificada libera la betalactamasa (por ejemplo, P3A u otros agentes de betalactamasa descritos en el presente documento y variantes de los mismos) a un pH específico. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la formulación de liberación modificada es sustancialmente estable en un entorno ácido y sustancialmente inestable (por ejemplo, se disuelve rápidamente o es físicamente inestable) en un entorno casi neutro a alcalino. En algunas realizaciones, la estabilidad es indicativa de no liberar sustancialmente mientras que la inestabilidad es indicativa de liberar sustancialmente. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la formulación de liberación modificada es sustancialmente estable a un pH de aproximadamente 7,0 o menos, o aproximadamente 6,5 o menos, o aproximadamente 6,0 o menos, o aproximadamente 5,5 o menos, o aproximadamente 5,0 o menos, o aproximadamente 4,5 o menos, o aproximadamente 4,0 o menos, o aproximadamente 3,5 o menos, o aproximadamente 3,0 o menos, o aproximadamente 2,5 o menos, o aproximadamente 2,0 o menos, o aproximadamente 1,5 o menos, o aproximadamente 1,0 o menos. En algunas realizaciones, las formulaciones actuales son estables en áreas de pH más bajo y por lo tanto no se liberan sustancialmente en, por ejemplo, el estómago. En algunas realizaciones, la formulación de liberación modificada es sustancialmente estable a un pH de aproximadamente 1 a aproximadamente 4 o menor y sustancialmente inestable a valores de pH que son mayores. En estas realizaciones, la formulación de liberación modificada no se libera sustancialmente en el estómago. En estas realizaciones, la formulación de liberación modificada se libera sustancialmente en el intestino delgado (por ejemplo, uno o más del duodeno, yeyuno e íleon) y/o el intestino grueso (por ejemplo, uno o más del ciego, colon ascendente, colon transversal, colon descendente y colon sigmoide). En algunas realizaciones, la formulación de liberación modificada es sustancialmente estable a un pH de aproximadamente 4 a aproximadamente 5 o inferior y, en consecuencia, es sustancialmente inestable a valores de

pH que son mayores y, por lo tanto, no se libera sustancialmente en el estómago y/o el intestino delgado (por ejemplo, uno o más del duodeno, yeyuno e íleon). En estas realizaciones, la formulación de liberación modificada se libera sustancialmente en el intestino grueso (por ejemplo, uno o más del ciego, colon ascendente, colon transversal, colon descendente y colon sigmoide). En diversas realizaciones, los valores de pH que se mencionan en el presente documento pueden ajustarse como se conoce en la técnica para tener en cuenta el estado del sujeto, por ejemplo, ya sea en ayunas o en estado posprandial.

En algunas realizaciones, la formulación de liberación modificada es sustancialmente estable en fluido gástrico y sustancialmente inestable en fluido intestinal y, por consiguiente, se libera sustancialmente en el intestino delgado (por ejemplo, uno o más del duodeno, yeyuno e íleon) y/o el intestino grueso (por ejemplo, uno o más del ciego, colon ascendente, colon transversal, colon descendente y colon sigmoide).

En algunas realizaciones, la formulación de liberación modificada es estable en fluido gástrico o estable en ambientes ácidos. Estas formulaciones de liberación modificada liberan aproximadamente el 30 % o menos en peso de la betalactamasa (por ejemplo P3A o los otros agentes de betalactamasa descritos en el presente documento y variantes de los mismos) y/o agente terapéutico adicional en la formulación de liberación modificada en el fluido gástrico con un pH de aproximadamente 4 a aproximadamente 5 o menos, o fluido gástrico simulado con un pH de aproximadamente 4 a aproximadamente 5 o menos, en aproximadamente 15, o aproximadamente 30, o aproximadamente 45, o aproximadamente 60, o aproximadamente 90 minutos. Las formulaciones de liberación modificada de la invención pueden liberar de aproximadamente el 0 % a aproximadamente el 30 %, de aproximadamente el 0 % a aproximadamente el 25 %, de aproximadamente el 0 % a aproximadamente el 20 %, de aproximadamente el 0 % a aproximadamente el 15 %, de aproximadamente el 0 % a aproximadamente el 10 %, de aproximadamente el 5 % a aproximadamente el 30 %, de aproximadamente el 5 % a aproximadamente el 25 %, de aproximadamente el 5 % a aproximadamente el 20 %, de aproximadamente el 5 % a aproximadamente el 15 %, de aproximadamente el 5 % a aproximadamente el 10 % en peso de la betalactamasa (por ejemplo, P3A o los otros agentes de betalactamasa descritos en el presente documento y variantes de los mismos) y/o agente terapéutico adicional en la formulación de liberación modificada en fluido gástrico con un pH de 4-5, o menos o fluido gástrico simulado con un pH de 4-5 o menos, en aproximadamente 15, o aproximadamente 30, o aproximadamente 45, o aproximadamente 60, o aproximadamente 90 minutos. Las formulaciones de liberación modificada de la invención pueden liberar aproximadamente el 1 %, aproximadamente el 2 %, aproximadamente el 3 %, aproximadamente el 4 %, aproximadamente el 5 %, aproximadamente el 6 %, aproximadamente el 7 %, aproximadamente el 8 %, aproximadamente el 9 % o aproximadamente el 10 % en peso de la betalactamasa (por ejemplo, P3A o los otros agentes de betalactamasa descritos en el presente documento y variantes de los mismos) y/o agente terapéutico adicional en la formulación de liberación modificada en fluido gástrico con un pH de 5 o menos, o fluido gástrico simulado con un pH de 5 o menos, en aproximadamente 15, o aproximadamente 30, o aproximadamente 45, o aproximadamente 60, o aproximadamente 90 minutos.

En algunas realizaciones, la formulación de liberación modificada es inestable en el fluido intestinal. Estas formulaciones de liberación modificada liberan aproximadamente el 70 % o más en peso de la betalactamasa (por ejemplo, P3A o los otros agentes de betalactamasa descritos en el presente documento y variantes de los mismos) y/o agente terapéutico adicional en la formulación de liberación modificada en el fluido intestinal o fluido intestinal simulado en aproximadamente 15, o aproximadamente 30, o aproximadamente 45, o aproximadamente 60, o aproximadamente 90 minutos. En algunas realizaciones, la formulación de liberación modificada es inestable en ambientes casi neutros a alcalinos. Estas formulaciones de liberación modificada liberan aproximadamente el 70 % o más en peso de la betalactamasa (por ejemplo P3A o los otros agentes de betalactamasa descritos en el presente documento y variantes de los mismos) y/o agente terapéutico adicional en la formulación de liberación modificada en el fluido intestinal con un pH de aproximadamente 4-5 o mayor, o fluido intestinal simulado con un pH de aproximadamente 4-5 o mayor, en aproximadamente 15, o aproximadamente 30, o aproximadamente 45, o aproximadamente 60, o aproximadamente 90 minutos. Una formulación de liberación modificada que es inestable en ambientes casi neutros o alcalinos puede liberar el 70 % o más en peso de betalactamasa (por ejemplo, P3A o los otros agentes de betalactamasa descritos en el presente documento y variantes de los mismos) y/o agente terapéutico adicional en la formulación de liberación modificada en un fluido que tiene un pH mayor de aproximadamente 5 (por ejemplo, un fluido que tiene un pH de aproximadamente 5 a aproximadamente 14, de aproximadamente 6 a aproximadamente 14, de aproximadamente 7 a aproximadamente 14, de aproximadamente 8 a aproximadamente 14, de aproximadamente 9 a aproximadamente 14, de aproximadamente 10 a aproximadamente 14, o de aproximadamente 11 a aproximadamente 14) en aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 90 minutos, o de aproximadamente 10 minutos a aproximadamente 90 minutos, o de aproximadamente 15 minutos a aproximadamente 90 minutos, o de aproximadamente 20 minutos a aproximadamente 90 minutos, o de aproximadamente 25 minutos a aproximadamente 90 minutos, o de aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 90 minutos, o de aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 60 minutos, o de aproximadamente 10 minutos a aproximadamente 60 minutos, o de aproximadamente 15 minutos a aproximadamente 60 minutos, o de aproximadamente 20 minutos a aproximadamente 60 minutos, o de aproximadamente 25 minutos a aproximadamente 90 minutos, o de aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 60 minutos.

Los ejemplos de fluido gástrico simulado y fluido intestinal simulado incluyen, pero no se limitan a, aquellos desvelados en la 2005 Pharmacopeia 23NF/28USP en Test Solutions en la página 2858 y/u otros fluidos gástricos

simulados y fluidos intestinales simulados conocidos por aquellos expertos en la materia, por ejemplo, fluido gástrico simulado y/o fluido intestinal preparado sin enzimas.

En una realización, la formulación de liberación modificada puede permanecer esencialmente intacta o puede ser esencialmente insoluble, en fluido gástrico. La formulación de liberación modificada puede incluir uno o más recubrimientos de liberación retardada que son dependientes del pH. Los recubrimientos de liberación retardada que son dependientes del pH serán sustancialmente estables en entornos ácidos (pH de aproximadamente 5 o menos) y sustancialmente inestables en entornos casi neutros a alcalinos (pH mayor de aproximadamente 5). Por ejemplo, el recubrimiento de liberación retardada puede desintegrarse o disolverse esencialmente en entornos casi neutros a alcalinos tales como los que se encuentran en el intestino delgado (por ejemplo, uno o más del duodeno, yeyuno e íleon) y/o el intestino grueso (por ejemplo, uno o más del ciego, colon ascendente, colon transversal, colon descendente y colon sigmoide).

Como alternativa, la estabilidad de la formulación de liberación modificada puede ser dependiente de enzimas. En tales realizaciones, la formulación de liberación modificada puede incluir uno o más recubrimientos de liberación retardada que son dependientes de enzimas. El recubrimiento de liberación retardada dependiente de enzimas será sustancialmente estable en fluido que no contiene una enzima particular y sustancialmente inestable en fluido que contiene la enzima. El recubrimiento de liberación retardada se desintegrará o disolverá esencialmente en un fluido que contenga la enzima apropiada. Puede lograrse un control dependiente de la enzima, por ejemplo, mediante el uso de materiales que liberan el principio activo solo en la exposición a enzimas en el intestino, tales como los galacto-mananos. También, la estabilidad de la formulación de liberación modificada puede depender de la estabilidad enzimática en presencia de una enzima microbiana presente en la flora intestinal.

En diversas realizaciones, las formulaciones de liberación modificada que comprenden una betalactamasa (por ejemplo, P3A o variantes de la misma) son sustancialmente estables en quimo. Por ejemplo, hay, en algunas realizaciones, una pérdida de menos de aproximadamente el 50 % o aproximadamente el 40 %, o aproximadamente el 30 %, o aproximadamente el 20 %, o aproximadamente el 10 % de la actividad betalactamasa en aproximadamente 10, o 9, u 8, o 7, o 6, o 5, o 4, o 3, o 2, o 1 horas desde la administración.

En algunas realizaciones, se proporciona una formulación de doble pulso. En diversas realizaciones, la presente invención proporciona formulaciones de liberación modificada que liberan dosis múltiples de la betalactamasa (por ejemplo, P3A o los otros agentes de betalactamasa descritos en el presente documento y variantes de los mismos), en diferentes lugares a lo largo de los intestinos, en diferentes momentos y/o a diferentes pH. En una realización ilustrativa, la formulación de liberación modificada comprende una primera dosis de la betalactamasa y una segunda dosis de la betalactamasa, en la que la primera dosis y la segunda dosis se liberan en diferentes lugares a lo largo de los intestinos, en diferentes momentos y/o a diferentes pH. Por ejemplo, la primera dosis se libera en el duodeno y la segunda dosis se libera en el íleon. En otro ejemplo, la primera dosis se libera en el yeyuno y la segunda dosis se libera en el íleon. En otras realizaciones, la primera dosis se libera en un lugar a lo largo del intestino delgado (por ejemplo, el duodeno), mientras que la segunda dosis se libera a lo largo del intestino grueso (por ejemplo, el colon ascendente). En diversas realizaciones, la formulación de liberación modificada puede liberar al menos una dosis, al menos dos dosis, al menos tres dosis, al menos cuatro dosis, al menos cinco dosis, al menos seis dosis, al menos siete dosis o al menos ocho dosis de la betalactamasa (por ejemplo, P3A o los otros agentes de betalactamasa descritos en el presente documento y variantes de los mismos) en diferentes lugares a lo largo de los intestinos, en diferentes momentos y/o a diferentes pH. Además, la descripción de doble pulso en el presente documento se aplica a las formulaciones de liberación modificada que liberan una betalactamasa (por ejemplo, P3A o los otros agentes de betalactamasa descritos en el presente documento y variantes de los mismos) y un agente terapéutico adicional.

Formulación de liberación modificada y formas de dosificación

La formulación de liberación modificada de betalactamasa (por ejemplo, P3A o los otros agentes de betalactamasa descritos en el presente documento y variantes de los mismos) comprende además un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

Cualquier formulación de liberación modificada que incluya betalactamasa (y/o agentes terapéuticos adicionales) como se describe en el presente documento puede administrarse por vía oral.

Las formas de dosificación adecuadas para uso oral incluyen, por ejemplo, formas de dosificación sólidas tales como comprimidos, polvos dispersables, gránulos y cápsulas. En una realización, la formulación de liberación modificada está en forma de una cápsula. En otra realización, la formulación de liberación modificada está en forma de un comprimido. En otra realización más, la formulación de liberación modificada está en forma de una cápsula de gel blanda. En una realización adicional, la formulación de liberación modificada está en forma de una cápsula de gelatina o hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC).

En algunas formas de dosificación, los agentes descritos en el presente documento se mezclan con al menos un excipiente o vehículo inerte, farmacéuticamente aceptable tales como citrato sódico, fosfato dicálcico, etc., y/o a) cargas o extensores tales como almidones, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol, ácido silícico, celulosa microcristalina y azúcar especial de panadería, etc., b) aglutinantes tales como, por ejemplo, carboximetilcelulosa,

alginatos, gelatina, polivinilpirrolidona, sacarosa, goma arábica, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona, metilcelulosa, hidroxipropilcelulosa (HPC) e hidroximetilcelulosa, etc., c) humectantes tales como glicerol, etc., d) agentes disgregantes tales como agar-agar, carbonato cálcico, almidón de patata o tapioca, ácido alginico, ciertos silicatos, carbonato sódico, polímeros reticulados tales como crospovidona (polivinilpirrolidona reticulada), croscarmelosa sódica (carboximetilcelulosa sódica reticulada), glicolato de almidón sódico, etc., e) agentes retardadores de la solución tales como parafina, etc., f) aceleradores de absorción tales como compuestos de amonio cuaternario, etc., g) agentes humectantes tales como, por ejemplo, alcohol cetílico y monoestearato de glicerol, etc., h) absorbentes tales como caolín y arcilla de bentonita, etc., e i) lubricantes tales como talco, estearato de calcio, estearato de magnesio, polietilenglicoles sólidos, laurilsulfato sódico, behenato de glicerilo, etc. y mezclas de tales excipientes. Un experto en la materia reconocerá que determinados excipientes pueden tener dos o más funciones en la forma de dosificación oral. En el caso de una forma de dosificación oral, por ejemplo, una cápsula o un comprimido, la forma de dosificación también puede comprender agentes tamponantes.

La formulación de liberación modificada puede incluir adicionalmente un agente tensioactivo. Los agentes tensioactivos adecuados para su uso en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, cualquier tensioactivo farmacéuticamente aceptable, no tóxico. Las clases de tensioactivos adecuados para su uso en las composiciones de la invención incluyen, pero no se limitan a ácidos grasos polietoxilados, diésteres de ácido graso PEG, mezclas de mono y diésteres de ácido graso PEG, ésteres de ácidos grasos de polietilenglicol glicerol, productos de transesterificación de alcohol y aceite, ácidos grasos poliglicerizados, ésteres de ácido graso de propilenglicol, mezclas de ésteres de propilenglicol-ésteres de glicerol, mono- y diglicéridos, esteroles y derivados de esteroles, ésteres de polietilenglicol sorbitán ácido graso, ésteres de polietilenglicol alquilo, ésteres de azúcar, polietilenglicol alquil fenoles, copolímeros en bloque de polioxietileno-olioxipropileno, ésteres de ácidos grasos de sorbitán, ésteres de ácidos grasos con bajo contenido de alcohol, tensioactivos iónicos y mezclas de los mismos. En algunas realizaciones, las composiciones de la invención pueden comprender uno o más tensioactivos que incluyen, pero no limitados a, laurilsulfato sódico, polisorbato 20, polisorbato 40, polisorbato 60, polisorbato 80 y citrato de trietilo.

La formulación de liberación modificada también puede contener plastificantes farmacéuticamente aceptables para obtener las propiedades mecánicas deseadas, tales como flexibilidad y dureza. Tales plastificantes incluyen, pero no se limitan a, triacetina, ésteres de ácido cítrico, citrato de trietilo, ésteres de ácido ftálico, sebacato de dibutilo, alcohol cetílico, polietilenglicoles, polisorbatos u otros plastificantes.

La formulación de liberación modificada también puede incluir uno o más disolventes de aplicación. Algunos de los disolventes más comunes que pueden usarse para aplicar, por ejemplo, una composición de recubrimiento de liberación retardada incluye alcohol isopropílico, acetona, cloruro de metileno y similares.

La formulación de liberación modificada también puede incluir uno o más materiales alcalinos. El material alcalino adecuado para su uso en composiciones de la invención incluye, pero no se limita a, sales de sodio, potasio, calcio, magnesio y aluminio de ácidos tales como ácido fosfórico, ácido carbónico, ácido cítrico y otros compuestos de aluminio/magnesio. Además, el material alcalino puede seleccionarse de materiales antiácidos tales como hidróxidos de aluminio, hidróxidos de calcio, hidróxidos de magnesio y óxido de magnesio.

Las formas de dosificación oral sólidas pueden prepararse mediante, por ejemplo, granulación (por ejemplo, granulación húmeda o seca) de los agentes de la invención con uno o más excipientes adecuados. Como alternativa, los agentes de la invención pueden colocarse en capas sobre un núcleo inerte (por ejemplo, una esfera sin par/azúcar tales como una esfera de sacarosa o una esfera de sílice) usando procedimientos convencionales tales como revestimiento de lecho fluidizado o revestimiento de sartén o extruidos y esferonizados usando procedimientos conocidos en la técnica, en gránulos que contienen compuestos activos. En una realización, la betalactamasa (por ejemplo, P3A o los otros agentes de betalactamasa descritos en el presente documento y variantes de los mismos) se reviste por pulverización sobre una esfera de sacarosa. Dichos gránulos pueden incorporarse en comprimidos o cápsulas usando procedimientos convencionales.

Las suspensiones, además de los principios activos, pueden contener agentes de suspensión tales como, por ejemplo, alcoholes isoestearílicos etoxilados, polioxietileno sorbitol y ésteres de sorbitán, celulosa microcristalina, metahidróxido de aluminio, bentonita, agar-agar, tragacanto, etc. y mezclas de los mismos.

Además de los diluyentes inertes, las composiciones orales también pueden incluir adyuvantes tales como agentes edulcorantes, aromatizantes y perfumantes.

Las formulaciones que comprenden la betalactamasa (y/o agentes terapéuticos adicionales) pueden presentarse convenientemente en formas de dosificación unitarias y pueden prepararse mediante cualquiera de los procedimientos bien conocidos en la técnica de la farmacia. Tales procedimientos generalmente incluyen la etapa de asociar los agentes terapéuticos con un vehículo, que constituye uno o más ingredientes accesorios. Normalmente, las formulaciones se preparan mediante la asociación uniforme e íntima del agente terapéutico con un vehículo líquido, un vehículo finamente dividido, o ambos y, a continuación, si es necesario, conformar el producto en formas de dosificación de la formulación deseada (por ejemplo, granulación húmeda o seca, combinaciones en polvo, etc., seguido de la formación de comprimidos usando procedimientos convencionales conocidos en la técnica).

En diversas realizaciones, la formulación de liberación modificada de la presente invención puede utilizar uno o más recubrimientos de liberación modificada tales como recubrimientos de liberación retardada para proporcionar una administración eficaz, retardada aunque sustancial de la betalactamasa (por ejemplo, P3A o los otros agentes de betalactamasa descritos en el presente documento y variantes de los mismo) al tracto GI junto con, opcionalmente, otros agentes terapéuticos adicionales.

En una realización, el recubrimiento de liberación retardada incluye un agente entérico que es sustancialmente estable en ambientes ácidos y sustancialmente inestable en ambientes casi neutros a alcalinos. En una realización, el recubrimiento de liberación retardada contiene un agente entérico que es sustancialmente estable en el fluido gástrico. El agente entérico puede seleccionarse de, por ejemplo, soluciones o dispersiones de copolímeros de ácido metacrílico, ftalato acetato de celulosa, ftalato de hidroxilpropilmetilcelulosa, acetato ftalato de polivinilo, carboximetilcelulosa y polímero tipo EUDRAGIT® (poli(ácido metacrílico, metacrilato de metilo), succinato acetato de hidroxipropilmetilcelulosa, trimelitato de acetato de celulosa, goma laca u otros polímeros de recubrimiento entérico adecuados. Los polímeros de tipo EUDRAGIT® incluyen, por ejemplo, EUDRAGIT® FS 30D, L 30 D-55, L 100-55, L 100, L 12,5, L 12,5 P, RL 30 D, RL PO, RL 100, RL 12,5, RS 30 D, RS PO, RS 100, RS 12,5, NE 30 D, NE 40 D, NM 30 D, S 100, S 12,5 y S 12,5 P. Algunos polímeros similares incluyen Kollicoat® MAE 30 DP y Kollicoat® MAE 100 P. En algunas realizaciones, se usa uno o más de EUDRAGIT® FS 30D, L 30 D-55, L 100-55, L 100, L 12,5, L 12,5 P RL 30 D, RL PO, RL 100, RL 12,5, RS 30 D, RS PO, RS 100, RS 12,5, NE 30 D, NE 40 D, NM 30 D, S 100, S 12,5 S 12,5 P, Kollicoat® MAE 30 DP y Kollicoat® MAE 100 P. En diversas realizaciones, el agente entérico puede ser una combinación de las soluciones o dispersiones anteriores. En una realización, el recubrimiento de liberación retardada incluye el agente entérico EUDRAGIT® L 30 D-55.

En determinadas realizaciones, se usan uno o más aditivos del sistema de recubrimiento con el agente entérico. Por ejemplo, pueden usarse uno o más aditivos PlasACRYL™ como aditivo de recubrimiento de agente antiadherente. Los aditivos ejemplares de PlasACRYL™ incluyen, pero no se limitan a PlasACRYL™ HTP20 and PlasACRYL™ T20. En una realización, PlasACRYL™ HTP20 está formulado con recubrimientos EUDRAGIT® L 30 D-55. En otra realización, PlasACRYL™ T20 está formulado con recubrimientos EUDRAGIT® FS 30 D.

En otra realización, el recubrimiento de liberación retardada puede degradarse en función del tiempo cuando se encuentra en solución acuosa sin tener en cuenta el pH y/o la presencia de enzimas en la solución. Un recubrimiento tal puede comprender un polímero insoluble en agua. Su solubilidad en solución acuosa es, por lo tanto, independiente del pH. La expresión "independiente del pH" como se usa en el presente documento significa que la permeabilidad al agua del polímero y su capacidad para liberar ingredientes farmacéuticos no es una función del pH y/o solamente es muy ligeramente dependiente del pH. Tales recubrimientos pueden usarse para preparar, por ejemplo, formulaciones de liberación sostenida. Los polímeros insolubles en agua adecuados incluyen polímeros no tóxicos farmacéuticamente aceptables que son sustancialmente insolubles en medios acuosos, por ejemplo, agua, independiente del pH de la solución. Los polímeros adecuados incluyen, pero no se limitan a, éteres de celulosa, ésteres de celulosa o ésteres de éter de celulosa, es decir, un derivado de celulosa en el que algunos de los grupos hidroxilo en la estructura de celulosa están sustituidos con grupos alquilo y algunos están modificados con grupos alcanilo. Los ejemplos incluyen etilcelulosa, acetil celulosa, nitrocelulosa y similares. Otros ejemplos de polímeros insolubles incluyen, pero no se limitan a, laca y polímeros de éster acrílico y/o metacrílico, polímeros o copolímeros de acrilato o metacrilato que tienen un bajo contenido de amonio cuaternario o mezclas de los mismos y similares. Otros ejemplos de polímeros insolubles incluyen EUDRAGIT RS®, EUDRAGIT RL® y EUDRAGIT NE®. Los polímeros insolubles útiles en la presente invención incluyen ésteres de polivinilo, polivinil acetales, ésteres de ácido poliacrílico, copolímeros de butadieno estireno y similares. En una realización, la administración colónica se logra mediante el uso de un tapón de cera que se erosiona lentamente (por ejemplo, diversos PEGs, incluyendo por ejemplo, PEG6000).

En una realización adicional, el recubrimiento de liberación retardada puede degradarse por una enzima microbiana presente en la flora intestinal. En una realización, el recubrimiento de liberación retardada puede degradarse por una enzima microbiana presente en el intestino delgado. En otra realización, el recubrimiento de liberación retardada puede degradarse por una enzima microbiana presente en el intestino grueso.

En diversas realizaciones, la invención proporciona una formulación que comprende: una partícula central que tiene un recubrimiento base que comprende una o más betalactamasas (por ejemplo, P3A o los otros agentes betalactamasas descritos en el presente documento y variantes de los mismos) y un recubrimiento de liberación retardada dispuesto sobre la partícula central recubierta. El revestimiento de liberación retardada puede ser sustancialmente estable en entornos ácidos y/o fluido gástrico y/o sustancialmente inestable en entornos casi neutros a alcalinos o fluido intestinal, exponiendo de esta manera la partícula central recubierta al fluido intestinal. El recubrimiento base que comprende una o más betalactamasas puede comprender además uno o más agentes terapéuticos adicionales. Opcionalmente, puede aplicarse una pluralidad de recubrimientos base al núcleo, cada uno de las cuales puede contener una betalactamasa y/o un agente terapéutico adicional. En una realización, la partícula central incluye sacarosa. La formulación puede prepararse por procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, una betalactamasa (por ejemplo, P3A o los otros agentes de betalactamasa descritos en el presente documento y variantes de los mismos) pueden pulverizarse sobre un núcleo inerte (por ejemplo, un núcleo de sacarosa o una esfera de sacarosa) y secar por pulverización con una capa entérica (por ejemplo, Eudragit L30 D-55) para formar betalactamasa (por ejemplo, P3A o los otros agentes de betalactamasa descritos en el presente documento y

variantes de los mismos que contienen gránulos.

Opcionalmente, la partícula central puede comprender una o más betalactamasas (por ejemplo, P3A o los otros agentes de betalactamasa descritos en el presente documento y variantes de los mismos) y/o uno o más agentes terapéuticos adicionales. En una realización, una o más dosis de la betalactamasa pueden encapsularse en una partícula central, por ejemplo, en forma de una microesfera. Por ejemplo, la betalactamasa puede combinarse con un polímero (por ejemplo, látex) y después darse forma de un particulado, preparación enzimática microencapsulada, sin usar un núcleo de sacarosa. Las microesferas formadas de esta manera pueden cubrirse opcionalmente con un recubrimiento de liberación retardada.

Una diversidad de enfoques para generar partículas (tales como microesferas, agregados, otros) son conocidos que son susceptibles de la inclusión de enzimas. Normalmente implican al menos dos fases, una que contiene la enzima y otra que contiene un polímero que forma la estructura de las partículas. Las más comunes son la coacervación, en la que se hace que el polímero se separe de su fase solvente mediante la adición de un tercer componente, o emulsiones de fase múltiple, tales como emulsión de agua en aceite en agua (w/o/w) en la que la fase de agua interna contiene la proteína, la fase orgánica intermedia contiene el polímero y los estabilizantes externos de la fase acuosa que soportan la doble emulsión w/o/w hasta que los disolventes pueden retirarse para formar las microesferas. Como alternativa, la betalactamasa (por ejemplo, P3A o los otros agentes de betalactamasa descritos en el presente documento y variantes de los mismos) y excipientes estabilizantes (por ejemplo, trehalosa, manitol, Tween 80, alcohol polivinílico) se combinan y pulverizan a partir de una solución acuosa y se recogen. Las partículas se suspenden en un disolvente seco, orgánico inmiscible en agua que contiene polímero y compuestos modificadores de la liberación, y la suspensión se somete a ultrasonidos para dispersar las partículas. Un enfoque adicional usa fases acuosas pero no disolvente orgánico. Específicamente, la enzima, los componentes tamponantes, un látex polimérico y excipientes estabilizantes y modificadores de la liberación se disuelven/dispersan en agua. La dispersión acuosa se seca por pulverización, dando lugar a la coalescencia del látex e incorporación de la proteína y los excipientes en partículas del látex coalescente. Cuando los modificadores de liberación son insolubles en condiciones ácidas pero solubles a pH más altos (tales como ácido carboxílico) la liberación de la matriz se inhibe en el entorno gástrico.

En algunas realizaciones, antes de aplicar el recubrimiento de liberación retardada a la partícula núcleo recubierta, la partícula puede cubrirse opcionalmente con una o más capas de separación que comprenden excipientes farmacéuticos que incluyen compuestos alcalinos tales como, por ejemplo, compuestos tamponantes del pH. La capa de separación separa esencialmente la partícula núcleo recubierta del recubrimiento de liberación retardada.

La capa de separación puede aplicarse a la partícula de núcleo recubierta mediante procedimientos de recubrimiento o estratificación utilizados típicamente con equipos de recubrimiento tales como una bandeja de recubrimiento, un granulador de recubrimiento o en un aparato de lecho fluidizado usando agua y/o disolventes orgánicos para el procedimiento de recubrimiento. Como alternativa, la capa de separación puede aplicarse al material del núcleo usando una técnica de recubrimiento en polvo. Los materiales para separar capas son compuestos farmacéuticamente aceptables tales como, por ejemplo, azúcar, polietilenglicol, polivinilpirrolidona, alcohol polivinílico, acetato de polivinilo, hidroxipropilcelulosa, metilcelulosa, etilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica y otros, usados solos o en mezclas. Aditivos tales como plastificantes, colorantes, pigmentos, cargas, agentes antiadherentes y antiestáticos, tales como por ejemplo estearato de magnesio, dióxido de titanio, talco y otros aditivos también pueden incluirse en la capa de separación.

En algunas realizaciones, las partículas recubiertas con el recubrimiento de liberación retardada pueden cubrirse adicionalmente con una capa de sobrerrecubrimiento. La capa de sobrerrecubrimiento puede aplicarse como se describe para las otras composiciones de revestimiento. Los materiales de sobrerrecubrimiento son compuestos farmacéuticamente aceptables tales como azúcar, polietilenglicol, polivinilpirrolidona, alcohol polivinílico, acetato de polivinilo, hidroxipropilcelulosa, metilcelulosa, etilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica y otros, usados solos o en mezclas. Los materiales de recubrimiento pueden evitar la posible aglomeración de partículas recubiertas con el recubrimiento de liberación retardada, proteger el recubrimiento de liberación retardada contra grietas durante el procedimiento de compactación o mejorar el procedimiento de formación de comprimidos.

En diversas realizaciones, la formulación puede comprender una pluralidad de gránulos de liberación modificada. En una realización, la formulación está en forma de cápsulas que comprenden múltiples gránulos.

En algunas realizaciones, la formulación de liberación modificada es una cápsula llena con una pluralidad de gránulos que contienen betalactamasa (por ejemplo, P3A (o los otros agentes de betalactamasa descritos en el presente documento y variantes de los mismos) que contienen gránulos) de los cuales se libera la betalactamasa. En una realización, la cápsula es una cápsula de gelatina, tales como una cápsula de gelatina dura. En otra realización, la cápsula es una cápsula de hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC). Por ejemplo, la formulación puede estar en forma de cápsulas que comprenden múltiples gránulos. Por ejemplo, la formulación puede estar en forma de cápsulas tales como, por ejemplo, cápsulas de gelatina o hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) que comprenden múltiples gránulos con recubrimiento entérico que contienen betalactamasa (por ejemplo, P3A o los otros agentes de betalactamasa descritos en el presente documento y variantes de los mismos). En una realización tal, puede utilizarse una combinación de gránulos en la que cada gránulo está diseñado para liberarse en un punto de tiempo o

ubicación específico. En diversas realizaciones, los gránulos (por ejemplo, los gránulos con recubrimiento entérico) están diseñados para pasar a través del estómago sin cambios y luego liberar la betalactamasa (por ejemplo, P3A o los otros agentes de betalactamasa descritos en el presente documento y variantes de los mismos) en una o más regiones de los intestinos. En algunas realizaciones, los gránulos que contienen betalactamasa pueden tener un recubrimiento entérico para liberar la betalactamasa (por ejemplo, P3A o los otros agentes de betalactamasa descritos en el presente documento y variantes de los mismos) a diferentes valores de pH intestinal.

En diversas realizaciones, la formulación de la presente invención está en forma de una cápsula (por ejemplo, una cápsula de gelatina dura o HPMC) que comprende una pluralidad de gránulos que contienen betalactamasa con recubrimiento entérico. En tales realizaciones, cada gránulo individual comprende el 10-20 % en peso de betalactamasa (por ejemplo, P3A o los otros agentes de betalactamasa descritos en el presente documento y variantes de los mismos). Por ejemplo, la betalactamasa (por ejemplo P3A o los otros agentes de betalactamasa descritos en el presente documento y variantes de los mismos) pueden estar presentes en aproximadamente el 10 %, aproximadamente el 11 %, aproximadamente el 12 %, aproximadamente el 13 %, aproximadamente el 14 %, aproximadamente el 15 %, aproximadamente el 16 %, aproximadamente el 17 %, aproximadamente el 18 %, aproximadamente el 19 % o aproximadamente el 20 % en peso. Cada gránulo individual comprende el 20-30 % en peso de esfera de sacarosa, al cual la betalactamasa, por ejemplo, P3A o una variante, se rocía. Por ejemplo, la esfera de sacarosa puede estar presente en aproximadamente el 20 %, aproximadamente el 21 %, aproximadamente el 22 %, aproximadamente el 23 %, aproximadamente el 24 %, aproximadamente el 25 %, aproximadamente el 26 %, aproximadamente el 27 %, aproximadamente el 28 %, aproximadamente el 29 % o aproximadamente el 30 % en peso. Cada gránulo individual comprende el 30-40 % en peso de hidroxipropilcelulosa (HPC). Por ejemplo, la HPC puede estar presente en aproximadamente el 30 %, aproximadamente el 31 %, aproximadamente el 32 %, aproximadamente el 33 %, aproximadamente el 34 %, aproximadamente el 35 %, aproximadamente el 36 %, aproximadamente el 37 %, aproximadamente el 38 %, aproximadamente el 39 % o aproximadamente el 40 % en peso. Cada gránulo individual comprende aproximadamente el 15-25 % en peso de un polímero entérico (por ejemplo, EUDRAGIT L 30 D-55). Por ejemplo, el polímero entérico puede estar presente en aproximadamente el 15 %, aproximadamente el 16 %, aproximadamente el 17 %, aproximadamente el 18 %, aproximadamente el 19 %, aproximadamente el 20 %, aproximadamente el 21 %, aproximadamente el 22 %, aproximadamente el 23 %, aproximadamente el 24 % o aproximadamente el 25 % en peso. Cada gránulo individual comprende aproximadamente el 1,5-2,5 % en peso de citrato de trietilo. Por ejemplo, el citrato de trietilo puede estar presente en aproximadamente el 1,5 %, aproximadamente el 1,6 %, aproximadamente el 1,7 %, aproximadamente el 1,8 %, aproximadamente el 1,9 %, aproximadamente el 2 %, aproximadamente el 2,1 %, aproximadamente el 2,2 %, aproximadamente el 2,3 %, aproximadamente el 2,4 %, aproximadamente el 2,5 % en peso. Cada gránulo individual comprende aproximadamente el 0,5-1,5 % en peso de monoestearato de glicerilo. Por ejemplo, el monoestearato de glicerilo puede estar presente en aproximadamente el 0,5 %, aproximadamente el 0,6 %, aproximadamente el 0,7 %, aproximadamente el 0,8 %, aproximadamente el 0,9 %, aproximadamente el 1 %, aproximadamente el 1,1 %, aproximadamente el 1,2 %, aproximadamente el 1,3 %, aproximadamente el 1,4 % o aproximadamente el 1,5 % en peso. Cada gránulo individual comprende aproximadamente el 0,1-1,0 % en peso de polisorbato-80. Por ejemplo, el polisorbato 80 puede estar presente en aproximadamente el 0,1 %, aproximadamente el 0,2 %, aproximadamente el 0,3 %, aproximadamente el 0,4 %, aproximadamente el 0,5 %, aproximadamente el 0,6 %, aproximadamente el 0,7 %, aproximadamente el 0,8 %, aproximadamente el 0,9 % o aproximadamente el 1 % en peso. Cada gránulo individual comprende además aproximadamente el 1-2 % en peso de sales tamponantes. Por ejemplo, las sales tamponantes pueden estar presentes en aproximadamente el 1,1 %, aproximadamente el 1,2 %, aproximadamente el 1,3 %, aproximadamente el 1,4 %, aproximadamente el 1,5 %, aproximadamente el 1,6 %, aproximadamente el 1,7 %, aproximadamente el 1,8 %, aproximadamente el 1,9 % o aproximadamente el 2 % en peso. El peso como se describe en el presente documento se refiere al peso total de todos los componentes excluyendo el peso de la propia cápsula.

En algunas realizaciones, cada gránulo individual comprende aproximadamente el 16 % en peso de la betalactamasa (por ejemplo, P3A o los otros agentes de betalactamasa descritos en el presente documento y variantes de los mismos); aproximadamente el 23 % en peso de esfera de sacarosa; aproximadamente el 35 % en peso de hidroxipropilcelulosa (HPC); aproximadamente el 21 % en peso de un polímero entérico (por ejemplo, EUDRAGIT L 30 D-55); aproximadamente el 2 % en peso de citrato de trietilo; aproximadamente el 1 % en peso de monoestearato de glicerilo; aproximadamente el 0,5 % en peso de polisorbato-80; y aproximadamente el 2 % en peso de sales tamponantes. El peso como se describe en el presente documento se refiere al peso total de todos los componentes excluyendo el peso de la propia cápsula.

Por ejemplo, cada gránulo individual comprende aproximadamente el 15,8 % en peso de la betalactamasa (por ejemplo, P3A o los otros agentes de betalactamasa descritos en el presente documento y variantes de los mismos); aproximadamente el 23,3 % en peso de esfera de sacarosa; aproximadamente el 35 % en peso de hidroxipropilcelulosa (HPC); aproximadamente el 20,8 % en peso de un polímero entérico (por ejemplo, EUDRAGIT L 30 D-55); aproximadamente el 2,1 % en peso de citrato de trietilo; aproximadamente el 1,0 % en peso de monoestearato de glicerilo; aproximadamente el 0,4 % en peso de polisorbato-80; y aproximadamente el 1,6 % en peso de sales tamponantes. El peso como se describe en el presente documento se refiere al peso total de todos los componentes excluyendo el peso de la propia cápsula.

En diversas realizaciones, la formulación de la presente invención está en forma de una cápsula (por ejemplo, una

cápsula de gelatina dura o HPMC) que comprende aproximadamente 75 mg de la betalactamasa (por ejemplo, P3A o los otros agentes de betalactamasa descritos en el presente documento y variantes de los mismos). La cápsula incluye una pluralidad de gránulos que contienen betalactamasa con recubrimiento entérico.

- 5 En diversas realizaciones, la formulación de la presente invención está en forma de una cápsula (por ejemplo, una cápsula de gelatina dura o HPMC) que comprende aproximadamente 25 mg de la betalactamasa (por ejemplo, P3A o los otros agentes de betalactamasa descritos en el presente documento y variantes de los mismos). La cápsula incluye una pluralidad de gránulos que contienen betalactamasa con recubrimiento entérico.

- 10 La presente invención también proporciona formulaciones de liberación modificada que liberan múltiples dosis de las betalactamasas (por ejemplo, P3A o los otros agentes de betalactamasa descritos en el presente documento y variantes de los mismos) y/o agente terapéutico adicional a lo largo del tracto gastrointestinal. En tales realizaciones, el perfil general de liberación de dicha formulación puede ajustarse utilizando, por ejemplo, múltiples tipos de partículas o múltiples capas. En una realización, la primera dosis de la betalactamasa puede formularse para su liberación en, por ejemplo, el intestino delgado (por ejemplo, uno o más de duodeno, yeyuno, íleon) o el intestino grueso (por ejemplo, uno o más de ciego, porciones ascendente, transversa, descendente o sigmoidea del colon, y recto), mientras que la segunda dosis está formulada para liberación retardada en, por ejemplo, una región diferente del intestino delgado (por ejemplo, uno o más del duodeno, yeyuno, íleon) o el intestino grueso (por ejemplo, uno o más de ciego, porciones ascendente, transversa, descendente o sigmoidea del colon, y recto). Como alternativa, se liberan dosis múltiples en diferentes lugares a lo largo del intestino. Por ejemplo, en una realización, la primera dosis de la betalactamasa puede formularse para su liberación en, por ejemplo, el intestino delgado (por ejemplo, uno o más de duodeno, yeyuno, íleon), mientras que la segunda dosis está formulada para liberación retardada en, por ejemplo, otra parte del intestino delgado (por ejemplo, uno o más del duodeno, yeyuno, íleon). En otra realización, la primera dosis de la betalactamasa puede formularse para su liberación en, por ejemplo, el intestino grueso (por ejemplo, uno o más de ciego, porciones ascendente, transversa, descendente o sigmoidea del colon, y recto), mientras que la segunda dosis está formulada para liberación retardada en, por ejemplo, otra parte del intestino grueso (por ejemplo, uno o más de ciego, porciones ascendente, transversa, descendente o sigmoidea del colon, y recto).

- 30 En diversas realizaciones, los agentes descritos en el presente documento pueden estar en forma de una sal farmacéuticamente aceptable, a saber, aquellas sales que son adecuadas para su uso en contacto con los tejidos de humanos y otros animales sin toxicidad indebida, irritación, respuesta alérgica y similares, y son proporcionales a una relación beneficio/riesgo razonable. Las sales farmacéuticamente aceptables son bien conocidas en la técnica. Las sales pueden prepararse *in situ* durante el aislamiento final y la purificación de los agentes terapéuticos, o por separado haciendo reaccionar la función de base libre con un ácido adecuado o una funcionalidad de ácido libre con un resto alcalino apropiado. Algunas sales de adición de ácido representativas incluyen acetato, adipato, alginato, ascorbato, aspartato, bencenosulfonato, benzoato, bisulfato, borato, butirato, alcanforato, alcanforsulfonato, citrato, ciclopentanopropionato, digluconato, dodecilsulfato, etanosulfonato, fumarato, glucoheptonato, glicerofosfato, hemisulfato, heptonato, hexanoato, bromhidrato, clorhidrato, yodhidrato, 2-hidroxietanosulfonato, lactobionato, lactato, laurato, lauril sulfato, malato, maleato, malonato, metanosulfonato, 2-naftalensulfonato, nicotinato, nitrato, oleato, oxalato, palmitato, pamoato, pectinato, persulfato, 3-fenilpropionato, fosfato, picrato, pivalato, propionato, estearato, succinato, sulfato, tartrato, tiocianato, toluenosulfonato, undecanoato, sales de valerato y similares. Las sales de metales alcalinos o alcalinotérreos representativas incluyen sodio, litio, potasio, calcio, magnesio y similares, así como amonio no tóxico, amonio cuaternario y cationes amina, incluyendo, pero no limitado a amonio, tetrametilamonio, tetraetilamonio, metilamina, dimetilamina, trimetilamina, trietilamina, etilamina y similares.

- 45 En diversas realizaciones, las formulaciones actuales proporcionan una serie de ventajas. Por ejemplo, los presentes inventores han formulado con éxito una proteína (es decir, betalactamasa), lo cual en sí mismo es un desafío. Esto se agrava aún más por el entorno del tracto GI en el que las presentes formulaciones liberan el fármaco en diversas realizaciones. Además, en diversas realizaciones, las presentes formulaciones proporcionan una liberación en el tracto GI que es lo suficientemente lenta como para permitir una buena cobertura protectora en el tracto GI de los efectos adversos de diversos antibióticos, por ejemplo, en el intestino delgado (un beneficio que se acentúa por un aumento en la semivida de la betalactamasa que es proporcional a una liberación más lenta). Adicionalmente, mediante el recubrimiento de la capa de sustancia farmacológica de los presentes gránulos con HPC, en oposición a EUDRAGIT, por ejemplo, las formulaciones actuales minimizan la cantidad de EUDRAGIT en las formulaciones y, por lo tanto, mitigan la posible toxicidad limitante de la dosis y las complicaciones de fabricación.

Administración y dosificación

- 55 Se apreciará que la dosis real de la betalactamasa (por ejemplo, P3A o los otros agentes de betalactamasa descritos en el presente documento y variantes de los mismos) que se administrarán de acuerdo con la presente invención variarán de acuerdo con, por ejemplo, la forma de dosificación particular y el modo de administración. Muchos factores que pueden modificar la acción de la betalactamasa (por ejemplo, el peso corporal, el género, la dieta, el tiempo de administración, la vía de administración, la tasa de excreción, la condición del sujeto, las combinaciones de fármacos, la disposición genética y las sensibilidades de reacción) pueden tenerse en cuenta por los expertos en la materia. La administración puede llevarse a cabo continuamente o en una o más dosis discretas dentro de la dosis máxima tolerada. Los expertos en la materia pueden determinar tasas de administración óptimas para un conjunto

dado de afecciones usando pruebas de administración de dosis convencionales.

Las dosis individuales de la betalactamasa (por ejemplo, P3A o los otros agentes de betalactamasa descritos en el presente documento y variantes de los mismos) pueden administrarse en formas de dosificación unitarias (por ejemplo, comprimidos o cápsulas) que contienen, por ejemplo, de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 1.000 mg, de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 950 mg, de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 900 mg, de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 850 mg, de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 800 mg, de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 750 mg, de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 700 mg, de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 650 mg, de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 600 mg, de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 550 mg, de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 500 mg, de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 450 mg, de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 400 mg, de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 350 mg, de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 300 mg, de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 250 mg, de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 200 mg, de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 150 mg, de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 100 mg, de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 90 mg, de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 80 mg, de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 70 mg, de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 60 mg, de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 50 mg, de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 40 mg de principio activo, de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 30 mg, de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 20 mg, de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 10 mg, de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 5 mg, de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 3 mg, de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 1 mg por forma de dosificación unitaria o de aproximadamente 5 mg a aproximadamente 80 mg por forma de dosificación unitaria. Por ejemplo, una forma de dosificación unitaria puede ser de aproximadamente 0,01 mg, aproximadamente 0,02 mg, aproximadamente 0,03 mg, aproximadamente 0,04 mg, aproximadamente 0,05 mg, aproximadamente 0,06 mg, aproximadamente 0,07 mg, aproximadamente 0,08 mg, aproximadamente 0,09 mg, aproximadamente 0,1 mg, aproximadamente 0,2 mg, aproximadamente 0,3 mg, aproximadamente 0,4 mg, aproximadamente 0,5 mg, aproximadamente 0,6 mg, aproximadamente 0,7 mg, aproximadamente 0,8 mg, aproximadamente 0,9 mg, aproximadamente 1 mg, aproximadamente 2 mg, aproximadamente 3 mg, aproximadamente 4 mg, aproximadamente 5 mg, aproximadamente 6 mg, aproximadamente 7 mg, aproximadamente 8 mg, aproximadamente 9 mg, aproximadamente 10 mg, aproximadamente 15 mg, aproximadamente 20 mg, aproximadamente 25 mg, aproximadamente 30 mg, aproximadamente 35 mg, aproximadamente 40 mg, aproximadamente 45 mg, aproximadamente 50 mg, aproximadamente 55 mg, aproximadamente 60 mg, aproximadamente 65 mg, aproximadamente 70 mg, aproximadamente 75 mg, aproximadamente 80 mg, aproximadamente 85 mg, aproximadamente 90 mg, aproximadamente 95 mg, aproximadamente 100 mg, aproximadamente 150 mg, aproximadamente 200 mg, aproximadamente 250 mg, aproximadamente 300 mg, aproximadamente 350 mg, aproximadamente 400 mg, aproximadamente 450 mg, aproximadamente 500 mg, aproximadamente 550 mg, aproximadamente 600 mg, aproximadamente 650 mg, aproximadamente 700 mg, aproximadamente 750 mg, aproximadamente 800 mg, aproximadamente 850 mg, aproximadamente 900 mg, aproximadamente 950 mg, o aproximadamente 1.000 mg, incluidos todos los valores e intervalos entre ellos. La dosis individual de la betalactamasa (por ejemplo, P3A o los otros agentes de betalactamasa descritos en el presente documento y variantes de los mismos) pueden administrarse en una forma de dosificación unitaria que contiene 25 mg de la betalactamasa. La dosis individual de la betalactamasa (por ejemplo, P3A o los otros agentes de betalactamasa descritos en el presente documento y variantes de los mismos) pueden administrarse en una forma de dosificación unitaria que contiene 50 mg de la betalactamasa. La dosis individual de la betalactamasa (por ejemplo, P3A o los otros agentes de betalactamasa descritos en el presente documento y variantes de los mismos) pueden administrarse en una forma de dosificación unitaria que contiene 75 mg de la betalactamasa.

La betalactamasa puede administrarse en una cantidad de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 100 mg al día, una cantidad de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 1.000 mg diarios de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 950 mg al día, de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 900 mg al día, de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 850 mg al día, de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 800 mg al día, de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 750 mg al día, de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 700 mg al día, de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 650 mg al día, de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 600 mg al día, de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 550 mg al día, de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 500 mg al día, de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 450 mg al día, de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 400 mg al día, de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 350 mg al día, de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 300 mg al día, de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 250 mg al día, de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 200 mg al día, de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 150 mg al día, de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 100 mg al día, de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 95 mg al día, de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 90 mg al día, de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 85 mg al día, de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 80 mg al día, de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 75 mg al día, de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 70 mg al día, de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 65 mg al día, de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 60 mg al día, de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 55 mg al día, de aproximadamente 0,1 mg a

aproximadamente 50 mg al día, de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 45 mg al día, de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 40 mg al día, de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 35 mg al día, de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 30 mg al día, de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 25 mg al día, de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 20 mg al día, de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 15 mg al día, de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 10 mg al día, de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 5 mg al día, de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 3 mg al día, de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 1 mg al día o de aproximadamente 5 mg a aproximadamente 80 mg al día.

La betalactamasa puede administrarse a una dosis diaria de aproximadamente 0,01 mg, aproximadamente 0,02 mg, aproximadamente 0,03 mg, aproximadamente 0,04 mg, aproximadamente 0,05 mg, aproximadamente 0,06 mg, aproximadamente 0,07 mg, aproximadamente 0,08 mg, aproximadamente 0,09 mg, aproximadamente 0,1 mg, aproximadamente 0,2 mg, aproximadamente 0,3 mg, aproximadamente 0,4 mg, aproximadamente 0,5 mg, aproximadamente 0,6 mg, aproximadamente 0,7 mg, aproximadamente 0,8 mg, aproximadamente 0,9 mg, aproximadamente 1 mg, aproximadamente 2 mg, aproximadamente 3 mg, aproximadamente 4 mg, aproximadamente 5 mg, aproximadamente 6 mg, aproximadamente 7 mg, aproximadamente 8 mg, aproximadamente 9 mg, aproximadamente 10 mg, aproximadamente 15 mg, aproximadamente 20 mg, aproximadamente 25 mg, aproximadamente 30 mg, aproximadamente 35 mg, aproximadamente 40 mg, aproximadamente 45 mg, aproximadamente 50 mg, aproximadamente 55 mg, aproximadamente 60 mg, aproximadamente 65 mg, aproximadamente 70 mg, aproximadamente 75 mg, aproximadamente 80 mg, aproximadamente 85 mg, aproximadamente 90 mg, aproximadamente 95 mg, aproximadamente 100 mg, aproximadamente 150 mg, aproximadamente 200 mg, aproximadamente 250 mg, aproximadamente 300 mg, aproximadamente 350 mg, aproximadamente 400 mg, aproximadamente 450 mg, aproximadamente 500 mg, aproximadamente 550 mg, aproximadamente 600 mg, aproximadamente 650 mg, aproximadamente 700 mg, aproximadamente 750 mg, aproximadamente 800 mg, aproximadamente 850 mg, aproximadamente 900 mg, aproximadamente 950 mg o aproximadamente 1.000 mg, incluyendo todos los valores e intervalos entre ellos.

Una dosificación adecuada de la betalactamasa (por ejemplo, P3A o los otros agentes de betalactamasa descritos en el presente documento y variantes de los mismos pueden estar en un intervalo de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal del sujeto, por ejemplo, aproximadamente 0,01 mg/kg, aproximadamente 0,02 mg/kg, aproximadamente 0,03 mg/kg, aproximadamente 0,04 mg/kg, aproximadamente 0,05 mg/kg, aproximadamente 0,06 mg/kg, aproximadamente 0,07 mg/kg, aproximadamente 0,08 mg/kg, aproximadamente 0,09 mg/kg, aproximadamente 0,1 mg/kg, aproximadamente 0,2 mg/kg, aproximadamente 0,3 mg/kg, aproximadamente 0,4 mg/kg, aproximadamente 0,5 mg/kg, aproximadamente 0,6 mg/kg, aproximadamente 0,7 mg/kg, aproximadamente 0,8 mg/kg, aproximadamente 0,9 mg/kg, aproximadamente 1 mg/kg, aproximadamente 1,1 mg/kg, aproximadamente 1,2 mg/kg, aproximadamente 1,3 mg/kg, aproximadamente 1,4 mg/kg, aproximadamente 1,5 mg/kg, aproximadamente 1,6 mg/kg, aproximadamente 1,7 mg/kg, aproximadamente 1,8 mg/kg, 1,9 mg/kg, aproximadamente 2 mg/kg, aproximadamente 3 mg/kg, aproximadamente 4 mg/kg, aproximadamente 5 mg/kg, aproximadamente 6 mg/kg, aproximadamente 7 mg/kg, aproximadamente 8 mg/kg, aproximadamente 9 mg/kg, aproximadamente 10 mg/kg, aproximadamente 15 mg/kg, aproximadamente 20 mg/kg, aproximadamente 25 mg/kg, aproximadamente 30 mg/kg, aproximadamente 35 mg/kg, aproximadamente 40 mg/kg, aproximadamente 45 mg/kg, aproximadamente 50 mg/kg, aproximadamente 55 mg/kg, aproximadamente 60 mg/kg, aproximadamente 65 mg/kg, aproximadamente 70 mg/kg, aproximadamente 75 mg/kg, aproximadamente 80 mg/kg, aproximadamente 85 mg/kg, aproximadamente 90 mg/kg, aproximadamente 95 mg/kg o aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal, incluyendo todos los valores e intervalos entre ellos. En otras realizaciones, una dosis adecuada de las betalactamasas en un intervalo de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal, en un intervalo de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 9 mg/kg de peso corporal, en un intervalo de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 8 mg/kg de peso corporal, en un intervalo de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 7 mg/kg de peso corporal, en un intervalo de 0,01 mg/kg a aproximadamente 6 mg/kg de peso corporal, en un intervalo de aproximadamente 0,05 mg/kg a aproximadamente 5 mg/kg de peso corporal, en un intervalo de aproximadamente 0,05 mg/kg a aproximadamente 4 mg/kg de peso corporal, en un intervalo de aproximadamente 0,05 mg/kg a aproximadamente 3 mg/kg de peso corporal, en un intervalo de aproximadamente 0,05 mg/kg a aproximadamente 2 mg/kg de peso corporal, en un intervalo de aproximadamente 0,05 mg/kg a aproximadamente 1,5 mg/kg de peso corporal o en un intervalo de aproximadamente 0,05 mg/kg a aproximadamente 1 mg/kg de peso corporal.

La betalactamasa puede administrarse, por ejemplo, aproximadamente una vez al día, aproximadamente cada dos días, aproximadamente cada tres días, aproximadamente una vez a la semana, aproximadamente una vez cada dos semanas, aproximadamente una vez al mes, aproximadamente una vez cada dos meses, aproximadamente una vez cada tres meses, aproximadamente una vez cada seis meses o aproximadamente una vez al año. La betalactamasa puede administrarse más de una vez al día, por ejemplo, aproximadamente dos veces, aproximadamente tres veces, aproximadamente cuatro veces, aproximadamente cinco veces, aproximadamente seis veces, aproximadamente siete veces, aproximadamente ocho veces, aproximadamente nueve veces o aproximadamente diez veces al día.

Agentes terapéuticos adicionales y terapia combinada o co-formulación

La administración de las presentes formulaciones puede combinarse con agentes terapéuticos adicionales. La

administración conjunta del agente terapéutico adicional y las presentes formulaciones puede ser simultánea o secuencial. Además, las presentes formulaciones pueden comprender un agente terapéutico adicional (por ejemplo, a través de co-formulación).

Las formulaciones de liberación modificada de la presente invención pueden administrarse en combinación con un agente terapéutico adicional. El agente terapéutico adicional y la betalactamasa (por ejemplo, P3A o los otros agentes de betalactamasa descritos en el presente documento y variantes de los mismos) pueden combinarse en una sola formulación de liberación modificada. Los procedimientos de tratamiento y/o prevención pueden comprender administrar las formulaciones de liberación modificada de la presente invención a un sujeto que está en tratamiento con un agente terapéutico adicional.

El agente adicional y la betalactamasa pueden administrarse a un sujeto simultáneamente. El término "simultáneamente" como se usa en el presente documento, significa que el agente adicional y la betalactamasa se administran con una separación de tiempo de no más de aproximadamente 60 minutos, tal como no más de aproximadamente 30 minutos, no más de aproximadamente 20 minutos, no más de aproximadamente 10 minutos, no más de aproximadamente 5 minutos o no más de aproximadamente 1 minuto. La administración del agente adicional y la betalactamasa puede ser mediante la administración simultánea de una formulación única (por ejemplo, una formulación que comprende el agente adicional y la betalactamasa) o de formulaciones separadas (por ejemplo, una primera formulación que incluye el agente adicional y una segunda formulación que incluye la betalactamasa).

La administración conjunta no requiere que los agentes terapéuticos adicionales se administren simultáneamente, si el momento de su administración es tal que las actividades farmacológicas del agente adicional y la betalactamasa se superponen en el tiempo, ejerciendo de esta manera un efecto terapéutico combinado. Por ejemplo, el agente adicional y la betalactamasa pueden administrarse secuencialmente. El término "secuencialmente" como se usa en el presente documento significa que el agente adicional y la betalactamasa se administran con una separación de tiempo de más de aproximadamente 60 minutos. Por ejemplo, el tiempo entre la administración secuencial del agente adicional y la betalactamasa puede ser de más de aproximadamente 60 minutos, más de aproximadamente 2 horas, más de aproximadamente 5 horas, más de aproximadamente 10 horas, más de aproximadamente 1 día, más de aproximadamente 2 días, más de aproximadamente 3 días o más de aproximadamente 1 semana de diferencia. Los tiempos de administración óptimos dependerán de las tasas de metabolismo, excreción y/o la actividad farmacodinámica del agente adicional y la betalactamasa que se administra. Cualquiera del agente terapéutico adicional o la betalactamasa (por ejemplo, P3A o los otros agentes de betalactamasa descritos en el presente documento y variantes de los mismos) pueden administrarse primero.

La co-administración tampoco requiere que los agentes terapéuticos adicionales se administren al sujeto por la misma vía de administración. En su lugar, cada agente terapéutico adicional puede administrarse por cualquier vía apropiada, por ejemplo, por vía parenteral o por vía no parenteral.

El agente terapéutico adicional puede ser una enzima de degradación antibiótica adicional, tales como, por ejemplo, una betalactamasa de clase EC 3.5.2.6. En algunas realizaciones, la enzima de degradación antibiótica se selecciona de una betalactamasa funcional del Grupo 1, Grupo 2, Grupo 3, o Grupo 4 (véase, por ejemplo, Bush y col., *Antimicrob. Agents Chemother.*, 39: 1211): sin desear quedar ligado a teoría alguna, el Grupo 1 consiste en cefalosporinasas que no están bien inhibidas por el ácido clavulánico; el Grupo 2 consiste en penicilinasas, cefalosporinasas y betalactamasas de amplio espectro que generalmente se inhiben por inhibidores activos de betalactamasas dirigidas al sitio; el Grupo 3 consiste en metalo-betalactamasas que hidrolizan las penicilinas, cefalosporinas y carbapenems y que son inhibidos poco por casi todas las moléculas que contienen betalactámicos; y el Grupo 4 consiste en penicilinasas que no están bien inhibidas por el ácido clavulánico y/o una betalactamasa molecular/Ambler de clase A, o clase B, o clase C, o clase D (véase, por ejemplo, Ambler 1980, *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 289: 321), sin desear quedar ligado a teoría alguna: las Clases A, C y D reúnen grupos evolutivamente distintos de enzimas serina betalactamasa y la clase B las enzimas betalactamasa dependientes de zinc ("inhibidas por EDTA") (véase Ambler RP y col., 1991, *Biochem J.* 276: 269-270). La enzima de degradación antibiótica puede ser una serina betalactamasa o una betalactamasa dependiente de zinc (inhibida por EDTA). Por ejemplo, la betalactamasa puede ser una o más de P1A, P2A, P3A o P4A. Además, la betalactamasa puede ser una betalactamasa de espectro extendido (ESBL, por sus siglas en inglés), opcionalmente seleccionada de una betalactamasa TEM, SHV, CTX-M, OXA, PER, VEB, GES e IBC. Además, la betalactamasa puede ser una β -lactamasa resistente a los inhibidores, opcionalmente seleccionada de β -lactamasas de tipo AmpC, Carbapenemasa, carbapenemasas de tipo IMP (metalo- β -lactamasas), VIM (metalo- β -lactamasa codificada por integrón Verona), grupo de β -lactamasas OXA (oxacilinasas), KPC (carbapenemasa de *K. pneumoniae*), CMY (Clase C), SME, IMI, NMC y CcrA, y una NDM betalactamasa (metalo- β -lactamasa Nueva Delhi, por ejemplo, NDM-1).

El agente terapéutico adicional puede ser una terapia complementaria que se usa en, por ejemplo, el tratamiento de CDI como se describe en el presente documento. El agente adicional puede ser metronidazol (por ejemplo, FLAGYL), fidaxomicina (por ejemplo, DIFICID) o vancomicina (por ejemplo, Vancocin), rifaximina, bacterioterapia fecal, aglutinantes basados en carbón (por ejemplo DAV132), terapia con probióticos (véase, por ejemplo, *Intnat'l J Inf Dis*, 16 (11): e786, algunos probióticos ilustrativos incluyen *Saccharomyces boulardii*; *Lactobacillus rhamnosus* GG; *Lactobacillus plantarum* 299v; *Clostridium butyricum* M588; *Clostridium difficile* VP20621 (cepa de *C. difficile* no

toxigénica); combinación de *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus* (Bio-K + CL1285); combinación de *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus* (Actimel); combinación de *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium bifidum* (Florajen3); combinación de *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bulgaricus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus bulgaricus casei*, *Lactobacillus bulgaricus plantarum*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium breve*, *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* (VSL n.º3)) y anticuerpos u otra terapia biológica (por ejemplo, anticuerpos monoclonales contra toxinas A y B de *C. difficile* como se describe en N Engl J Med. 2010;362(3):197; proteínas de unión neutralizantes, por ejemplo, dispuestas como multímeros, que se dirigen a uno o más de las SEQ ID NO. citadas en la Publicación de Patente de EE.UU. N.º 2013/0058962 (por ejemplo, uno o más de las SEQ ID NO: 59, 60, 95, 67, 68 y 87)); o cualquier proteína de unión neutralizante dirigida contra la toxina binaria de *C. difficile*. En algunas realizaciones, cualquiera de las penicilinas y cefalosporinas descritas en el presente documento puede ser el agente adicional.

El agente terapéutico adicional puede ser un agente antidiarreico. Los agentes antidiarreicos adecuados para su uso en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, Inhibidores de DPP-IV, opioides naturales, tales como tintura de opio, paregórico y codeína, opioides sintéticos, tales como difenoxilato, difenoxina y loperamida, subsalicilato de bismuto, lanreotida, vapreotida y octreotida, antagonistas de motilina, inhibidores de COX2 tales como celecoxib, glutamina, talidomida y remedios antidiarreicos tradicionales, tales como caolín, pectina, berberina y agentes muscarínicos.

El agente terapéutico adicional puede ser un agente antiinflamatorio tales como agentes antiinflamatorios esteroideos o agentes antiinflamatorios no esteroideos (AINE). Los esteroides, particularmente los corticosteroides suprarrenales y sus análogos sintéticos, son bien conocidos en la técnica. Los ejemplos de corticosteroides útiles en la presente invención incluyen, sin limitación, hidroxiltriamicinolona, alfa-metil dexametasona, beta-metil betametasona, dipropionato de beclometasona, benzoato de betametasona, dipropionato de betametasona, valerato de betametasona, valerato de clobetasol, desonida, desoximetasona, dexametasona, diacetato de diflorasona, valerato de diflucortolona, fluadrenolona, acetónido de fluclorolona, pivalato de flumetasona, acetónido de flusinolona, fluciclonida, butiléster de flucortina, fluocortolona, acetato de fluprednido (fluprednilideno), flurandrenolona, halcinonida, acetato de hidrocortisona, butirato de hidrocortisona, metilprednisolona, acetónido de triamicinolona, cortisona, cortodoxona, flucetonida, fludrocortisona, diacetato de difluorasona, acetónido de fluradrenolona, medrisona, amcinafel, amcinafida, betametasona y el equilibrio de sus ésteres, cloroprednisona, clocortelona, clesciclonolona, diclorisona, difluprednato, fluclorolona, flunisolida, fluorometalona, fluperolona, fluprednisolona, hidrocortisona, meprednisona, parametasona, prednisolona, prednisona, dipropionato de beclometasona. Los (AINE) que pueden usarse en la presente invención, incluyen pero no se limitan a, ácido salicílico, ácido acetilsalicílico, salicilato de metilo, salicilato de glicol, salicilimidas, ácido bencil-2,5-diacetoxibenzoico, ibuprofeno, fulindac, naproxeno, cetoprofeno, etofenamato, fenilbutazona e indometacina. Se describen agentes antiinflamatorios adicionales, por ejemplo, en la Patente de EE.UU. N.º 4.537.776.

El agente terapéutico adicional puede ser un analgésico. Los analgésicos útiles en las composiciones y procedimientos de la presente invención incluyen, sin limitación, morfina, codeína, heroína, metadona y compuestos relacionados, tebaína, orpiavina y sus derivados, buprenorfina, las piperidinas, morfina, benzomorfanos, tetrahidroisoquinolinas, tiambutanos, bencilaminas, tilidina, viminol, nefopam, capsaicina (8-metil-N-vanilil-6E-nonenamida), capsaicina "sintética" (N-vanililnonamida) y compuestos relacionados.

Para todas las composiciones y procedimientos de agentes adicionales, el direccionamiento a diversas partes del tracto GI puede emplearse como se describe en el presente documento.

Las presentes formulaciones pueden administrarse a un paciente para evitar el tratamiento con un agente terapéutico adicional. Por ejemplo, en el contexto de la prevención de infección por *C. difficile* (CDI) y/o una enfermedad asociada a *C. difficile*, las presentes formulaciones pueden proporcionarse a un paciente para evitar la necesidad de recibir, por ejemplo, vancomicina.

Procedimientos de tratamiento

En diversos aspectos, la presente invención proporciona formulaciones de liberación modificada que incluyen betalactamasa (y/o agente adicional) para su uso en el tratamiento o prevención de un efecto adverso inducido por antibióticos en el tracto GI y/o prevención o tratamiento de infección por *C. difficile* (CDI) y/o una enfermedad asociada a *C. difficile*.

En diversos aspectos, la presente invención proporciona una formulación de liberación modificada que incluye betalactamasa (por ejemplo, P3A o los otros agentes betalactamasas descritos en el presente documento y variantes de los mismos) y/o agente terapéutico adicional descrito en el presente documento para su uso en el tratamiento o prevención de un efecto adverso inducido por antibióticos en el tracto GI en un paciente que lo necesite. En un aspecto, la presente invención proporciona una formulación de liberación modificada que incluye betalactamasa (por ejemplo, P3A o los otros agentes betalactamasas descritos en el presente documento y variantes de los mismos) y/o agente terapéutico adicional descrito en el presente documento para su uso en la prevención de un efecto adverso inducido por antibióticos en el tracto GI en un paciente que lo necesite (a modo de ejemplo no limitante, un paciente que se está administrando o se le administrará un antibiótico, incluyendo aquellos

descritos en el presente documento).

En diversas realizaciones, los sujetos incluyen, pero no se limitan a, sujetos que corren un riesgo particular de sufrir un trastorno mediado por microbioma, tales como, a modo de ejemplo no limitante, aquellos sometidos a tratamiento o que se hayan sometido recientemente a un tratamiento con un antibiótico. Por ejemplo, el sujeto puede haber tomado un antibiótico durante los últimos aproximadamente 30 días más o menos y/o tener un sistema inmunitario que es débil (por ejemplo, debido a una enfermedad crónica) y/o es una mujer y/o es anciano (por ejemplo, tiene más de 65 años) y/o es una mujer de edad avanzada y/o se está sometiendo (o se ha sometido) a un tratamiento con acidez estomacal o trastornos de la acidez estomacal (por ejemplo, con agentes como PREVACID, TAGAMET, PRILOSEC o NEXIUM y medicamentos relacionados) y/o ha estado recientemente en el hospital, incluyendo en una unidad de cuidados intensivos, o vive en una residencia de ancianos. Por consiguiente, en algunas realizaciones, los procedimientos y usos de la presente invención tratan o previenen una infección nosocomial y/o una infección emergente secundaria y/o una infección adquirida en el hospital (IAH).

En diversas realizaciones, la betalactamasa (por ejemplo, P3A o los otros agentes de betalactamasa descritos en el presente documento y variantes de los mismos), formulado opcionalmente en un formato de lanzamiento modificado como se describe en el presente documento, protege el microbioma intestinal del daño inducido por antibióticos. En una realización ilustrativa, la betalactamasa (por ejemplo, P3A o los otros agentes de betalactamasa descritos en el presente documento y variantes de los mismos), formulado opcionalmente en un formato de lanzamiento modificado como se describe en el presente documento, protege el microbioma intestinal del daño inducido por cefalosporina. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la betalactamasa (por ejemplo, P3A o los otros agentes de betalactamasa descritos en el presente documento y variantes de los mismos), formulado opcionalmente en un formato de lanzamiento modificado como se describe en el presente documento, protege el microbioma intestinal del daño inducido por la cefalosporina, que puede ser una o más de:

Genérico	Nombre de la marca
Primera generación	
Cefacetrilo	CELOSPOR, CELTOL, CRISTACEF
Cefadroxilo	DURICEF, ULTRACEF
Cefalexina	KEFLEX, KEFTAB
Cefaloglicina	KEFGLYCIN
Cefalonio	
Cefaloridina	
Cefalotina	KEFLIN
Cefapirina	CEFADYL
Cefatrizina	
Cefazaflur	
Cefazedona	
Cefazolina	ANCEF, KEFZOL
Cefradina	VELOSEF
Cefroxadina	
Ceftazol	
Segunda generación	
Cefaclor	CECLOR, CECLOR CD, DISTACLOR, KEFLOR, RANICOR
Cefamandol	MANDOL
Cefmetazol	
Cefonicid	MONOCID
Cefotetán	CEFOTAN
Cefoxitina	MEFOXIN
Cefprozil	CEFZIL
Cefuroxima	CEFTIN, KEFUROX, ZINACEF, ZINNAT
Cefuzonam	
Tercera generación	
Cefcapeno	
Cefdaloxima	
Cefdinir	OMNICEF, CEFDIEL
Cefditoren	ESPECTRACEF
Cefetamet	
Cefixima	SUPRAX
Cefmenoxima	CEFMAX
Cefodizima	
Cefotaxima	CLAFORAN
Cefpimizol	
Cefpodoxima	VANTIN

Cefteram	
Ceftibuteno	CEDAX
Ceftiofur	EXCEDE
Ceftioleno	
Ceftizoxima	CEFIZOX
Ceftriaxona	ROCEPHIN
Cefoperazona	CEFOBID
Ceftazidima	CEPTAZ, FORTUM, FORTAZ, TAZICEF, TAZIDIME
Cuarta generación	
Cefclidina	
Cefepima	MAXIPIME
Cefluprenam	
Cefoselis	

(continuación)

Genérico	Nombre de la marca
Cefozopran	
Cefpirom	CEFROM
Cefquinoma	
Quinta generación	
Ceftobiprol	ZEFTERA
Ceftarolina	TEFLARO
No clasificado	
Cefaclomezina	
Cefaloram	
Cefaparola	
Cefcanel	
Cefedrolor	
Cefempidona	
Cefetrizol	
Cefivitril	
Cefmatilen	
Cefmepidium	
Cefovecina	
Cefoxazol	
Cefrotil	
Cefsumida	
Cefuracetima	
Ceftióxido	

En una realización, la betalactamasa (por ejemplo, P3A o los otros agentes de betalactamasa descritos en el presente documento y variantes de los mismos), formulado opcionalmente en un formato de lanzamiento modificado como se describe en el presente documento, protege el microbioma intestinal del daño inducido por ceftriaxona (CRO). En algunas realizaciones, los procedimientos de la invención tratan o previenen un efecto adverso asociado a la ceftriaxona (por ejemplo, diarrea, náuseas, vómitos, disgeusia y enfermedad y/o síntomas de colitis pseudomembranosa).

El tratamiento con antibióticos tales como el tratamiento con ceftriaxona puede provocar un crecimiento anormal (por ejemplo, un sobrecrecimiento y/o sobreabundancia) de metanógenos. Los metanógenos incluyen microorganismos que producen metano como un subproducto metabólico. Los ejemplos de metanógenos incluyen pero no se limitan a, *Methanobacterium bryantii*, *Methanobacterium formicum*, *Methanobrevibacter arboriphilicus*, *Methanobrevibacter gottschalkii*, *Methanobrevibacter ruminantium*, *Methanobrevibacter smithii*, *Methanocalculus chunghsingensis*, *Methanococcoides burtonii*, *Methanococcus aeolicus*, *Methanococcus deltae*, *Methanococcus jannaschii*, *Methanococcus maripaludis*, *Methanococcus vanniellii*, *Methanocorpusculum labreanum*, *Methanoculleus bourgensis* (*Methanogenium olentangyi*, *Methanogenium bourgense*), *Methanoculleus marisnigri*, *Methanofollis liminatans*, *Methanogenium cariaci*, *Methanogenium frigidum*, *Methanogenium organophilum*, *Methanogenium wolfei*, *Methanomicrobium mobile*, *Methanopyrus kandleri*, *Methanoregula boonei*, *Methanosaeata concilii*, *Methanosaeata thermophile*, *Methanosarcina acetivorans*, *Methanosarcina barkeri*, *Methanosarcina mazei*, *Methanosphaera stadtmanae*, *Methanospirillum hungatei*, *Methanothermobacter defluvi* (*Methanobacterium defluvi*), *Methanothermobacter thermoautotrophicus* (*Methanobacterium thermoautotrophicum*), *Methanothermobacter thermoflexus* (*Methanobacterium thermoflexum*), *Methanothermobacter wolfei* (*Methanobacterium wolfei*) y *Methanotherx sochngenii*. En una realización, el metanógeno es *Methanobrevibacter smithii*. En diversas realizaciones, la betalactamasa (por ejemplo, P3A o los otros agentes de betalactamasa descritos en el presente documento y variantes de los mismos), formulado opcionalmente en un formato de lanzamiento modificado como se describe en el presente documento, previene uno o más de una presencia anormal o ausencia de metanógenos,

niveles anormales de metanógenos, sobrecrecimiento de metanógenos, niveles elevados de metanogénesis, niveles elevados de metano entérico, eliminación excesiva de hidrógeno por metanógenos que consumen hidrógeno o colonización de metanógenos en una ubicación anormal (por ejemplo, en el intestino delgado en lugar del intestino grueso). En una realización, la betalactamasa (por ejemplo, P3A o los otros agentes de betalactamasa descritos en el presente documento y variantes de los mismos), formulado opcionalmente en un formato de lanzamiento modificado como se describe en el presente documento, protege el microbioma intestinal de un sobrecrecimiento y/o sobreabundancia de metanógenos, tales como *Methanobrevibacter smithii*.

En diversas realizaciones, el tratamiento con antibióticos tales como el tratamiento con ceftriaxona también puede dar lugar a un crecimiento anormal tal como una reducción o representación insuficiente de especies bacterianas. En una realización, el tratamiento con antibióticos da como resultado una reducción o representación insuficiente de *Turicibacter* spp. Los *Turicibacter* sp. ejemplares incluyen, pero no se limitan a, *T. sanguinis*, *Turicibacter* sp. HGF1, *Turicibacter* sp. LA61, *Turicibacter* sp. LA62, *Turicibacter* sp. HGA0205 y *Turicibacter* sp. HGH0181. En una realización, la especie bacteriana es *T. sanguinis*. Una reducción en *Turicibacter* spp. se ha asociado a enfermedad inflamatoria intestinal idiopática y diarrea hemorrágica aguda en perros (Minamoto y col., 2015, Gut Microbes 6(1), 33-47; Rossi y col., 2014, PLoS ONE 9(4), e94699). Por consiguiente, en diversas realizaciones, la betalactamasa (por ejemplo, P3A o los otros agentes de betalactamasa descritos en el presente documento y variantes de los mismos), formulado opcionalmente en un formato de lanzamiento modificado como se describe en el presente documento, protege el microbioma intestinal de una reducción y/o representación insuficiente de *Turicibacter* spp. tales como *T. sanguinis*.

En diversas realizaciones, la betalactamasa (por ejemplo, P3A o los otros agentes de betalactamasa descritos en el presente documento y variantes de los mismos), formulado opcionalmente en un formato de lanzamiento modificado como se describe en el presente documento, funciona reteniendo una diversidad normal de bacterias en el tracto intestinal. Por ejemplo, dicho tratamiento conserva un equilibrio de Bacteroidetes, Proteobacterias y Firmicutes. En algunas realizaciones, la P3A (opcionalmente formulada en un formato de liberación modificada como se describe en el presente documento) previene o reduce la disbiosis. En algunas realizaciones, la P3A (opcionalmente formulada en un formato de liberación modificado como se describe en el presente documento) previene o reduce la erradicación o la reducción sustancial de, Firmicutes en el tracto GI.

En una realización, la betalactamasa (por ejemplo, P3A o los otros agentes de betalactamasa descritos en el presente documento y variantes de los mismos), formulado opcionalmente en un formato de lanzamiento modificado como se describe en el presente documento, protege el microbioma intestinal protegiendo a las especies bacterianas anaerobias y aerobias facultativas de los cambios mediados por antibióticos. Las especies ilustrativas de bacterias anaerobias y aerobias facultativas incluyen, pero no se limitan a, *S. infantarius*, *B. vulgatus*, *Lachnospiraceae bacterium*, *Turicibacter* sp., *R. gnavus*, *B. bifidum*, *P. merdae*, *A. putredinis*, *Clostridium* sp., *C. symbiosum*, *C. hathewayi*, *C. citroniae*, *C. ramosum*, *C. nexile*, *C. difficile*, *C. clostridioforme*, *E. coli*, *Alistipes* sp., *Bifidobacterium* sp., *E. faecium*, *L. plantarum*, *E. faecalis*, *R. torques*, *L. fermentum*, *K. pneumoniae*, *S. thermophilus*, *P. distasonis*, *Mollicutes bacterium*, *Enterococcus* sp., *Bacteroides* sp., *Ruminococcaceae bacterium*, *Clostridiales bacterium*, *Klebsiella* sp., *L. lactis*, *A. caccae* y *E. gallinarum*.

En una realización, la betalactamasa (por ejemplo, P3A o los otros agentes de betalactamasa descritos en el presente documento y variantes de los mismos), formulado opcionalmente en un formato de lanzamiento modificado como se describe en el presente documento, es capaz de mantener una proporción adecuada de microorganismos grampositivos/gramnegativos en los intestinos. Por ejemplo, en una realización, la betalactamasa (por ejemplo, P3A o los otros agentes de betalactamasa descritos en el presente documento y variantes de los mismos), formulado opcionalmente en un formato de lanzamiento modificado como se describe en el presente documento, es capaz de mantener un exceso de microorganismos grampositivos en los intestinos. En otra realización, la betalactamasa (por ejemplo, P3A o los otros agentes de betalactamasa descritos en el presente documento y variantes de los mismos), formulado opcionalmente en un formato de lanzamiento modificado como se describe en el presente documento, es capaz de reducir la cantidad de microorganismos gramnegativos en los intestinos.

En diversas realizaciones, la presente invención proporciona composiciones que mitigan o previenen el crecimiento excesivo de diversos coliformes en el intestino de un paciente (incluyendo coliformes que son virulentos y/o resistentes a antibióticos). En diversos aspectos, las composiciones descritas en el presente documento previenen o disminuyen las infecciones secundarias con organismos resistentes y pueden, en algunas realizaciones, disminuir el desarrollo de resistencia a betalactámicos. Además, las composiciones descritas en el presente documento pueden permitir el uso de antibióticos betalactámicos que actualmente se evitan debido a problemas de resistencia y/o reducir la necesidad de coadministración o co-formulación con uno o más inhibidores de betalactamasa (por ejemplo, AUGMENTIN es una mezcla de amoxicilina y ácido clavulánico).

Se desvelan procedimientos para tratar o prevenir la diarrea hemorrágica aguda. Se desvelan procedimientos para tratar o prevenir la enfermedad inflamatoria intestinal, incluyendo, por ejemplo, enfermedad inflamatoria intestinal idiopática. Se desvelan procedimientos para tratar o prevenir uno o más de estreñimiento, síndrome del intestino irritable y obesidad.

Se desvelan procedimientos para tratar o prevenir la infección por *C. difficile* (CDI) y/o una enfermedad asociada a

C. difficile, que comprende administrar una cantidad eficaz de una formulación de liberación modificada que incluye betalactamasa (por ejemplo, P3A o los otros agentes de betalactamasa descritos en el presente documento y variantes de los mismos) y/o agente terapéutico adicional descrito en el presente documento para un paciente que lo necesite. Se desvelan procedimientos para prevenir la infección por *C. difficile* (CDI) y/o una enfermedad asociada a *C. difficile*, que comprende administrar una cantidad eficaz de una formulación de liberación modificada que incluye betalactamasa (por ejemplo, P3A o los otros agentes de betalactamasa descritos en el presente documento y variantes de los mismos) y/o agente terapéutico adicional descrito en el presente documento para un paciente que lo necesite (a modo de ejemplo no limitante, un paciente que se está administrando o se le administrará un antibiótico, incluyendo aquellos descritos en el presente documento).

Se desvela un procedimiento de prevención de la infección por *C. difficile* (CDI) y/o una enfermedad asociada a *C. difficile*, que comprende administrar una cantidad eficaz de una formulación de liberación modificada que incluye betalactamasa (por ejemplo, P3A o los otros agentes de betalactamasa descritos en el presente documento y variantes de los mismos) y/o agente terapéutico adicional descrito en el presente documento para un paciente que lo necesite, en el que el paciente está recibiendo terapia con un antibiótico primario y el antibiótico primario es uno o más de una ceftriaxona, cefotaxima, cefazolina, cefoperazona, cefuroxima y piperacilina y se administra por vía intravenosa. El paciente no necesita someterse a un tratamiento con una terapia inicial y/o complementaria que sea uno o más de metronidazol, vancomicina, fidaxomicina, rifaximina, bacterioterapia fecal, terapia probiótica y terapia con anticuerpos.

En diversas realizaciones, el efecto adverso inducido por antibióticos y/o CDI o enfermedad asociada a *C. difficile* es uno o más de: diarrea asociada a antibióticos, diarrea por *C. difficile* (CDD), enfermedad inflamatoria intestinal por *C. difficile*, colitis, colitis pseudomembranosa, fiebre, dolor abdominal, deshidratación y alteraciones en electrolitos, megacolon, peritonitis y perforación y/o ruptura del colon.

En diversas realizaciones, la CDI y/o la enfermedad asociada a *C. difficile* debe tratarse o prevenirse en el contexto de aparición inicial o recaída/recurrencia (por ejemplo, debido a la terapia antibiótica continua o reiniciada). Por ejemplo, en un paciente que previamente ha padecido CDI, la presente formulación de liberación modificada que incluye betalactamasa (y/o agente adicional) puede administrarse ante los primeros síntomas de recurrencia. A modo de ejemplo no limitante, los síntomas de recurrencia incluyen, en un caso leve, de aproximadamente 5 a aproximadamente 10 deposiciones acuosas por día, sin fiebre significativa, y solo calambres abdominales leves, mientras que los análisis de sangre pueden mostrar un aumento leve en el recuento de glóbulos blancos de hasta aproximadamente 15.000 (los niveles normales son de hasta aproximadamente 10.000) y, en un caso grave, más de aproximadamente 10 heces acuosas por día, náuseas, vómitos, fiebre alta (por ejemplo, aproximadamente 38,8-40 °C), hemorragia rectal, dolor abdominal intenso (por ejemplo, con sensibilidad), distensión abdominal y un recuento alto de glóbulos blancos (por ejemplo, de aproximadamente 15.000 a aproximadamente 40.000).

Independientemente del inicio inicial o recaída/recurrencia, la CDI y/o la enfermedad asociada a *C. difficile* puede diagnosticarse mediante cualquiera de los síntomas descritos en el presente documento (por ejemplo, diarrea acuosa aproximadamente 3 o más veces al día durante aproximadamente 2 días o más, calambres leves a malos y dolor en el vientre, fiebre, sangre o pus en las heces, náuseas, deshidratación, pérdida de apetito, pérdida de peso, etc.). Independientemente del inicio inicial o recaída/recurrencia, la CDI y/o la enfermedad asociada a *C. difficile* también puede diagnosticarse mediante inmunoensayos enzimáticos, por ejemplo, para detectar el antígeno de toxina A o B de *C. difficile* y/o glutamina deshidrogenasa (GDH), que se produce por organismos *C. difficile*, reacciones en cadena de la polimerasa (por ejemplo, para detectar el gen de la toxina A o B de *C. difficile* o una porción del mismo (por ejemplo, tcdA o tcdB), incluyendo el ensayo ILLUMIGENE LAMP), un ensayo de citotoxicidad celular. Por ejemplo, puede usarse cualquiera de las siguientes pruebas: Meridian ImmunoCard Toxins A/B; Wampole Toxin A/B Quik Chek; Wampole *C. diff* Quik Chek Complete; Remel Xpect Clostridium difficile Toxin A/B; Meridian Premier Toxins A/B; Wampole *C. difficile* Tox A/B II; Remel Prospect Toxin A/B EIA; Biomerieux Vidas *C. difficile* Toxin A&B; BD Geneohm *C. diff*, Prodesse Progestro CD; y Cepheid Xpert *C. diff*. En diversas realizaciones, la muestra clínica es una muestra de heces del paciente.

También una prueba de "ámbito" de sigmoidoscopia flexible y/o una radiografía abdominal y/o una tomografía computarizada (TC), que proporciona imágenes de su colon, puede usarse para evaluar a un paciente (por ejemplo, en busca de placas blancas o amarillas cremosas características adheridas a la pared del colon). Además, las biopsias (por ejemplo, de cualquier región del tracto gastrointestinal) pueden usarse para evaluar un paciente con CDI potencial y/o enfermedad asociada a *C. difficile*.

Adicionalmente, los pacientes pueden tratarse incluyendo, pero no limitados a, pacientes que corren un riesgo particular de CDI y/o enfermedad asociada a *C. difficile*, tales como aquellos que han estado tomando un antibiótico durante los últimos 30 días más o menos y/o tener un sistema inmunitario que es débil (por ejemplo, debido a una enfermedad crónica) y/o son mujeres y/o son ancianos (por ejemplo, tienen más de 65 años) y/o son mujeres de edad avanzada y/o se someten a un tratamiento con acidez estomacal o trastornos de la acidez estomacal (por ejemplo, con agentes como PREVACID, TAGAMET, PRILOSEC o NEXIUM y medicamentos relacionados) y/o han estado recientemente en el hospital, incluyendo en una unidad de cuidados intensivos, o viven en una residencia de ancianos. Por consiguiente, puede tratarse una infección nosocomial y/o una infección emergente secundaria y/o una infección adquirida en el hospital (IAH).

El paciente puede estar recibiendo tratamiento o puede haber recibido tratamiento recientemente con uno o más antibióticos primarios. Un "antibiótico primario" se refiere a un antibiótico que se administra a un paciente y que puede provocar CDI y/o enfermedad asociada a *C. difficile*. Estos incluyen los antibióticos que con mayor frecuencia dan lugar a CDI y/o enfermedad asociada a *C. difficile*: fluoroquinolonas, cefalosporinas, clindamicina y penicilinas.

En algunas realizaciones, la presente invención se refiere a la formulación de liberación modificada que incluye betalactamasa (por ejemplo, P3A o los otros agentes de betalactamasa descritos en el presente documento y variantes de los mismos) y/o agente terapéutico adicional que hidroliza un antibiótico primario antes de que ingrese al tracto GI, incluyendo el intestino delgado y/o grueso. En algunas realizaciones, la presente invención se refiere a la formulación de liberación modificada que incluye betalactamasa (por ejemplo, P3A o los otros agentes de betalactamasa descritos en el presente documento y variantes de los mismos) y/o agente terapéutico adicional que hidroliza un antibiótico primario antes de que ingrese al intestino grueso. En algunas realizaciones, la presente invención se refiere a la formulación de liberación modificada que incluye betalactamasa (y/o agente adicional) que hidroliza el exceso de residuo de antibiótico en el tracto GI. En algunas realizaciones, la presente invención se refiere a la formulación de liberación modificada que incluye betalactamasa (y/o agente adicional) que mantiene una microbiota intestinal normal y/o previene el sobrecrecimiento de uno o más microorganismos patógenos en el tracto GI de un paciente. En algunas realizaciones, la presente invención se refiere a la formulación de liberación modificada que incluye betalactamasa (y/o agente adicional) que mantiene una microbiota intestinal normal y/o previene la reducción de uno o más microorganismos beneficiosos en el tracto GI de un paciente. En diversas realizaciones, las betalactamasas y/o composiciones farmacéuticas (y/o agentes adicionales) no interfieren sustancialmente con los niveles plasmáticos de un antibiótico primario. Por ejemplo, las betalactamasas y/o composiciones farmacéuticas (y/o agentes adicionales) de la presente invención permiten que un paciente reciba un antibiótico primario que podría ser necesario para una infección y no interfiere con la utilidad sistémica del antibiótico. En su lugar, las betalactamasas y/o composiciones farmacéuticas (y/o agentes adicionales) inactivan el exceso de antibiótico que puede poblar partes del tracto gastrointestinal y, al hacerlo, previenen la interrupción de la microbiota que está ligada a los diversos estados de enfermedad descritos en el presente documento.

En diversas realizaciones, las formulaciones de liberación modificada de la invención que incluyen betalactamasa (por ejemplo, P3A o los otros agentes de betalactamasa descritos en el presente documento y variantes de los mismos) y/o agente terapéutico adicional no se absorben sistémicamente. En diversas realizaciones, las formulaciones de liberación modificada que incluyen betalactamasa (y/o agente adicional) no interfieren sustancialmente con la actividad de los antibióticos administrados por vía sistémica. En diversas realizaciones, las formulaciones de liberación modificada que incluyen betalactamasa (y/o agente adicional) funcionan para eliminar que los antibióticos interfieran con la microbiota de un microbioma (por ejemplo, el intestino, incluyendo el intestino grueso). En algunas realizaciones, las formulaciones de liberación modificada que incluyen betalactamasa (y/o agente adicional) no interfieren con la absorción de antibióticos desde el intestino y/o enterohepáticamente lo suficiente como para alterar las semividas de la circulación de antibióticos. En algunas realizaciones, las formulaciones de liberación modificada que incluyen betalactamasa (y/o agente adicional) no interfieren con la absorción de antibióticos desde el intestino y/o enterohepáticamente lo suficiente como para ser clínicamente importante.

Puede administrarse una terapia inicial y/o complementaria a un sujeto. La terapia inicial y/o complementaria indica la terapia que se usa para tratar, por ejemplo, un trastorno o enfermedad mediado por microbioma tras la detección de dicho trastorno o enfermedad. La terapia inicial y/o complementaria puede indicar la terapia que se usa para tratar la CDI y/o enfermedad asociada a *C. difficile* tras la detección de dicha enfermedad. La terapia inicial y/o complementaria puede ser una o más de metronidazol, vancomicina, fidaxomicina, rifaximina, aglutinante/adsorbente basado en carbón, bacterioterapia fecal, terapia probiótica y terapia con anticuerpos, como se describe en el presente documento. La formulación de liberación modificada de la invención que incluye betalactamasa (por ejemplo, P3A o los otros agentes de betalactamasa descritos en el presente documento y variantes de los mismos) y/o agentes terapéuticos adicionales descritos en el presente documento pueden usarse como adyuvantes de cualquiera de estas terapias iniciales y/o complementarias (incluyendo la co-administración o administración secuencial). La formulación de liberación modificada de la invención que incluye betalactamasa (por ejemplo, P3A o los otros agentes de betalactamasa descritos en el presente documento y variantes de los mismos) y/o agentes terapéuticos adicionales descritos en el presente documento pueden usarse en un sujeto sometido a terapias iniciales y/o complementarias.

Se desvela el co-tratamiento (simultánea o secuencialmente) con la formulación de liberación modificada, incluyendo la betalactamasa y cualquier agente terapéutico adicional descrito en el presente documento y/o cualquier terapia inicial y/o complementaria o tratamiento con una co-formulación de la formulación de liberación modificada que incluye betalactamasa y cualquier agente terapéutico adicional descrito en el presente documento y/o cualquier terapia inicial y/o complementaria para el tratamiento de las diversas enfermedades descritas en el presente documento, o procedimientos para tratar las diversas enfermedades descritas en el presente documento en un paciente sometido a tratamiento con cualquier agente adicional descrito en el presente documento y/o cualquier terapia inicial y/o complementaria descrita en el presente documento mediante la administración de la formulación de liberación modificada que incluye betalactamasa al paciente.

En algunas realizaciones, los términos "paciente" y "sujeto" se usan indistintamente. En algunas realizaciones, el

sujeto y/o animal es un mamífero, por ejemplo, un ser humano, un ratón, una rata, una cobaya, un perro, un gato, un caballo, una vaca, un cerdo, un conejo, una oveja o un primate no humano, tales como un mono, un chimpancé o un babuino. En otras realizaciones, el sujeto y/o animal no es un mamífero, tal como, por ejemplo, un pez cebra. En algunas realizaciones, el sujeto y/o el animal pueden comprender células marcadas con fluorescencia (con, por ejemplo, GFP). En algunas realizaciones, el sujeto y/o animal es un animal transgénico que comprende una célula fluorescente.

Los procedimientos desvelados en el presente documento pueden ser útiles en el tratamiento de un sujeto humano. El humano puede ser un humano pediátrico. El humano puede ser un humano adulto. El humano puede ser un humano geriátrico. El humano puede denominarse un paciente. El humano puede ser una mujer. El humano puede ser un hombre.

El humano puede tener una edad en un intervalo de aproximadamente 1 a aproximadamente 18 meses de edad, de aproximadamente 18 a aproximadamente 36 meses de edad, de aproximadamente 1 a aproximadamente 5 años de edad, de aproximadamente 5 a aproximadamente 10 años de edad, de aproximadamente 10 a aproximadamente 15 años de edad, de aproximadamente 15 a aproximadamente 20 años de edad, de aproximadamente 20 a aproximadamente 25 años de edad, de aproximadamente 25 a aproximadamente 30 años de edad, de aproximadamente 30 a aproximadamente 35 años de edad, de aproximadamente 35 a aproximadamente 40 años de edad, de aproximadamente 40 a aproximadamente 45 años de edad, de aproximadamente 45 a aproximadamente 50 años de edad, de aproximadamente 50 a aproximadamente 55 años de edad, de aproximadamente 55 a aproximadamente 60 años de edad, de aproximadamente 60 a aproximadamente 65 años de edad, de aproximadamente 65 a aproximadamente 70 años de edad, de aproximadamente 70 a aproximadamente 75 años de edad, de aproximadamente 75 a aproximadamente 80 años de edad, de aproximadamente 80 a aproximadamente 85 años de edad, de aproximadamente 85 a aproximadamente 90 años de edad, de aproximadamente 90 a aproximadamente 95 años o de aproximadamente 95 a aproximadamente 100 años.

Kits

Se desvelan kits que pueden simplificar la administración de la formulación de liberación modificada descrita en el presente documento. El kit es un conjunto de materiales o componentes, incluyendo al menos una de las formulaciones de liberación modificada descritas en el presente documento. La naturaleza exacta de los componentes configurados en el kit depende de su fin destinado. En una realización, el kit está configurado para el fin de tratar de sujetos humanos.

Las instrucciones para su uso pueden estar incluidas en el kit. Las instrucciones para su uso generalmente incluyen una expresión tangible que describe la técnica a emplear al usar los componentes del kit para afectar a un resultado deseado, tal como para tratar un trastorno asociado descrito en el presente documento. Opcionalmente, el kit también contiene otros componentes útiles, tales como, diluyentes, tampones, vehículos farmacéuticamente aceptables, jeringas, catéteres, aplicadores, herramientas de pipeteo o medición, materiales de vendaje u otra parafernalia útil, como reconocerán fácilmente los expertos en la materia.

Los materiales y componentes ensamblados en el kit pueden proporcionarse a la tienda profesional de cualquier manera conveniente y adecuada para preservar su operatividad y utilidad. Por ejemplo, los componentes pueden proporcionarse a temperaturas ambiente, refrigeradas o congeladas. Los componentes están típicamente contenidos en materiales de embalaje adecuados. En diversas realizaciones, el material de embalaje se construye por procedimientos bien conocidos, preferentemente para proporcionar un ambiente estéril, libre de contaminantes. El material de embalaje puede tener una etiqueta externa que indique el contenido y/o el fin del kit y/o sus componentes.

Ejemplos

Ejemplo 1: Fabricación de gránulos y cápsulas de liberación retardada de P3A

Se produjo una formulación de P3A que incluye gránulos con recubrimiento entérico P3A. Para producir los gránulos, P3A se recubrió por pulverización sobre un núcleo de sacarosa y se secó por pulverización con una capa entérica, Eudragit L30 D-55, para proteger el principio farmacéutico activo P3A de las condiciones ácidas del estómago. El polímero Eudragit L30 D55 comienza a despolimerizarse cuando el pH aumenta a 5,5 y por encima en el intestino delgado, liberando de esta manera el fármaco activo del gránulo.

Las cápsulas de liberación retardada que incluyen los gránulos con recubrimiento entérico P3A se fabricaron en un procedimiento de GMP como se representa en la Figura 1A. Específicamente, la fabricación GMP de la cápsula de liberación retardada P3A fue un procedimiento secuencial de tres fases que incluía: 1) Aplicación de capas de fármaco P3A sobre gránulos de núcleo de sacarosa mediante aplicación por pulverización, 2) revestimiento entérico con EUDRAGIT® L 30 D-55 mediante aplicación por pulverización y 3) encapsulación de gránulos en cápsulas de gelatina dura de tamaño 0.

Los gránulos en capas de P3A se produjeron mediante la aplicación por pulverización de la sustancia farmacológica P3A usando hidroxipropilcelulosa (HPC) como excipiente aglutinante, agua como disolvente y esferas de sacarosa

como material de partida. La aplicación de pulverización se realizó utilizando un sistema de lecho fluido durante seis turnos de trabajo, para lograr un porcentaje final de agente farmacéutico activo (API) de al menos el 15 %. Después del sexto turno de trabajo de aplicación por pulverización de la mezcla P3A/HPC, los gránulos en capas P3A se secaron durante la noche a temperatura ambiente en bandejas, después se tamizó a través de un tamiz de 1,4 mm antes del empaquetamiento a granel en bolsas de polietileno (PE) y recipientes de PE. Los gránulos en capas de fármaco se almacenaron a 5 ± 3 °C para su procesamiento adicional. Se observa que los intentos de usar hidroximetilcelulosa (HMC) como excipiente aglutinante no tuvieron éxito ya que esto produjo gránulos escamosos que no pudieron procesarse (por ejemplo, secados por pulverización).

En un procedimiento posterior, los gránulos en capas P3A se recubrieron con copolímero de ácido metacrílico acrilato de etilo (EUDRAGIT® L 30 D-55) como un polímero entérico, citrato de trietilo como un plastificante, monoestearato de glicerilo como un deslizante, polisorbato-80 como un emulsionante y agua como un diluyente. El recubrimiento se realizó usando un sistema de lecho fluido en un solo turno de trabajo. Los gránulos de capas de P3A con recubrimiento entérico se secaron durante la noche a temperatura ambiente en bandejas y se tamizaron a través de un tamiz de 1,6 mm antes del envasado como gránulos a granel en bolsas de PE y recipientes de PE. Los gránulos en capas de P3A con recubrimiento entérico se almacenaron a 5 ± 3 °C para su procesamiento adicional.

Los gránulos de capas de P3A con recubrimiento entérico se encapsularon en cápsulas de gelatina dura usando un rellenedor de cápsulas automatizado con una unidad de transporte y dosificación de cápsulas para llenar cápsulas de tamaño 0. Las cápsulas finales de liberación retardada de P3A, se empaquetaron 75 mg como producto de fármaco a granel en bolsas de PE y recipientes de PE y se almacenaron a 5 ± 3 °C listos para su envío.

En un procedimiento manual separado para fabricar cápsulas de liberación retardada de P3A, 25 mg, los gránulos en capas de P3A entérico se encapsularon en cápsulas de gelatina dura usando una balanza analítica, un embudo de llenado de cápsulas para llenar el tamaño de 0 cápsulas. La cápsula final de liberación retardada de P3A, se empaquetaron 25 mg como producto de fármaco a granel en bolsas de PE y recipientes de PE y se almacenaron a 5 ± 3 °C listos para su envío.

Las cápsulas de liberación retardada de P3A, destinadas para su uso en ensayos clínicos y estudios de estabilidad, se empaquetaron en una botella redonda de polietileno de alta densidad (HDPE) de 100 cc con cierres a prueba de niños de polipropileno (PP) de 38 mm, con un sello de inducción.

Durante la fabricación, una lista de controles en procedimiento, como se muestra en la Tabla 1, se emplearon para las cápsulas de liberación retardada de P3A, 75 mg y 25 mg. Estas pruebas se realizaron en gránulos de liberación retardada de P3A fabricados antes de la encapsulación.

Tabla 1: Controles en procedimiento de fabricación de cápsulas de liberación retardada de P3A

Prueba	Etapas en procedimiento	Procedimiento de prueba	Especificación
Apariencia	Revestimiento post-entérico	Visual	Blanco a ligeramente amarillento, esférico y de tamaño uniforme, fluye libremente
Distribución del Tamaño de Partícula	Revestimiento post-entérico	USP	Informado
Actividad biológica por Ensayo CENTA	Revestimiento post-entérico	QKY24701	12,6-19,0 % (80-120 % de reivindicación de etiqueta)

Como control, las cápsulas de placebo que contienen tampón de placebo también se produjeron usando un procedimiento esencialmente idéntico al de las cápsulas de liberación retardada de P3A. Específicamente, las cápsulas de placebo se fabricaron de acuerdo con los registros de lotes similares a la cápsula de liberación retardada de P3A, 75 mg de producto de fármaco.

Las cápsulas finales de placebo se envasaron como producto a granel en bolsas de PE y recipientes de PE y se almacenaron a 5 ± 3 °C listos para su envío. Las cápsulas de placebo destinadas a su uso en ensayos clínicos se empaquetaron en una botella redonda de 100 cc de HDPE con cierres a prueba de niños de 38 mm PP, con un sello de inducción.

Durante la fabricación de las cápsulas de placebo, una lista de controles en procedimiento, como se muestra en la Tabla 2, también se emplearon. Las pruebas se realizaron en las pastillas de placebo antes de la encapsulación.

Tabla 2: Controles en procedimiento de fabricación de cápsulas de placebo de P3A

Prueba	Etapas en procedimiento	Procedimiento de prueba	Especificación
Apariencia	Revestimiento post-	Visual	Blanco a ligeramente amarillento, esférico

	entérico		y de tamaño uniforme, fluye libremente
Distribución del Tamaño de Partícula	Revestimiento post-entérico	USP	Informado
Actividad biológica por Ensayo CENTA	Revestimiento post-entérico	QKY24701	≤ Límite de detección (<1 % de la reivindicación de etiqueta)

Además, se fabricó un lote no GMP de gránulos de liberación retardada P3A para su uso no clínico usando el mismo flujo de procedimiento que se describe en la Figura 1A, con la excepción de la encapsulación final de gránulos por parte del fabricante. En cambio, los gránulos de liberación retardada P3A a granel se probaron y se almacenaron a granel. Posterior a la prueba de liberación para su uso no clínico, el lote sin GMP se encapsuló en cápsulas de gelatina dura de tamaño 0 y se colocó en un estudio de estabilidad

Ejemplo 2: Composición y apariencia de los gránulos y cápsulas de liberación retardada P3A

La forma de dosificación de P3A es una cápsula de gelatina dura o una cápsula de hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) cargada de gránulos de liberación retardada. La cápsula es blanca opaca o blanca y es de tamaño 0. La cápsula de liberación retardada contiene gránulos compuestos de esferas de sacarosa recubiertas con una capa interna de sustancia farmacológica P3A en los excipientes y una capa externa entérica sensible al pH en los excipientes. Los gránulos están diseñados para comenzar a disolverse en el intestino delgado superior a medida que el pH sube por encima de 5,5, liberando la sustancia del fármaco.

La lista de componentes y las cantidades en cápsulas de liberación retardada P3A (concentración de 75 mg y 25 mg) y cápsulas de placebo se proporcionan en la Tabla 3. Para las cápsulas de liberación retardada de P3A de 75 mg y 25 mg, los gránulos del mismo lote de fabricación se encapsularon a la concentración de cápsula deseada, de manera que el porcentaje de cada componente sea idéntico. Para las cápsulas de placebo, los gránulos de placebo se encapsularon para coincidir con el nivel de excipiente de capa entérica EUDRAGIT® L 30 D-55 (20,8 %) de la cápsula de liberación retardada P3A, 75 mg de producto de fármaco.

Tabla 3: Composición de las cápsulas de liberación retardada de P3A, 75 mg y 25 mg, y cápsula de placebo

Componente	Cápsula de 75 mg		Cápsula de 25 mg		Cápsula placebo	
	mg	% Total	mg	% Total	mg	% Total
Esfera de sacarosa	110,8	23,3	36,9	23,3	139,8	29,5
Hidroxipropilcelulosa	166,3	35,0	55,4	35,0	209,6	44,2
EUDRAGIT® L 30 D-55	98,9	20,8	33,0	20,8	98,7	20,8
P3A	75,0	15,8	25,0	15,8	-	-
Sales tampón	7,5	1,6	2,5	1,6	9,4	2,0
Monoestearato de glicerilo	4,9	1,0	1,6	1,0	4,9	1,0
Polisorbato-80	2,0	0,4	0,7	0,4	2,0	0,4
Citrato de trietilo	9,9	2,1	3,3	2,1	9,9	2,1
Subtotal	475,3	100,0	158,4	100,0	474,3	100,0
Cápsula de gelatina dura n.º 0 o cápsula de hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC)	96,0		96,0		96,0	
Total	571,3		254,4		570,3	

En la Figura 1B se muestran fotografías representativas de gránulos y cápsulas de liberación retardada P3A. Los gránulos eran esferas uniformes de 1,0 a 1,3 mm de diámetro, con una apariencia suave. Las cápsulas de tamaño 0 se cargaron con los gránulos. Cada cápsula contenía aproximadamente 75 mg de P3A (15-16 % de P3A/gránulo) con un peso de aproximadamente 475 mg de producto de fármaco de gránulos activo + 96 mg de peso de cápsula vacía, para un total de aproximadamente 571 mg.

Ejemplo 3: Perfil de disolución de pH de gránulos de liberación retardada de P3A y estabilidad de los gránulos de liberación retardada de P3A en quimo humano

Los gránulos de P3A con recubrimiento entérico (como se formulan en los Ejemplos 1 y 2) se mantuvieron en una solución de HCl 0,1 M durante 2 horas seguido de incubación en tampones que tienen un pH de 5,5, 5,8 o 6,8 de 15 a 240 minutos. Se tomaron alícuotas a los 15, 30 y 45 minutos y a los 45 minutos, 1, 2, 3 y 4 horas para las muestras de pH 5,5 y 5,8 y a las 1,2, 3 y 4 horas para las muestras de pH 6,8. Todas las alícuotas de muestra se analizaron para determinar la actividad de betalactamasa usando el ensayo cromatogénico CENTA.

Como se muestra en la Figura 2, los gránulos con recubrimiento entérico P3A se protegieron a pH bajo, mientras

que la disolución se produjo a un pH superior a 5,5, mostrando pH 5,8 y 6,8 una disolución más rápida que pH 5,5.

Ejemplo 4: Estabilidad de los gránulos de liberación retardada de P3A en quimo humano

Se evaluó la estabilidad de los gránulos de P3A (como se formuló en los Ejemplos 1 y 2) en quimo humano a 37 °C. Específicamente, los gránulos de P3A se incubaron en cinco especímenes de quimo diferentes. Se tomaron alícuotas a las 0, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5 y 6 horas y se midió la actividad de betalactamasa usando un sustrato CENTA de betalactamasa. La Tabla 4 muestra las características de las cinco muestras de quimo usadas.

Tabla 4. Especímenes de Quimo

Especímen	pH	% de Líquido	Actividad de proteasa (mU/ml)
Quimo 1	6,42	55	5,57
Quimo 2	5,98	57	8,96
Quimo 3	5,58	57	6,63
Especímen	pH	% de Líquido	Actividad de proteasa (mU/ml)
Quimo 4	6,26	66	6,21
Quimo 5	6,56	78	6,56

El porcentaje de actividad en relación con el tiempo de actividad máxima se calculó para cada ensayo de réplica en cada quimo y los valores se representaron con GraphPad Prism 5.0. El cambio relativo medio en la absorbancia a 405 nm (ΔA_{405}) medido en cada punto de tiempo para todos los especímenes de quimo que muestran la liberación y la estabilidad relativa de la actividad de betalactamasa P3A se presenta en la Figura 3.

Como se muestra en la Figura 3, La actividad de la betalactamasa P3A fue relativamente estable cuando se evaluó en todas las muestras de quimo bruto con menos del 50 % de pérdida en la actividad general después de 6 horas de incubación. La actividad máxima se detectó en 30 minutos en cuatro de los cinco especímenes de quimo, indicando que los gránulos se habían disuelto completamente dentro de los primeros 30 minutos de incubación en estas muestras de quimo. En quimo humano, los gránulos de P3A mostraron una rápida disolución, dentro de 30-60 minutos. Se observó actividad de P3A de alto nivel durante al menos 6 horas, demostrando la estabilidad de la enzima P3A en quimo humano.

La estabilidad de P3A en quimo humano se evaluó en muestras de especímenes brutos y clarificados. Las incubaciones de P3A a 37 °C en los especímenes de quimo se realizaron por triplicado para cada espécimen de quimo (1 a 5) y la matriz de quimo mixta. Las muestras se retiraron a los 0, 30, 60, 120, 180, 240, 300 y 360 minutos y se analizaron para determinar la actividad enzimática de betalactamasa usando un sustrato de betalactamasa CENTA. La actividad betalactamasa de las muestras de quimo/P3A se determinó basado en el cambio de absorbancia a 405 nm por minuto ($\Delta A_{405}/\text{min}$) en el primer minuto (porción lineal) de la reacción. Los valores de $\Delta A_{405}/\text{min}$ se normalizaron a una longitud de camino de 1 cm dividiendo el valor de $\Delta A_{405}/\text{min}$ por la longitud de camino determinada. La media de los valores de $\Delta A_{405}/\text{min}$ normalizados de las repeticiones individuales para cada espécimen de quimo se usó para calcular la actividad relativa de betalactamasa en cada punto de tiempo.

Como se muestra en la Tabla 5, la actividad de la betalactamasa P3A fue menos estable en el quimo clarificado 1, mostrando una vida media de 243 minutos. La estabilidad relativa en las otras matrices fue mayor de 5 horas (300 minutos) para los quimos 2, 4, 5 y quimo mixto y mayor de 6 horas (360 minutos) para el quimo 3.

Tabla 5. Semivida de la actividad de betalactamasa P3A en quimo clarificado

Matriz	$T_{1/2}$ (min)
Quimo 1	243
Quimo 2	342
Quimo 3	394(a)
Quimo 4	334
Quimo 5	328
Quimo mixto	325

(a) la semivida para el espécimen de quimo 3 se extrapola de la ecuación lineal de $y = -0,1621x + 113,94$ generada por regresión lineal del porcentaje de actividad de 120 min (el punto justo antes del cual se observó inicialmente una disminución de la actividad) a 360 min.

Ejemplo 5: Degradación de ceftriaxona mediada por gránulos de P3A

La actividad enzimática betalactamasa de los gránulos formulados que contienen P1A o P3A (SYN-004) se determinó usando un ensayo bioquímico *in vitro* con ceftriaxona como sustrato. Los gránulos se formularon como se

describió previamente en los Ejemplos 1 y 2. Específicamente, P1A y P3A se disolvieron de gránulos formulados en 50 mM de tampón fosfato potásico 6,8 tampón (los gránulos fabricados con el fármaco P1A o P3A se secaron por pulverización sobre núcleos de sacarosa, luego se seca por pulverización con una capa entérica protectora). La concentración de P1A y P3A en el tampón de disolución se determinó por procedimientos analíticos de HPLC y se evaluó la actividad enzimática betalactamasa de los gránulos disueltos para determinar la hidrólisis de ceftriaxona usando un ensayo bioquímico *in vitro*.

Como se muestra en la Figura 5, P3A (también conocido como SYN-004) demostró una tasa catalítica de ceftriaxona 3,4 veces mayor que P1A, con un valor medio de k_{cat} de 139 seg^{-1} a tres concentraciones de P3A en comparación con un valor medio de k_{cat} de 40,9 seg^{-1} para P1A. La actividad del material disuelto P1A y P3A para la hidrólisis de ceftriaxona fue comparable a la de los patrones de referencia de sustancia farmacológica respectivos para cada una de las betalactamasas.

Ejemplo 6: Protección de microbioma mediada por P3A

La capacidad de P3A para proteger el microbioma intestinal del daño inducido por ceftriaxona (CRO) se evaluó en un estudio preliminar en cerdos humanizados. El diseño del estudio y la línea de tiempo se muestran en las Figuras 7 y 8, respectivamente.

El tracto gastrointestinal (GI) de cerdos gnotobióticos de 5 días de edad se pobló con microflora fecal adulta humana. Dos días después, los animales recibieron antibióticos (clindamicina o CRO, IP, 50 mg/kg) durante 4 días. P3A se administró por vía oral 4 veces al día (75 mg/dosis) durante 7 días a partir del día anterior a la administración de CRO. Específicamente, las cápsulas de liberación retardada de P3A como se describe en los Ejemplos 1 y 2 se administraron a los animales. *C. difficile* (2,6 x 10⁶ ufc) se administró por vía oral a todos los animales el Día 13. Las heces se recogieron los Días 11, 12, 14, 18, 20 directamente del recto usando hisopos de algodón estériles y en la necropsia el Día 21 directamente del tracto intestinal. El ADN se aisló de las heces y se sometió a una secuenciación de alto rendimiento de la región del gen V1V2 de ARNr 16S para monitorizar los cambios en el microbioma. Los niveles de una población bacteriana específica que se espera que sea sensible a CRO, pero no a clindamicina, aerobios resistentes a la ampicilina, incluyendo los del filo *Proteobacteria*, se evaluaron colocando cantidades iguales de heces del Día 21 en placas LB+amp. La Toxina A de *C. difficile* fecal y la interleucina-8 (IL8) se evaluaron mediante ELISA como medida de infección por *C. difficile* (CDI). Los tractos intestinales recogidos en la necropsia el Día 21 se evaluaron histológicamente para detectar signos de CDI.

Ninguno de los animales mostró evidencia de CDI típica, basado en la falta de histopatología típica de CDI y resultados ELISA negativos para Toxina A de *C. difficile* e IL8 y cultivos fecales negativos para *C. difficile*. Dos animales estaban enfermos, el Cerdo 9 del Grupo 1 y el Cerdo 8 del Grupo 2. El Cerdo 9 no ganó peso y el Cerdo 8 estaba moribundo y se sacrificó el Día 14, después de la infección por *C. difficile*. Sin embargo, la CDI no se confirmó en el Cerdo 8 ni en ningún animal de estudio.

La Figura 9 muestra las clasificaciones taxonómicas a nivel de filo de las bacterias presentes en las muestras de ADN fecal recogidas el Día 14. El Grupo 1 muestra solo el Cerdo 2, ya que el Cerdo 9 no prosperó. El Grupo 1 (sin antibióticos) y el Grupo 4 (CRO + P3A, es decir, SYN-004) parecía similar y mostró una buena representación de Bacteroidetes, Proteobacterias y Firmicutes, mientras que el Grupo 2 (clindamicina) y el Grupo 3 (CRO solo) mostraron disbiosis, con Bacteroidetes como el filo predominantemente grande con poca o ninguna representación de Firmicutes. Los datos de LB+amp (Figuras 10A y 10B) corroboraron estos descubrimientos, ya que el Grupo 1, el Grupo 2 y el Grupo 4 mostraron niveles de bacterias similares, altos, mientras que el Grupo 3 (CRO solo) mostró al menos dos niveles logarítmicos inferiores, sugiriendo una reducción en la población de Proteobacterias. De forma notable, no se esperaba que clindamicina (Grupo 2) afectara los aerobios resistentes a ampicilina, incluyendo aquellas del filo *Proteobacteria* y principalmente mató a las bacterias anaerobias incluyendo aquellas del filo Firmicutes. Los niveles de Proteobacterias presentes en los Grupos 1, 2 y 4 fueron similares (Figura 9), y Firmicutes estuvo ausente del microbioma del Grupo 2, consistente con esta hipótesis.

Estos datos demuestran que P3A puede proteger el microbioma humano y puede utilizarse como una terapia profiláctica diseñada para prevenir el daño del microbioma mediado por antibióticos, incluyendo CDI, en pacientes que reciben antibióticos betalactámicos

Ejemplo 7: Análisis genómico de la protección de microbioma mediada por P3A

Para estudiar la capacidad de P3A para proteger el microbioma intestinal del daño inducido por antibióticos (por ejemplo, inducido por ceftriaxona (CRO)), las muestras fecales de cerdo obtenidas del estudio descrito anteriormente se sometieron a análisis genómico adicional. Específicamente, se secuenció la región del gen V1V2 ARNr 16S. Además, el ADN fecal se sometió a secuenciación aleatoria del genoma completo. La secuenciación aleatoria se realizó utilizando Illumina HiSeq RAPID RUN, dirigido a una lectura única de 100 pb con el objeto de lograr aproximadamente 10-20 millones de lecturas por muestra (Tabla 6).

Tabla 6. Estadísticas de datos de secuenciación aleatoria

Archivo	Número de lecturas	Recuentos de restos totales	Lectura mín len	Lectura máx len	Lectura promedio len
3799_112_S7.fasta (G1-P2)	18606077	1854356507	35	101	99,66
3799_217_S8.fasta (G2-P2)	20883580	2084703775	35	101	99,83
3799_315_S9.fasta (G3-P5)	20071353	2011723470	35	101	100,23
3799_316_S10.fasta (G3-P6)	22624519	2271889933	35	101	100,42
3799_4110_S11.fasta (G4-P10)	13712842	1377348829	35	101	100,44
3799_4111_S12.fasta (G4-P11)	20530800	2061344856	35	101	100,4
3799_4112_S13.fasta (G4-P12)	20580238	2068107187	35	101	100,49
3799_G1_P2_10232014_S3.fasta	10252196	1001456689	35	101	97,68
3799_G1_P2_10302014_S1.fasta	59592542	5977858476	35	101	100,31
3799_G2_P7_10232014_S7.fasta	24946417	2491552712	35	101	99,88
3799_G2_P7_10302014_S1.fasta	22924500	2295666225	35	101	100,14
3799_G2_P8_10232014_S6.fasta	16156948	1608989121	35	101	99,58
3799_G3_P5_10232014_S8.fasta	6940*	693554	35	101	99,94
3799_G3_P5_10302014_S2.fasta	33082874	3320035662	35	101	100,36
3799_G3_P6_10232014_S4.fasta	22064444	2168570854	35	101	98,28

(continuación)

Archivo	Número de lecturas	Recuentos de restos totales	Lectura mín len	Lectura máx len	Lectura promedio len
3799_G3_P6_10302014_S3.fasta	13521358	1357435510	35	101	100,39
3799_G4_P10_10232014_S9.fasta	5389698	541060355	35	101	100,39
3799_G4_P10_10302014_S2.fasta	17012060	1695792860	35	101	99,68
3799_G4_P11_10232014_S6.fasta	19738*	1973281	35	101	99,97
3799_G4_P11_10302014_S4.fasta	25764488	2579825095	35	101	100,13
3799_G4_P12_10232014_S5.fasta	76649703	7681797089	35	101	100,22
3799_G4_P12_10302014_S5.fasta	3312789	332575801	35	101	100,39

*Estos dos conjuntos de datos contenían muy pocas lecturas de secuenciación en comparación con los otros conjuntos de datos y se eliminaron de los análisis comparativos

Estos datos de secuenciación se clasificaron taxonómicamente para identificar comunidades microbianas asociadas a las muestras fecales de cerdo. La clasificación taxonómica se realizó utilizando algoritmos bioinformáticos y bases de datos genómicas curadas. Brevemente, las lecturas de secuenciación aleatoria brutas, sin ensamblar se sondearon contra bases de datos bacterianas y víricas curadas de GeneBank usando el paquete de software GENIUS para la identificación rápida de comunidades de bacterias, así como su abundancia relativa (Hasan y col., 2014, PLoS ONE 9:e97699; Lax y col., 2014, Science 345:1048). Los análisis identificaron 139 cepas bacterianas, 79 especies y 35 géneros entre los grupos de tratamiento (Tabla 7).

Tabla 7. Número de taxones detectados

ID de la muestra	Número de taxones detectados
3799_112_S7.fasta (G1-P2)	46
3799_217_S8.fasta (G2-P2)	9
3799_315_S9.fasta (G3-P5)	27
3799_316_S10.fasta (G3-P6)	58
3799_4110_S11.fasta (G4-P10)	51
3799_4111_S12.fasta (G4-P11)	23
3799_4112_S13.fasta (G4-P12)	57
3799_G1_P2_10232014_S3.fasta	56
3799_G1_P2_10302014_S1.fasta	55
3799_G2_P7_10232014_S7.fasta	11
3799_G2_P7_10302014_S1.fasta	8
3799_G2_P8_10232014_S6.fasta	6
3799_G3_P5_10232014_S8.fasta	1
3799_G3_P5_10302014_S2.fasta	27
3799_G3_P6_10232014_S4.fasta	62
3799_G3_P6_10302014_S3.fasta	49
3799_G4_P10_1023_2014_S9.fasta	52

3799_G4_P10_10302014_S2.fasta	48
3799_G4_P11_10232014_S6.fasta	2
3799_G4_P11_10302014_S4.fasta	20
3799_G4_P12_10232014_S5.fasta	66
3799_G4_P12_10302014_S5.fasta	19

La distribución relativa de los taxones bacterianos entre los diferentes grupos de tratamiento se muestra en la Tabla 8.

Tabla 8. Distribución relativa de taxones bacterianos entre los grupos de tratamiento

Grupos	G1	G2	G3	G4
Cepa/subespecie	71	17	102	112
Especie	59	12	70	71
Género	27	7	32	30

Los análisis comparativos de metagenómica se realizaron mediante la creación de mapas de calor basados en la abundancia relativa de cada cepa bacteriana en cada muestra (véase la Figura 11) y a nivel de género bacteriano (véase la Figura 12) usando el paquete de software NMF R (Gaujoux y Seoighe, 2010, BMC Bioinformatics, 11:367). Las muestras se agruparon usando la función de distancia máxima y el algoritmo de agrupación jerárquica Ward. La función de distancia se usó para medir la diferencia en la composición entre cada una de las muestras. El algoritmo de agrupamiento usó las distancias entre cada una de las muestras para crear un dendrograma que agrupaba las muestras con composiciones similares, incluyendo tanto la presencia como la ausencia de organismos, en los mismos clados. Basándose en comparaciones de cepas bacterianas (Figura 11), se agruparon las muestras del Grupo 1 (Control) y del Grupo 4 (Ceftriaxona más P3A), resaltado por el recuadro azul (Figura 11) que indica que los Grupos 1 y 4 fueron más similares entre sí que los Grupos 2 (Clindamicina) y 3 (Ceftriaxona sola). Estos datos sugieren que P3A funcionó para proteger el microbioma de los efectos de la ceftriaxona (Grupo 3) manteniendo el microbioma más como el grupo de control (Grupo 1) que no estuvo expuesto a antibióticos.

También se realizaron análisis comparativos de metagenómica para investigar los cambios en el microbioma a través de diferentes grupos de tratamiento. Para estos análisis, el procedimiento de clasificación del centroide del paquete PamR (Tibshirani y col., 2002, PNAS 99:6567), se usó para comparar la frecuencia promedio (abundancia absoluta) de cada cepa bacteriana en las muestras. La desviación del centroide de cada cepa bacteriana de cada grupo de estudio fue graficada por el centroide general de todos los grupos de estudio (Figura 13).

Como el número de lecturas de secuencia generadas a partir de cada muestra individual fue variable, se eligieron submuestras de cada muestra para representar un subconjunto de 10 millones de lecturas. Esto se hizo para evitar cualquier sesgo debido a diferentes tamaños de muestra y para permitir la medición de la abundancia absoluta de los organismos bacterianos en las muestras. Usando estos subconjuntos para reducir el sesgo, los análisis comparativos de metagenómica se realizaron como se describió previamente para la Figura 13 al representar gráficamente la desviación del centroide de cada cepa bacteriana de cada grupo de estudio por el centroide general de todos los grupos de estudio (Figura 14). Los datos demuestran que el Grupo 4 (Ceftriaxona más P3A) muestra una distorsión menos severa de la abundancia de especies que el Grupo 2 (Clindamicina) o el Grupo 3 (Ceftriaxona sola) en comparación con el Grupo 1 (Control), lo que indica que P3A protegió el microbioma del daño mediado por antibióticos.

La clasificación centroide de los subconjuntos de muestras también se realizó a nivel de especie bacteriana comparando la desviación promedio de la frecuencia de cada especie bacteriana en el Grupo 3 (Ceftriaxona) y el Grupo 4 (Ceftriaxona más P3A) con el Grupo 1 (Control) (Figura 15). De forma notable, el Grupo 3 (ceftriaxona sola) mostró una representación insuficiente de *Turicibacter* spp y un exceso de la arquea metanogénica, *Methanobrevibacter smithii*, mientras que el Grupo 4 (Ceftriaxona más P3A) mostró niveles de abundancia similares de *Turicibacter* spp y *M. smithii* como el Grupo 1 (Control). La reducción de *Turicibacter* spp. se asocia a enfermedad inflamatoria intestinal idiopática y diarrea hemorrágica aguda en perros (Minamoto y col., 2015, Gut Microbes 6(1), 33-47; Rossi y col., 2014, PLoS ONE 9(4), e94699) mientras que *M. smithii* es una especie de arquea metanogénica que se informó que está relacionada con el estreñimiento, al síndrome del intestino irritable y la obesidad (Pimentel y col., 2002, Am. J. Gastroenter. Supple. 1:28). En conjunto, estos datos demuestran que P3A protegió la microflora intestinal de los efectos adversos del uso de antibióticos. Específicamente, estos datos demuestran que P3A protege al microbioma de una pérdida de *Turicibacter* spp y de una sobreabundancia de metanógenos, que fueron inducidos por el tratamiento con ceftriaxona. Por lo tanto, una pérdida de *Turicibacter* spp y la proliferación de metanógenos parecen ser cambios inducidos por antibióticos en la microflora intestinal que pueden prevenirse mediante el uso de P3A.

Además, la clasificación del centroide de los subconjuntos de muestras se realizó a nivel de especie bacteriana comparando la desviación promedio de la frecuencia de las especies bacterianas anaerobias y aeróbicas facultativas de la frecuencia única promedio de las especies en todos los grupos (Figura 16). Los datos demuestran que el Grupo 4 (Ceftriaxona más P3A) mostró un patrón más similar de especies bacterianas aeróbicas anaerobias y

facultativas al del Grupo 1 (Control) que el Grupo 2 (Clindamicina) o el Grupo 3 (Ceftriaxona sola) cuando se comparan con el Grupo 1 (Control). la clasificación del centroide de los subconjuntos de muestras también se realizó a nivel de especie bacteriana comparando la desviación promedio de la frecuencia de las especies bacterianas aeróbicas obligadas de la frecuencia única promedio de las especies en todos los grupos (Figura 17). Se observaron cambios en todos los grupos, sin embargo, el Grupo 4 (Ceftriaxona más P3A) mostró un patrón diferente de especies bacterianas que el Grupo 3 (Ceftriaxona sola) indicando que P3A cambió el patrón de cambios inducidos por antibióticos en la microflora intestinal del cerdo. Estos datos indican que P3A pudo modificar el efecto de los antibióticos en el microbioma intestinal protegiendo a las especies bacterianas anaerobias y aeróbicas facultativas de los cambios mediados por antibióticos.

La clasificación del centroide de los subconjuntos de muestras también se realizó a nivel de especie bacteriana comparando la desviación promedio de la frecuencia de especies bacterianas grampositivas de la frecuencia promedio única de especies en los Grupos 1,3 y 4 (Figura 18) y comparado con la frecuencia promedio única de las especies del Grupo 1 (Figura 10). De forma similar, la clasificación del centroide de los subconjuntos de muestras también se realizó a nivel de especie bacteriana comparando la desviación promedio de la frecuencia de especies bacterianas gramnegativas de la frecuencia promedio única de especies en los Grupos 1, 3 y 4 (Figura 20) y comparado con la frecuencia promedio única de las especies del Grupo 3 y el Grupo 4 (Figura 21). Los datos demuestran que los organismos grampositivos son sobreabundantes en la cohorte tratada con P3A mientras que los organismos gramnegativos son menos abundantes en el grupo tratado con P3A en comparación con el grupo tratado solo con antibióticos (Grupo 3) o el grupo control no tratado (Grupo 1).

En total, estos estudios indican, entre otros, que P3A (es decir, SYN-004) protegió el microbioma de los cambios inducidos por antibióticos. P3A combatió los efectos de los antibióticos sobre la composición y la carga del microbioma intestinal en comparación con el tratamiento con antibióticos solos. De forma notable, P3A combatió el exceso de metanógenos, específicamente *M. smithii*, que es un cambio inducido por antibióticos en la microflora intestinal. *M. smithii* está asociado al estreñimiento, al síndrome del intestino irritable y la obesidad (Pimentel y col., 2012, Am. J. Gastroent. Supp. 1:28). P3A también evitó la reducción en la abundancia de *Turicibacter* spp., otro cambio inducido por antibióticos a la microflora que se asocia a enfermedad inflamatoria intestinal idiopática y diarrea hemorrágica aguda en perros (Minamoto y col., 2015, Gut Microbes 6(1), 33-47; Rossi y col., 2014, PLoS ONE 9(4), e94699).

Ejemplo 8. P3A no afecta los niveles sistémicos de ceftriaxona

Se realizó otro estudio en cerdos para determinar si la administración oral de P3A (es decir, SYN-004) tuvo algún efecto sobre los niveles sistémicos de antibióticos. Para este estudio, diez lechones Yorkshire, de aproximadamente 2 meses de edad y con un peso aproximado de 20 kg fueron tratados con ceftriaxona intravenosa (CRO) a 50 mg/kg una vez al día durante siete días. Cinco animales también recibieron cápsulas de P3A (1 cápsula que contiene 75 mg de P3A, cuatro veces al día) comenzando el día antes del tratamiento con CRO y extendiéndose hasta un día después del tratamiento con CRO, por un total de nueve días. Específicamente, las cápsulas de liberación retardada de P3A como se describe en los Ejemplos 1 y 2 se administraron a los animales. En el día 2, los animales fueron anestesiados y se extrajeron aproximadamente 9 ml de sangre de la vena cava en tres puntos temporales, 1 hora, 6 horas y 19 horas después de la administración de CRO. La sangre se dispensó inmediatamente en un tubo de vacío separador de suero. Después de la coagulación, las muestras se centrifugaron y el suero se transfirió a un criovial y se almacenó a -80 °C hasta el análisis. Se cuantificó CRO en las muestras de suero usando un ensayo de cromatografía líquida de alto rendimiento validado (Owens y col., 2001, Int. J. Antimicrobial Agents, 17:483). Se preparó una curva patrón para CRO en suero de cerdo de control negativo (no tratado) y contenía 6 puntos que variaban de 0,5 a 50 ug/ml. El ensayo fue lineal en un intervalo de 0,5 a 50 ug/ml. Como se muestra en la Figura 22, en el punto de tiempo de una hora, los niveles séricos de CRO fueron $79,43 \pm 12,08$ ug/ml para el grupo tratado con CRO solo y $76,28 \pm 15,83$ ug/ml para el grupo tratado con CRO + P3A. En 6 horas, los niveles séricos de CRO fueron $5,83 \pm 1,15$ ug/ml para el grupo tratado con CRO solo y $3,76 \pm 1,01$ ug/ml para el grupo tratado con CRO + P3A (Figura 22). Estos datos demuestran que P3A no tuvo ningún efecto sobre los niveles pico de CRO en los animales tratados y poco o ningún efecto sobre los niveles de punto de tiempo de 6 horas. Las muestras de suero tomadas a las 19 horas después del tratamiento con CRO estaban por debajo del límite de detección del ensayo (0,5 ug/ml). Estos datos demuestran que la administración oral de P3A tuvo poco o ningún efecto en los niveles séricos de CRO en cerdos, lo que sugiere que P3A no se absorbió por vía sistémica y no interferirá con la eficacia de los antibióticos.

Ejemplo 9: Formulaciones adicionales de P3A

Se fabrica una cápsula P3A de tamaño 0 o tamaño 1 con 200 mg del medicamento para aumentar la carga de fármaco P3A y/o reducir el tamaño de la cápsula llena de gránulos de P3A. Específicamente, el P3A se combina con un látex u otro polímero, y después se forma una preparación enzimática microencapsulada particulada, sin usar un núcleo de sacarosa. Opcionalmente, Las microesferas están cubiertas con un recubrimiento entérico dependiente del pH.

Se usan tres enfoques para fabricar esta formulación (Figura 6). En primer lugar, se desarrolla una partícula que tiene funcionalidad entérica (por ejemplo, no se libera en el estómago, liberación completa en el intestino delgado)

integrado en la propia matriz, para reducir la carga de excipiente. Opcionalmente, se añade un recubrimiento entérico a las partículas para proporcionar protección contra las condiciones ácidas.

Una diversidad de enfoques para generar partículas (tales como microesferas, agregados, otros) son conocidos que son susceptibles de la inclusión de proteínas. Normalmente implican al menos dos fases, una que contiene la proteína y otra que contiene un polímero que forma la estructura de las partículas. Las más comunes son la coacervación, en la que se hace que el polímero se separe de su fase solvente mediante la adición de un tercer componente, o emulsiones de fase múltiple, tales como emulsión de agua en aceite en agua (w/o/w) en la que la fase de agua interna contiene la proteína, la fase orgánica intermedia contiene el polímero y los estabilizantes externos de la fase acuosa que soportan la doble emulsión w/o/w hasta que los disolventes pueden retirarse para formar las microesferas.

Como alternativa, la proteína P3A y los excipientes estabilizantes (por ejemplo, trehalosa, manitol, Tween 80, alcohol polivinílico) se combinan y pulverizan a partir de una solución acuosa y se recogen. Las partículas se suspenden en un disolvente seco, orgánico inmiscible en agua que contiene polímero y compuestos modificadores de la liberación, y la suspensión se somete a ultrasonidos para dispersar las partículas. La proteína P3A retiene su actividad después de este procedimiento.

Un enfoque adicional usa fases acuosas pero no disolvente orgánico. Aquí, la enzima, los componentes tamponantes, un látex polimérico y excipientes estabilizantes y modificadores de la liberación se disuelven/dispersan en agua. La dispersión acuosa se seca por pulverización, dando lugar a la coalescencia del látex e incorporación de la proteína y los excipientes en partículas del látex coalescente. Cuando los modificadores de liberación son insolubles en condiciones ácidas pero solubles a pH más altos (tales como ácido carboxílico) la liberación de la matriz se inhibe en el entorno gástrico.

Definiciones

Como se usa en el presente documento, "un", "una" o "el/la" pueden significar uno o más de uno.

Además, el término "aproximadamente" cuando se usa en relación con una indicación numérica referenciada significa la indicación numérica referenciada más o menos hasta un 10 % de esa indicación numérica referenciada. Por ejemplo, el lenguaje "aproximadamente 50 %" cubre el rango del 45 % al 55 %.

Una "cantidad eficaz", cuando se usa en conexión con usos médicos es una cantidad que es eficaz para proporcionar un tratamiento, prevención o reducción medibles en la tasa de patogénesis de un trastorno de interés.

Como se usa en el presente documento, algo se "disminuye" si una lectura de actividad y/o efecto se reduce en una cantidad significativa, tales como al menos aproximadamente el 10 %, al menos aproximadamente el 20 %, al menos aproximadamente el 30 %, al menos aproximadamente el 40 %, al menos aproximadamente el 50 %, al menos aproximadamente el 60 %, al menos aproximadamente el 70 %, al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 90 %, al menos aproximadamente el 95 %, al menos aproximadamente el 97 %, al menos aproximadamente el 98 % o más, hasta e incluyendo al menos aproximadamente el 100 %, en presencia de un agente o estímulo en relación con la ausencia de dicha modulación. Como comprenderá un experto en la materia, en algunas realizaciones, la actividad disminuye y algunas lecturas de corriente abajo disminuirán pero otras pueden aumentar.

Por el contrario, la actividad se "aumenta" si una lectura de actividad y/o efecto se aumenta en una cantidad significativa, por ejemplo en al menos aproximadamente el 10 %, al menos aproximadamente el 20 %, al menos aproximadamente el 30 %, al menos aproximadamente el 40 %, al menos aproximadamente el 50 %, al menos aproximadamente el 60 %, al menos aproximadamente el 70 %, al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 90 %, al menos aproximadamente el 95 %, al menos aproximadamente el 97 %, al menos aproximadamente el 98 % o más, hasta e incluyendo al menos aproximadamente el 100 % o más, al menos aproximadamente 2 veces, al menos aproximadamente 3 veces, al menos aproximadamente 4 veces, al menos aproximadamente 5 veces, al menos aproximadamente 6 veces, al menos aproximadamente 7 veces, al menos aproximadamente 8 veces, al menos aproximadamente 9 veces, al menos aproximadamente 10 veces, al menos aproximadamente 50 veces, al menos aproximadamente 100 veces, en presencia de un agente o estímulo, en relación con la ausencia de dicho agente o estímulo.

Como se menciona en el presente documento, todos los porcentajes de composición son en peso de la composición total, a menos que se especifique otra cosa. Como se usa en el presente documento, la palabra "incluir", y sus variantes, pretende no ser limitante, tal que la recitación de elementos en una lista no excluya otros artículos similares que también pueden ser útiles en las composiciones y procedimientos de esta tecnología. De forma similar, los términos "puede" y "poder" y sus variantes están destinados a ser no limitantes, tal que la recitación de que una realización puede o puede comprender ciertos elementos o características no excluye otras realizaciones de la presente tecnología que no contienen esos elementos o características.

Aunque el término abierto "comprende", como un sinónimo de términos tales como que incluye, que contiene o

que tiene, se usa en el presente documento para describir y reivindicar la invención, la presente invención o realizaciones de la misma, alternativamente puede describirse usando expresiones alternativas como "que consiste en" o "que consiste esencialmente en".

Como se usa en el presente documento, las palabras "preferido" y "preferentemente" se refieren a realizaciones de la tecnología que ofrecen ciertos beneficios, bajo ciertas circunstancias. Sin embargo, también pueden preferirse otras realizaciones, bajo la misma u otras circunstancias. Adicionalmente, la recitación de una o más realizaciones preferidas no implica que otras realizaciones no sean útiles, y no pretende excluir otras realizaciones del ámbito de la tecnología.

La cantidad de composiciones descritas en el presente documento necesarias para lograr un efecto terapéutico puede determinarse empíricamente de acuerdo con procedimientos convencionales para el fin particular. Generalmente, para administrar agentes terapéuticos (por ejemplo, betalactamasas y/o agentes terapéuticos adicionales descritos en el presente documento) con fines terapéuticos, los agentes terapéuticos se administran a una dosis farmacológicamente eficaz. Una "cantidad farmacológicamente eficaz", "dosis farmacológicamente eficaz", "cantidad terapéuticamente eficaz" o "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad suficiente para producir el efecto fisiológico deseado o una cantidad capaz de lograr el resultado deseado, particularmente para tratar el trastorno o la enfermedad. Una cantidad eficaz como se usa en el presente documento incluiría una cantidad suficiente para, por ejemplo, retrasar el desarrollo de un síntoma del trastorno o enfermedad, alterar el curso de un síntoma del trastorno o enfermedad (por ejemplo, ralentizar la progresión de un síntoma de la enfermedad), reducir o eliminar uno o más síntomas o manifestaciones del trastorno o enfermedad, y revertir un síntoma de un trastorno o enfermedad. El beneficio terapéutico también incluye detener o ralentizar la progresión de la enfermedad o trastorno subyacente, independientemente de si la mejora se realiza.

Las cantidades eficaces, la toxicidad y la efectividad terapéutica pueden determinarse mediante procedimientos farmacéuticos convencionales en cultivos celulares, muestras de tejido, homogeneizados de tejidos o animales de experimentación, por ejemplo, para determinar la DL50 (la dosis letal para aproximadamente el 50 % de la población) y la DE50 (la dosis terapéuticamente eficaz en aproximadamente el 50 % de la población). La dosificación puede variar dependiendo de la forma de dosificación empleada y la vía de administración utilizada. La relación de dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y puede expresarse como la relación LD50/ED50. En algunas realizaciones, se prefieren composiciones y procedimientos que exhiben grandes índices terapéuticos. Una dosis terapéuticamente eficaz puede estimarse inicialmente a partir de ensayos *in vitro*, incluyendo, por ejemplo, ensayos de cultivo celular. También, puede formularse una dosis en modelos animales para lograr un intervalo de concentración plasmática circulante que incluya la CI50 según se determina en cultivo celular, o en un modelo animal apropiado. Pueden medirse los niveles de las composiciones descritas en plasma, por ejemplo, por cromatografía líquida de alto rendimiento. Los efectos de cualquier dosis particular pueden controlarse mediante un bioensayo adecuado. La dosificación puede determinarse por un médico y ajustarse, según sea necesario, para adaptarse a los efectos observados del tratamiento.

En determinadas realizaciones, el efecto dará como resultado un cambio cuantificable de al menos aproximadamente el 10 %, al menos aproximadamente el 20 %, al menos aproximadamente el 30 %, al menos aproximadamente el 50 %, al menos aproximadamente el 70 % o al menos aproximadamente el 90 %. En algunas realizaciones, el efecto dará como resultado un cambio cuantificable de aproximadamente el 10 %, aproximadamente el 20 %, aproximadamente el 30 %, aproximadamente el 50 %, aproximadamente el 70 % o incluso aproximadamente el 90 % o más. El beneficio terapéutico también incluye detener o ralentizar la progresión de la enfermedad o trastorno subyacente, independientemente de si la mejora se realiza.

Como se usa en el presente documento, los "procedimientos de tratamiento" son igualmente aplicables al uso de una composición para tratar las enfermedades o trastornos descritos en el presente documento y/o composiciones para uso y/o usos en la fabricación de medicamentos para tratar las enfermedades o trastornos descritos en el presente documento.

Referencias

Hasan NA, Young BA, Minard-Smith AT, Saeed K, Li H, Heizer EM, McMillan MJ, Isom R, Abdullah, AS, Bornman DM, Faith SA, Choi SA, Dickens ML, Cebula TA, Colwell RR. (2014). Microbial community profiling of human saliva using shotgun metagenomics sequencing. PLoS ONE 9(5):e97699. Doi:10.1371/journal.pone.0097699.

Lax S, Smith DP, Marcell JH, Owens S, Handley K, Scott K, Gibbons S, Larsen P, Shogan BD, Weiss S, Metcalf JK, Ursell LK, Vazquez-Baeza Y, Treuren VW, Hasan NA, Gibson MK, Colwell RR, Dantas G, Knight R, Gilbert JA. (2014). Longitudinal analysis of microbial interaction between humans and the indoor environment. Science 345, 1048 (2014); DOI:10.1126/science.1254529.

Gaujoux R y Seoighe C. (2010). A flexible R package for nonnegative matrix factorization. BMC Bioinformatics, 11(1), 367.

Tibhirani R, Hastie, T, Narashimhan B y Chu G. (2002). Diagnosis of multiple cancer types by shrunken centroids

of gene expression. PNAS 99(10), 6567-6572.

Pimentel, M, Guynsalus, RP, Rao SS y Zhang, H. (2012). Methanogens in human health and disease. Am. J. Gastroenter. Supp. 1(1), 28-33.

5 Owens, RC, Tessier, P, Nightingale, CH, Ambrose, PG, Quintiliani, R, Nicolau, DP. (2001). Pharmacodynamics of ceftriaxone and cefixime against community-acquired respiratory tract pathogens. Int. J. Antimicrobial Agents 17(6), 483-489.

Pimentel, M, Guynsalus, RP, Rao SS y Zhang, H. (2012). Methanogens in human health and disease. Am. J. Gastroenter. Supp. 1(1), 28-33.

10 Minamoto, Y, Otoni, C.C., Steelman, S.M., Buyukleblebibi, O., Steiner, J.M., Jergens, A.E., Suchodolski, J.S. (2015). Alteration of the fecal microbiota and serum metabolite profiles in dogs with idiopathic inflammatory bowel disease. Gut Microbes 6(1), 33-47.

15 Rossi, G., Pengo, G., Caldin, M., Piccionello, A.P., Steiner, J.M., Cohen, N.D., Jergens, A.E., Suchodolski, J.S. (2014). Comparison of microbiological, histological, and immunomodulatory parameters in response to treatment with either combination therapy with prednisone and metronidazole or probiotic VSL#3 strains in dogs with idiopathic inflammatory bowel disease. PLoS ONE 9(4), e94699.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> SYNTHETIC BIOLOGICS, INC.
Bristol, Andrew
Kaleko, Michael
20 Connelly, Sheila

<120> FORMULACIONES DE BETALACTAMASAS Y USOS DE LAS MISMAS

<130> SYN-007PC

<150> US 62/061.507
<151> 08/10/2014

25 <150> US 62/126.556
<151> 28/02/2015

<150> US 62/205.443
<151> 14/08/2015

<160> 6

30 <170> PatentIn versión 3,5

<210> 1
<211> 264
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> Secuencia sintética

<400> 1

ES 2 806 426 T3

Thr	Glu	Met	Lys	Asp	Asp	Phe	Ala	Lys	Leu	Glu	Glu	Gln	Phe	Asp	Ala	1	5	10	15
Lys	Leu	Gly	Ile	Phe	Ala	Leu	Asp	Thr	Gly	Thr	Asn	Arg	Thr	Val	Ala	20	25	30	
Tyr	Arg	Pro	Asp	Glu	Arg	Phe	Ala	Phe	Ala	Ser	Thr	Ile	Lys	Ala	Leu	35	40	45	
Thr	Val	Gly	Val	Leu	Leu	Gln	Gln	Lys	Ser	Ile	Glu	Asp	Leu	Asn	Gln	50	55	60	
Arg	Ile	Thr	Tyr	Thr	Arg	Asp	Asp	Leu	Val	Asn	Tyr	Asn	Pro	Ile	Thr	65	70	75	80
Glu	Lys	His	Val	Asp	Thr	Gly	Met	Thr	Leu	Lys	Glu	Leu	Ala	Asp	Ala	85	90	95	
Ser	Leu	Arg	Tyr	Ser	Asp	Asn	Ala	Ala	Gln	Asn	Leu	Ile	Leu	Lys	Gln	100	105	110	
Ile	Gly	Gly	Pro	Glu	Ser	Leu	Lys	Lys	Glu	Leu	Arg	Lys	Ile	Gly	Asp				

ES 2 806 426 T3

115		120		125
Glu Val Thr Asn Pro Glu Arg Phe Glu Pro Glu Leu Asn Glu Val Asn				
130		135		140
Pro Gly Glu Thr Gln Asp Thr Ser Thr Ala Arg Ala Leu Val Thr Ser				
145		150		155
Leu Arg Ala Phe Ala Leu Glu Asp Lys Leu Pro Ser Glu Lys Arg Glu				
	165		170	175
Leu Leu Ile Asp Trp Met Lys Arg Asn Thr Thr Gly Asp Ala Leu Ile				
	180		185	190
Arg Ala Gly Val Pro Asp Gly Trp Glu Val Ala Asp Lys Thr Gly Ala				
	195		200	205
Ala Ser Tyr Gly Thr Arg Asn Asp Ile Ala Ile Ile Trp Pro Pro Lys				
210		215		220
Gly Asp Pro Val Val Leu Ala Val Leu Ser Ser Arg Asp Lys Lys Asp				
225		230		235
Ala Lys Tyr Asp Asn Lys Leu Ile Ala Glu Ala Thr Lys Val Val Met				
	245		250	255
Lys Ala Leu Asn Met Asn Gly Lys				
	260			

<210> 2
 <211> 795
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia sintética
 <400> 2

ES 2 806 426 T3

atgactgaga tgaaagatga ttttgcgaag ctggaagaac agtttgacgc aaaattgggc	60
attttcgcgt tggacacggg tacgaatcgt acggttgcct accgtccgga cgagcgcttc	120
gccttcgcga gcacgatcaa agccctgacc gtcggcgtgc tgctccagca aaagagcatc	180
gaggacctga accagcgcat tacctacacc cgtgatgata tggatgaacta taatccgata	240
accgagaaac acgttgatac cggatatgacc ctgaaagaac tggcagatgc aagcctgcgc	300
tacagcgata acgcggctca gaatctgatt ctgaagcaaa tcggtggtcc ggagagcttg	360
aagaaagaac tgcgtaaaat cggcgatgaa gtcactaatc cggagcggtt tgagccggag	420
ctgaacgaag tgaatccggg tgaaacgcaa gacacgagca ccgcgcgtgc gcttgtcacc	480
tccctgcgcg ctttcgcact ggaagataag ctgccgtcgg agaaacgcga gctgctgata	540
gactggatga agcgcaatac gaccggcgac gcgctgattc gtgcggggcgt tccggacggt	600
tgggaagtgg ctgacaagac cgggtgcggcg agctacggca cccgtaacga tatcgcgata	660
atgtggccac ctaaaggatga cccggtcgtg ctggccgtac tgagcagccg tgacaagaaa	720
gacgcaaagt atgataacaa gctgattgca gaggcgacca aagttgttat gaaggcactg	780
aacatgaatg gtaag	795

<210> 3
 <211> 262
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Secuencia sintética
 <400> 3

ES 2 806 426 T3

Glu	Met	Lys	Asp	Asp	Phe	Ala	Lys	Leu	Glu	Glu	Gln	Phe	Asp	Ala	Lys	1	5	10	15
Leu	Gly	Ile	Phe	Ala	Leu	Asp	Thr	Gly	Thr	Asn	Arg	Thr	Val	Ala	Tyr	20	25	30	
Arg	Pro	Asp	Glu	Arg	Phe	Ala	Phe	Ala	Ser	Thr	Ile	Lys	Ala	Leu	Thr	35	40	45	
Val	Gly	Val	Leu	Leu	Gln	Gln	Lys	Ser	Ile	Glu	Asp	Leu	Asn	Gln	Arg	50	55	60	
Ile	Thr	Thr	Arg	Asp	Asp	Leu	Val	Asn	Tyr	Asn	Pro	Ile	Thr	Glu	Lys	65	70	75	80
His	Val	Asp	Thr	Gly	Met	Thr	Leu	Lys	Glu	Leu	Ala	Asp	Ala	Ser	Leu	85	90	95	
Arg	Tyr	Ser	Asp	Asn	Ala	Ala	Gln	Asn	Leu	Ile	Leu	Lys	Gln	Ile	Gly	100	105	110	
Gly	Pro	Glu	Ser	Leu	Lys	Lys	Glu	Leu	Arg	Lys	Ile	Gly	Asp	Glu	Val	115	120	125	
Thr	Asn	Pro	Glu	Arg	Phe	Glu	Pro	Glu	Leu	Asn	Glu	Val	Asn	Pro	Gly	130	135	140	
Glu	Thr	Gln	Asp	Thr	Ser	Thr	Ala	Arg	Ala	Leu	Val	Thr	Ser	Leu	Arg	145	150	155	160

ES 2 806 426 T3

Ala Phe Ala Leu Glu Asp Lys Leu Pro Ser Glu Lys Arg Glu Leu Leu
165 170 175

Ile Asp Trp Met Lys Arg Asn Thr Thr Gly Asp Ala Leu Ile Arg Ala
180 185 190

Gly Val Pro Asp Gly Trp Glu Val Gly Asp Lys Thr Gly Ser Gly Asp
195 200 205

Tyr Gly Thr Arg Asn Asp Ile Ala Ile Ile Trp Pro Pro Lys Gly Asp
210 215 220

Pro Val Val Leu Ala Val Leu Ser Ser Arg Asp Lys Lys Asp Ala Lys
225 230 235 240

Tyr Asp Asn Lys Leu Ile Ala Glu Ala Thr Lys Val Val Met Lys Ala
245 250 255

Leu Asn Met Asn Gly Lys
260

<210> 4

<211> 299

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintética

<400> 4

Met Ile Gln Lys Arg Lys Arg Thr Val Ser Phe Arg Leu Val Leu Met
1 5 10 15

Cys Thr Leu Leu Phe Val Ser Leu Pro Ile Thr Lys Thr Ser Ala Gln
20 25 30

Ala Ser Lys Thr Glu Met Lys Asp Asp Phe Ala Lys Leu Glu Glu Gln
35 40 45

Phe Asp Ala Lys Leu Gly Ile Phe Ala Leu Asp Thr Gly Thr Asn Arg
50 55 60

Thr Val Ala Tyr Arg Pro Asp Glu Arg Phe Ala Phe Ala Ser Thr Ile
65 70 75 80

Lys Ala Leu Thr Val Gly Val Leu Leu Gln Gln Lys Ser Ile Glu Asp
85 90 95

ES 2 806 426 T3

Leu Asn Gln Arg Ile Thr Tyr Thr Arg Asp Asp Leu Val Asn Tyr Asn
 100 105 110
 Pro Ile Thr Glu Lys His Val Asp Thr Gly Met Thr Leu Lys Glu Leu
 115 120 125
 Ala Asp Ala Ser Leu Arg Tyr Ser Asp Asn Ala Ala Gln Asn Leu Ile
 130 135 140
 Leu Lys Gln Ile Gly Gly Pro Glu Ser Leu Lys Lys Glu Leu Arg Lys
 145 150 155 160
 Ile Gly Asp Glu Val Thr Asn Pro Glu Arg Phe Glu Pro Glu Leu Asn
 165 170 175
 Glu Val Asn Pro Gly Glu Thr Gln Asp Thr Ser Thr Ala Arg Ala Leu
 180 185 190
 Val Thr Ser Leu Arg Ala Phe Ala Leu Glu Asp Lys Leu Pro Ser Glu
 195 200 205
 Lys Arg Glu Leu Leu Ile Asp Trp Met Lys Arg Asn Thr Thr Gly Asp
 210 215 220
 Ala Leu Ile Arg Ala Gly Val Pro Asp Gly Trp Glu Val Gly Asp Lys
 225 230 235 240
 Thr Gly Ser Gly Asp Tyr Gly Thr Arg Asn Asp Ile Ala Ile Ile Trp
 245 250 255
 Pro Pro Lys Gly Asp Pro Val Val Leu Ala Val Leu Ser Ser Arg Asp
 260 265 270
 Lys Lys Asp Ala Lys Tyr Asp Asn Lys Leu Ile Ala Glu Ala Thr Lys
 275 280 285
 Val Val Met Lys Ala Leu Asn Met Asn Gly Lys
 290 295

<210> 5
 <211> 900
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia sintética
 <400> 5

atgattcaaa aacgaaagcg gacagtttcg ttcagacttg tgcttatgtg cacgctgtta	60
tttgtcagtt tgccgattac aaaaacatca gcgcaagctt ccaagacgga gatgaaagat	120
gatttttgcaa aacttgagga acaatttgat gcaaaactcg ggatctttgc attggataca	180
ggtacaaacc ggacggtagc gtatcggccg gatgagcggt ttgcttttgc ttcgacgatt	240
aaggctttaa ctgtaggcgt gcttttgcaa cagaaatcaa tagaagatct gaaccagaga	300
ataacatata cacgtgatga tcttgtaaac tacaaccgga ttacggaaaa gcacgttgat	360
acgggaatga cgctcaaaga gcttgcggtat gcttcgcttc gatatagtga caatgcgga	420
cagaatctca ttcttaaaca aattggcgga cctgaaagtt tgaaaaagga actgaggaag	480
attggtgatg aggttacaaa tcccgaacga ttcgaaccag agttaaatga agtgaatccg	540
ggtgaaactc aggataccag tacagcaaga gcacttgtca caagccttcg agcctttgct	600
cttgaagata aacttccaag tgaaaaacgc gagcttttaa tcgattggat gaaacgaaat	660
accactggag acgccttaat ccgtgccggt gtgccggacg gttgggaagt gggtgataaa	720
actggaagcg gagattatgg aaccggaat gacattgcc a tcatttgcc gccaaaagga	780
gatcctgtcg ttcttgtagt attatccagc agggataaaa aggacgcaa gtatgataat	840
aaacttattg cagaggcaac aaagggtgga atgaaagcct taaacatgaa cggcaaataa	900

<210> 6
 <211> 216
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Secuencia sintética

<400> 6

ES 2 806 426 T3

Glu	Thr	Gly	Thr	Ile	Ser	Ile	Ser	Gln	Leu	Asn	Lys	Asn	Val	Trp	Val	1	5	10	15
His	Thr	Glu	Leu	Gly	Tyr	Phe	Asn	Gly	Glu	Ala	Val	Pro	Ser	Asn	Gly	20	25	30	
Leu	Val	Leu	Asn	Thr	Ser	Lys	Gly	Leu	Val	Leu	Val	Asp	Ser	Ser	Trp	35	40	45	
Asp	Asn	Lys	Leu	Thr	Lys	Glu	Leu	Ile	Glu	Met	Val	Glu	Lys	Lys	Phe	50	55	60	
Gln	Lys	Arg	Val	Thr	Asp	Val	Ile	Ile	Thr	His	Ala	His	Ala	Asp	Arg	65	70	75	80
Ile	Gly	Gly	Ile	Thr	Ala	Leu	Lys	Glu	Arg	Gly	Ile	Lys	Ala	His	Ser	85	90	95	
Thr	Ala	Leu	Thr	Ala	Glu	Leu	Ala	Lys	Asn	Ser	Gly	Tyr	Glu	Glu	Pro	100	105	110	
Leu	Gly	Asp	Leu	Gln	Thr	Ile	Thr	Ser	Leu	Lys	Phe	Gly	Asn	Thr	Lys	115	120	125	
Val	Glu	Thr	Phe	Tyr	Pro	Gly	Lys	Gly	His	Thr	Glu	Asp	Asn	Ile	Val	130	135	140	
Val	Trp	Leu	Pro	Gln	Tyr	Gln	Ile	Leu	Ala	Gly	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	145	150	155	160
Ser	Ala	Glu	Ala	Lys	Asp	Leu	Gly	Asn	Val	Ala	Asp	Ala	Tyr	Val	Asn	165	170	175	
Glu	Trp	Ser	Thr	Ser	Ile	Glu	Asn	Val	Leu	Lys	Arg	Tyr	Gly	Asn	Ile	180	185	190	
Asn	Ser	Val	Val	Pro	Gly	His	Gly	Glu	Val	Gly	Asp	Lys	Gly	Leu	Leu	195	200	205	
Leu	His	Thr	Leu	Asp	Leu	Leu	Lys	210	215										

REIVINDICACIONES

1. Una formulación de liberación modificada que comprende una betalactamasa, en la que la formulación comprende al menos un gránulo de liberación modificada y en la que cada gránulo de liberación modificada comprende:

- 5 el 10-20 % en peso de betalactamasa que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1, 3 o 6;
 el 20-30 % en peso de esfera de sacarosa;
 el 30-40 % en peso de hidroxipropilcelulosa;
 el 15-25 % en peso de un polímero entérico;
 el 1,5-2,5 % en peso de citrato de trietilo;
 10 el 0,5-1,5 % en peso de monoestearato de glicerilo;
 el 0,1-1,0 % en peso de polisorbato-80; y
 el 1-2 % en peso de sal tampón.

2. La formulación de liberación modificada de la reivindicación 1, en la que cada gránulo de liberación modificada comprende:

- 15 el 16 % en peso de betalactamasa;
 el 23 % en peso de esfera de sacarosa;
 el 35 % en peso de hidroxipropilcelulosa;
 el 21 % en peso de un polímero entérico;
 el 2 % en peso de citrato de trietilo;
 20 el 1 % en peso de monoestearato de glicerilo;
 el 0,5 % en peso de polisorbato-80; y
 el 2 % en peso de sal tampón.

3. La formulación de liberación modificada de la reivindicación 1, en la que cada gránulo de liberación modificada comprende:

- 25 el 15,8 % en peso de betalactamasa;
 el 23,3 % en peso de esfera de sacarosa;
 el 35 % en peso de hidroxipropilcelulosa;
 el 20,8 % en peso de un polímero entérico;
 el 2,1 % en peso de citrato de trietilo;
 30 el 1 % en peso de monoestearato de glicerilo;
 el 0,4 % en peso de polisorbato-80; y
 el 1,6 % en peso de sal tampón.

4. La formulación de liberación modificada de la reivindicación 1, en la que la betalactamasa comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 98 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1, 3 o 6.

35 5. La formulación de liberación modificada de la reivindicación 1, en la que la betalactamasa se libera sustancialmente en el tracto GI y opcionalmente en los intestinos.

6. La formulación de liberación modificada de la reivindicación 1, en la que la formulación de la formulación está en forma de una cápsula.

40 7. La formulación de liberación modificada de la reivindicación 1, en la que cada gránulo de liberación modificada comprende una partícula central y un recubrimiento base sobre la partícula central, en la que el recubrimiento base comprende la betalactamasa.

8. La formulación de liberación modificada de la reivindicación 1, en la que la formulación comprende una pluralidad de gránulos de liberación modificada.

45 9. La formulación de liberación modificada de la reivindicación 1, en la que la formulación comprende además un recubrimiento de liberación modificada que es sustancialmente estable en fluido gástrico.

10. La formulación de liberación modificada de la reivindicación 1, en la que la formulación comprende además un recubrimiento de liberación modificada que tiene una solubilidad que es dependiente del pH.

50 11. La formulación de liberación modificada de la reivindicación 10, en la que la betalactamasa comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:1 y en la que el recubrimiento de liberación modificada comprende un compuesto EUDRAGIT.

12. La formulación de liberación modificada de la reivindicación 11, en la que el recubrimiento de liberación modificada es EUDRAGIT L30 D-55.

13. La formulación de liberación modificada de la reivindicación 1 para su uso en el tratamiento o prevención de un

efecto adverso inducido por antibióticos en el tracto GI, una infección por *C. difficile* (CDI) y/o una enfermedad asociada a *C. difficile* en un paciente que lo necesita, opcionalmente en la que el efecto adverso inducido por antibióticos en el tracto GI, la infección por *C. difficile* (CDI) y/o la enfermedad asociada a *C. difficile* es uno o más de: diarrea asociada a antibióticos, diarrea por *C. difficile* (CDD), enfermedad inflamatoria intestinal por *C. difficile*, colitis, colitis pseudomembranosa, fiebre, dolor abdominal, deshidratación y alteraciones en electrolitos.

5

14. Una formulación de liberación modificada que comprende una betalactamasa que tiene una actividad hidrolizante de ceftriaxona sustancial, en la que la formulación comprende al menos un gránulo de liberación modificada, comprendiendo cada gránulo:

10

- el 16 % en peso de betalactamasa;
- el 23 % en peso de esfera de sacarosa;
- el 35 % en peso de hidroxipropilcelulosa;
- el 21 % en peso de un polímero entérico;
- el 2 % en peso de citrato de trietilo;
- el 1 % en peso de monoestearato de glicerilo;

15

- el 0,5 % en peso de polisorbato-80; y
- el 2 % en peso de sal tampón;

en la que la betalactamasa comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 98 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1.

20

15. La formulación de liberación modificada de la reivindicación 14, en la que el polímero entérico es EUDRAGIT L30 D-55.

FIGURA 1A

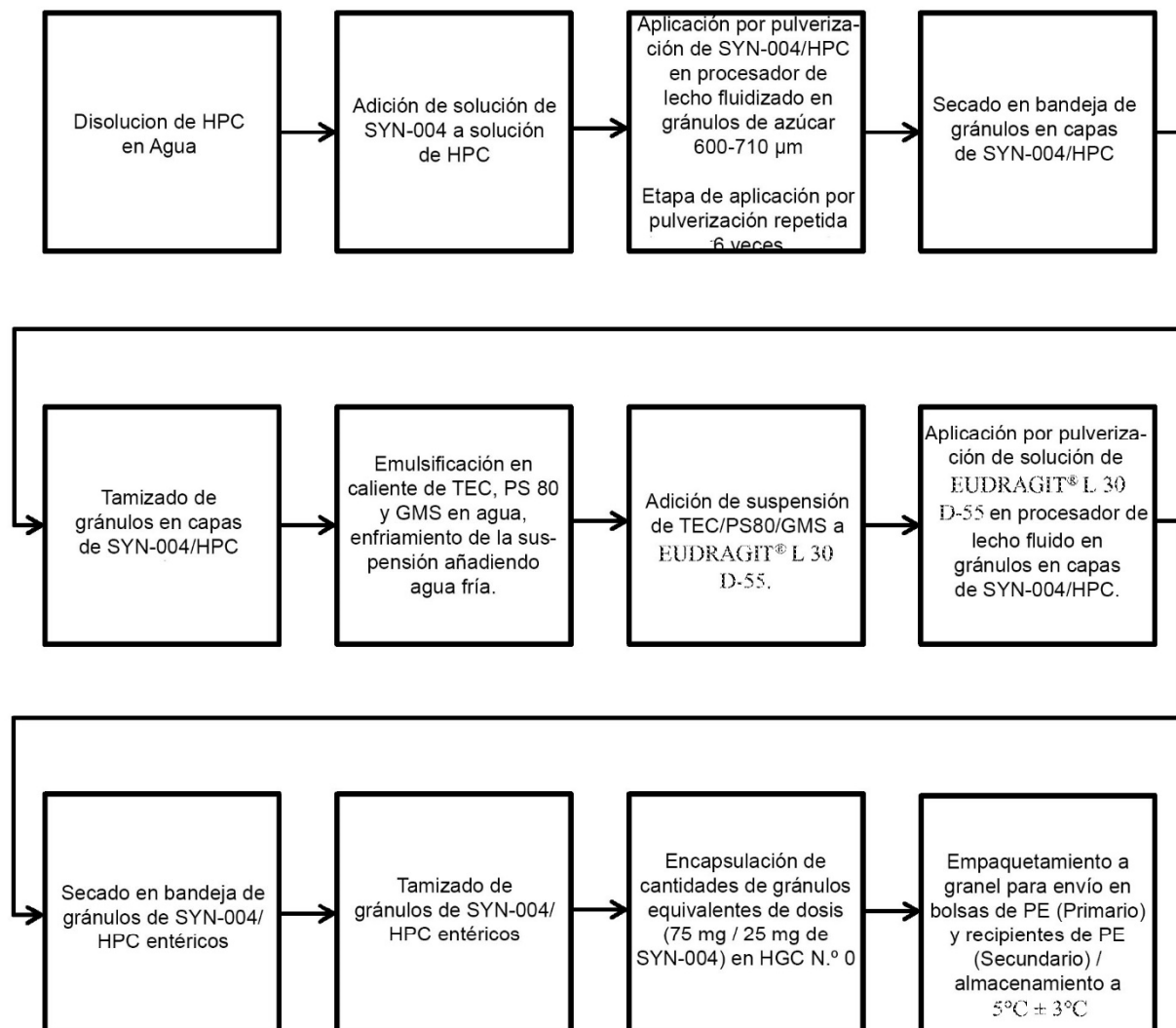


Figura 1B

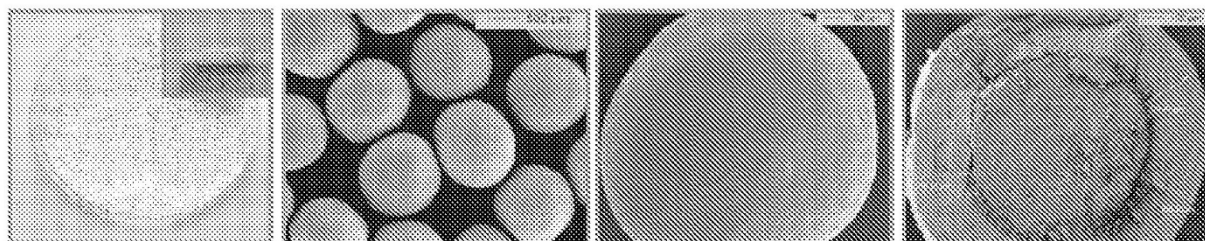


FIGURA 2

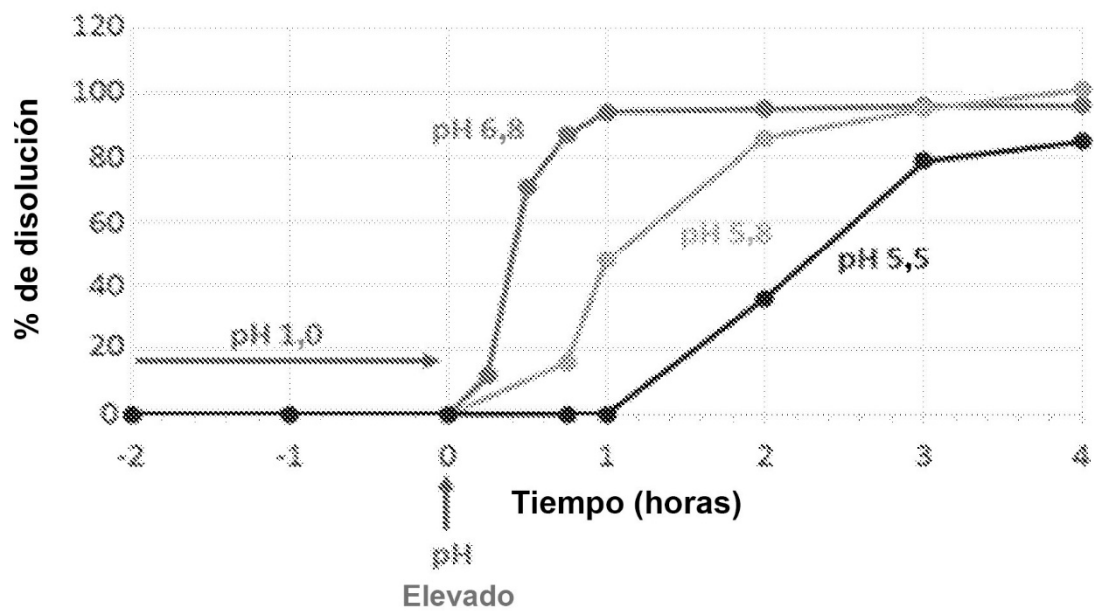


FIGURA 3

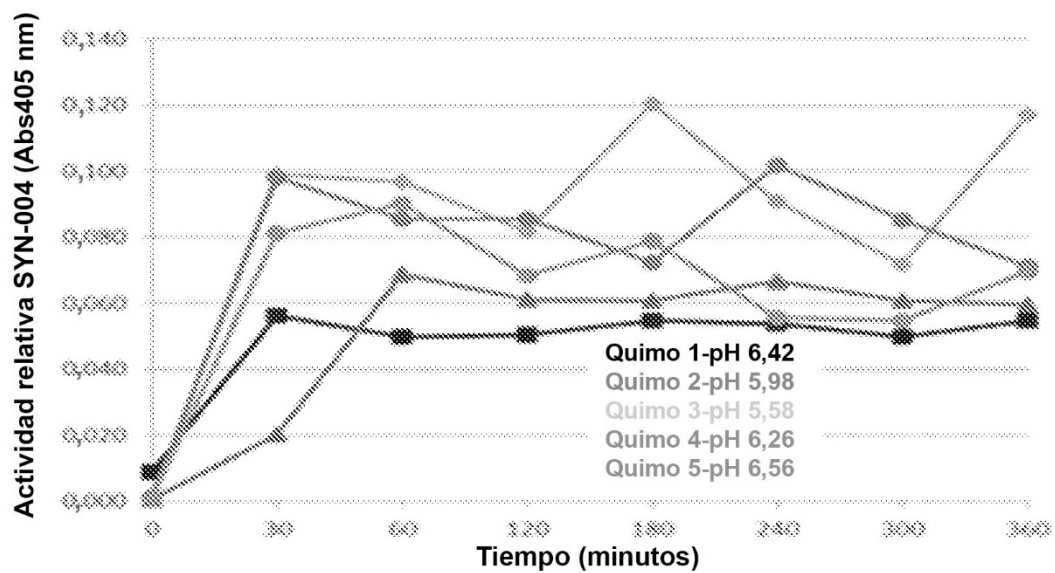


FIGURA 4

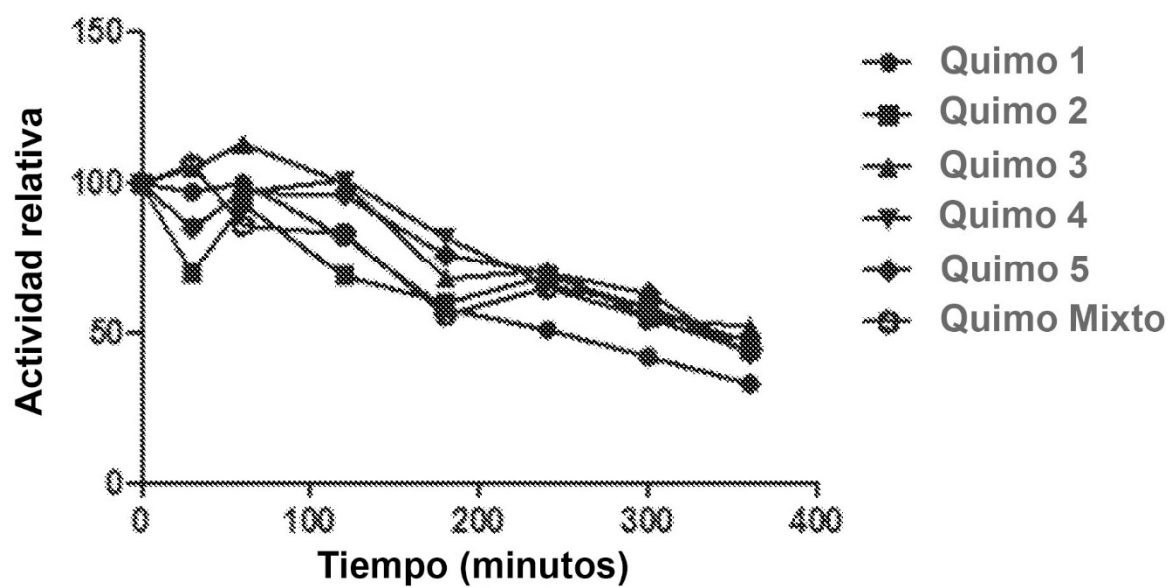


Figura 5

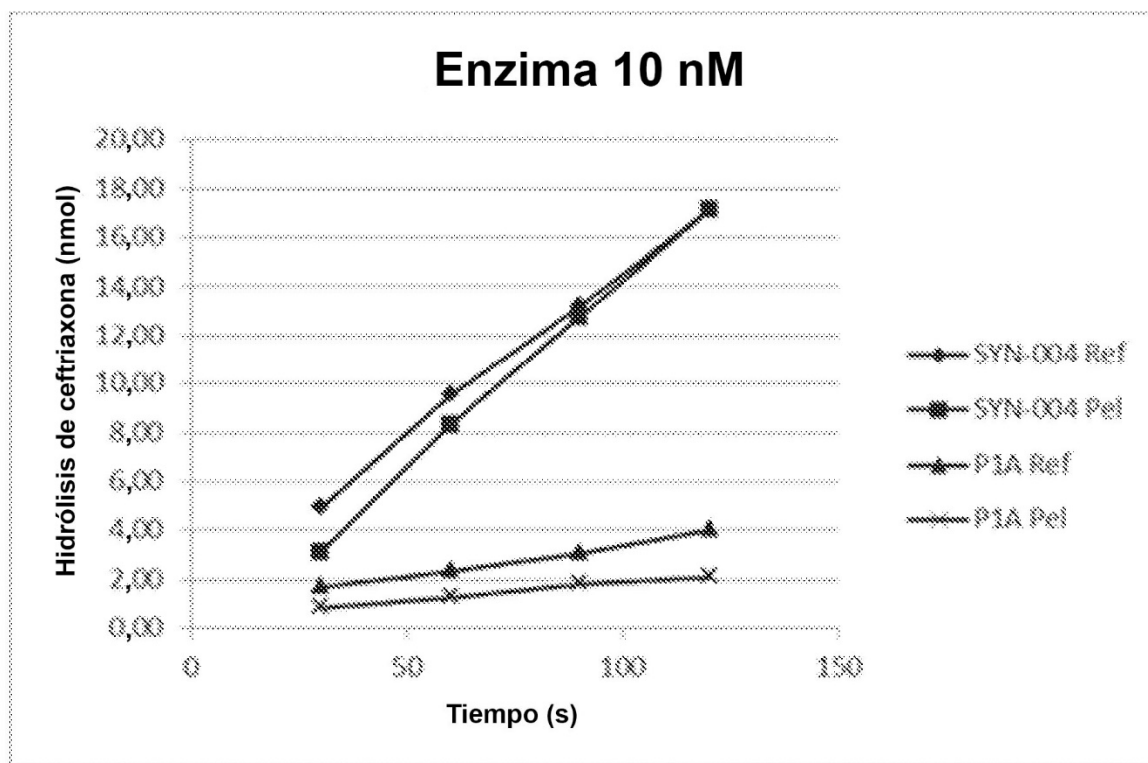


Figura 6

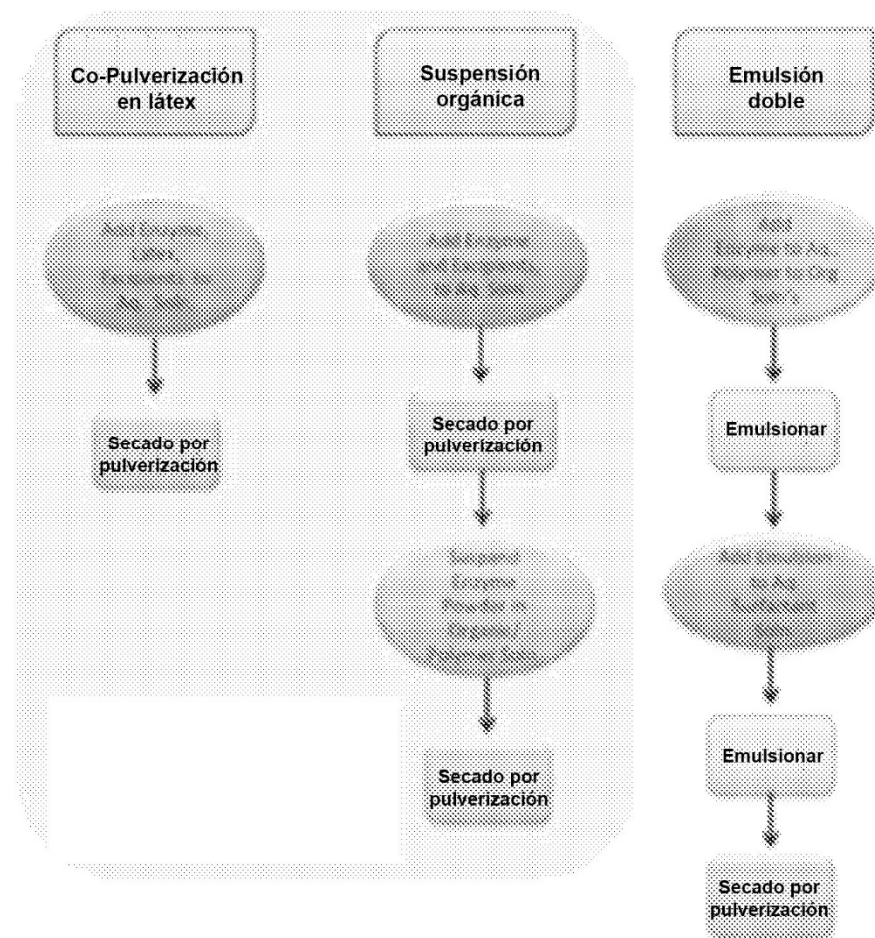


Figura 7

Grupo	Animales	Antibiótico	SYN-004	<i>C. difficile</i> (2.5×10^8 ufc.)
1	Cerdo 2 Cerdo 9*	Ninguno	Ninguno	Si
2	Cerdo 7 Cerdo 8**	Clindamicina (50 mg/kg, IP)	Ninguno	Si
3	Cerdo 5 Cerdo 6	Ceftriaxona (50 mg/kg, IP)	Ninguno	Si
4	Cerdo 10 Cerdo 11 Cerdo 12	Ceftriaxona (50 mg/kg, IP)	75 mg, QID 7am, 12 pm, 5 pm, 10 pm	

Figura 8

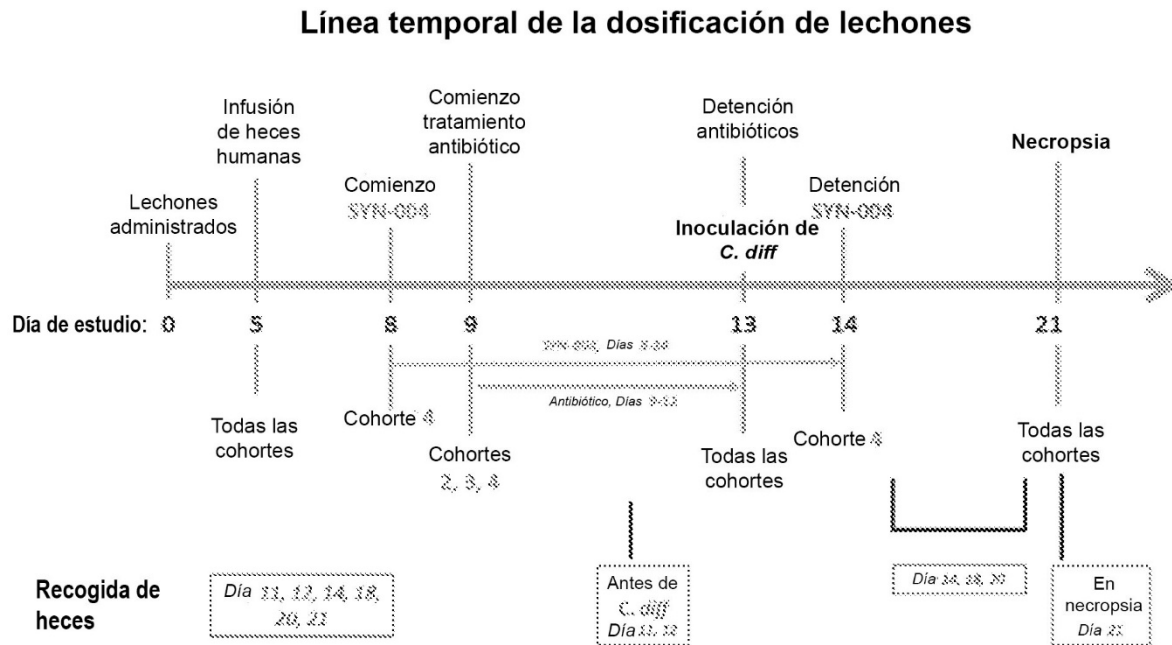


Figura 9

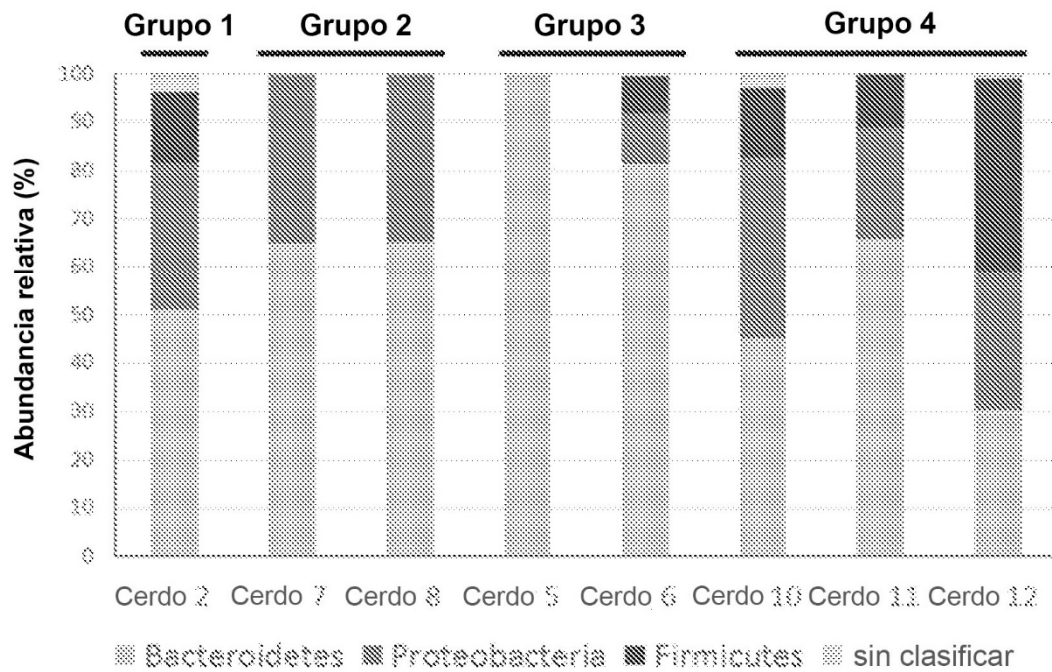


Figura 10A

Crecimiento bacteriano en placas LB+Ampicilina

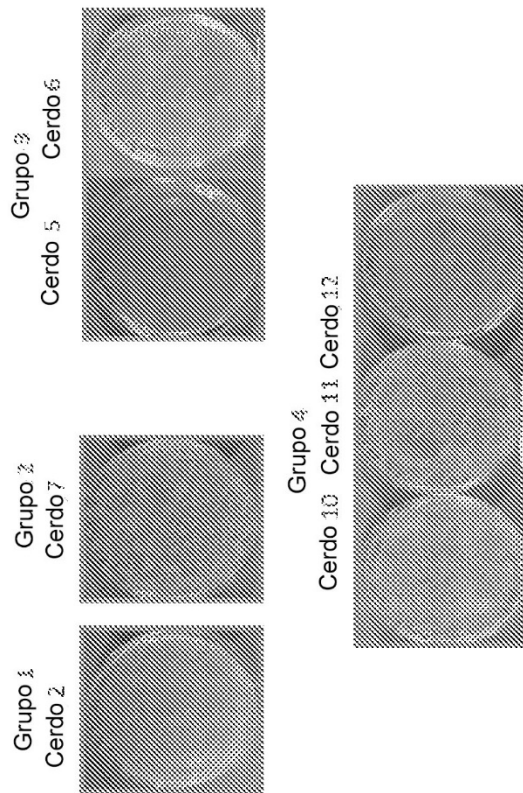
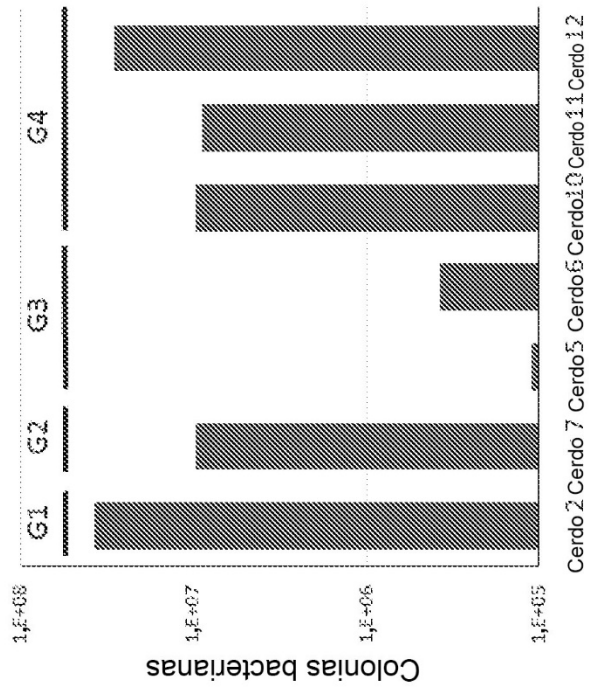


Figura 10B

Cuantificación del crecimiento bacteriano



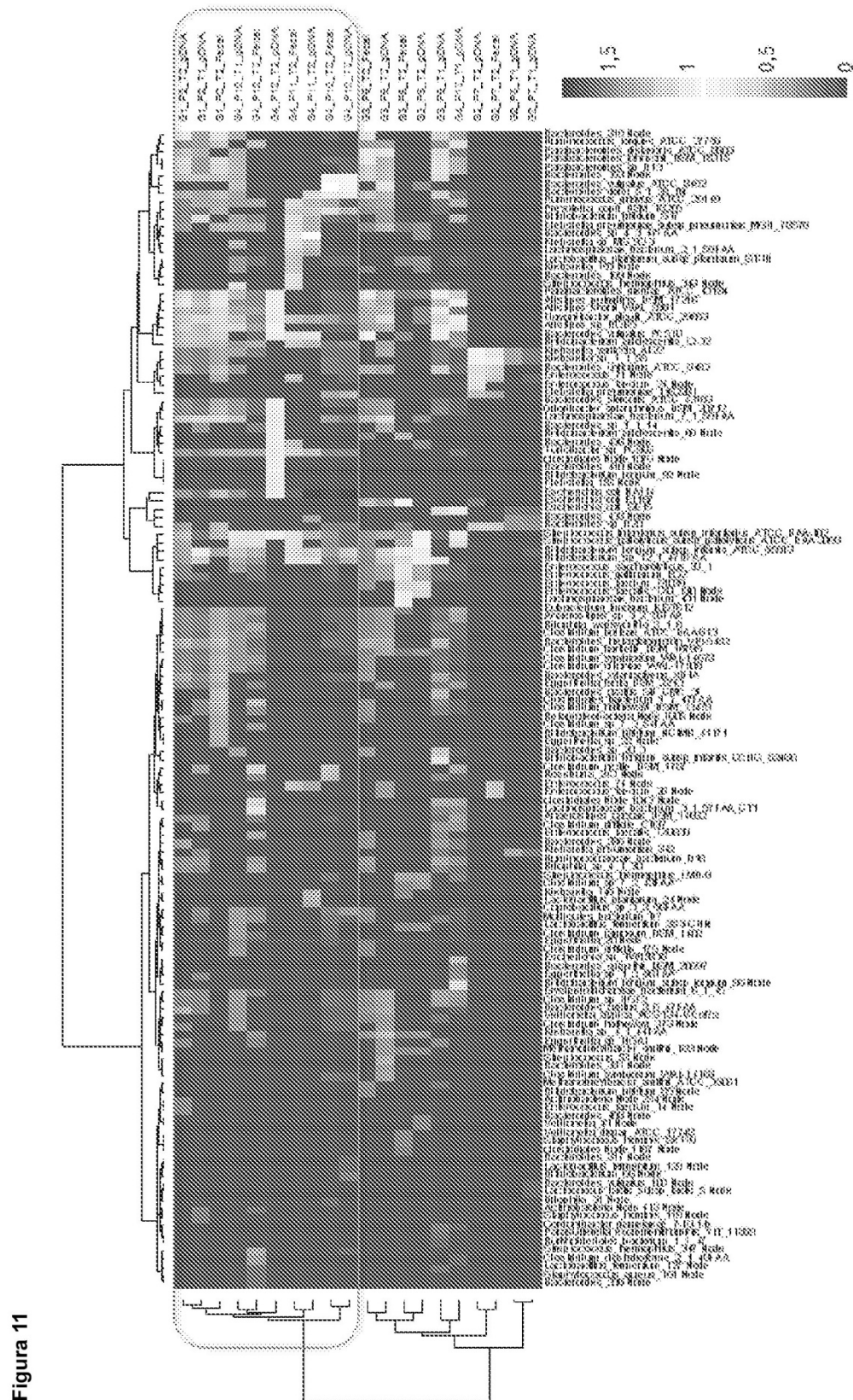


Figure 11



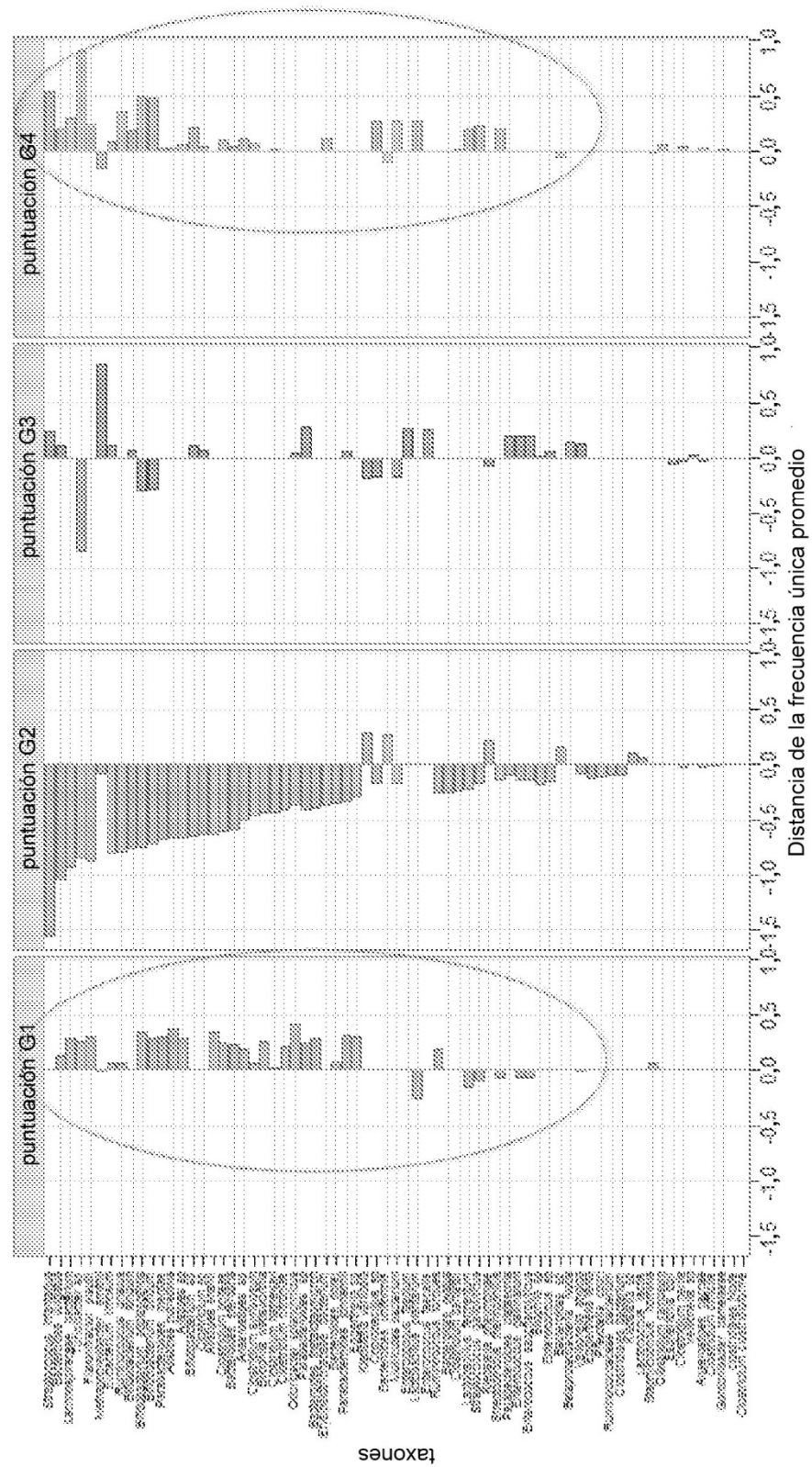


Figura 14

Figura 16

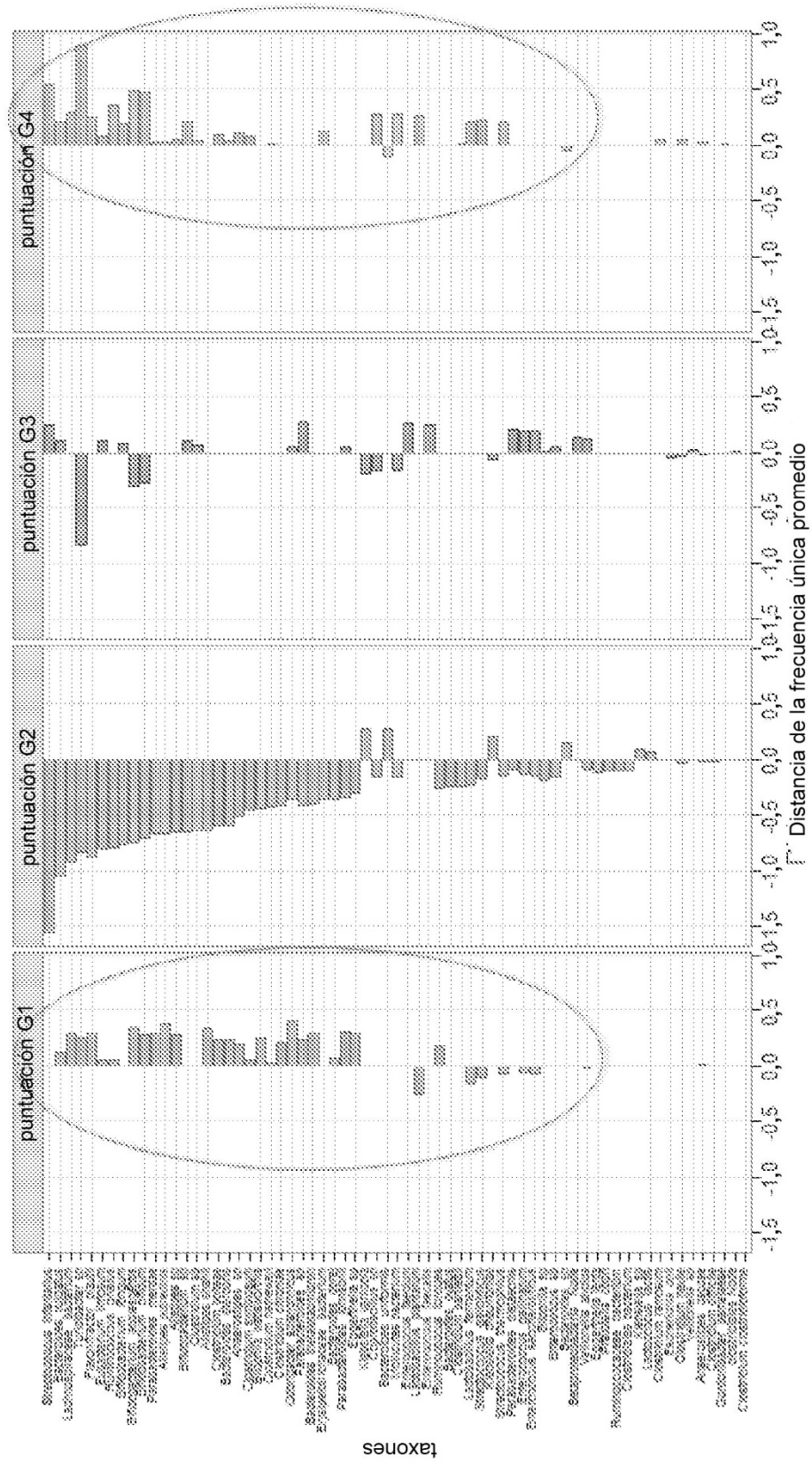
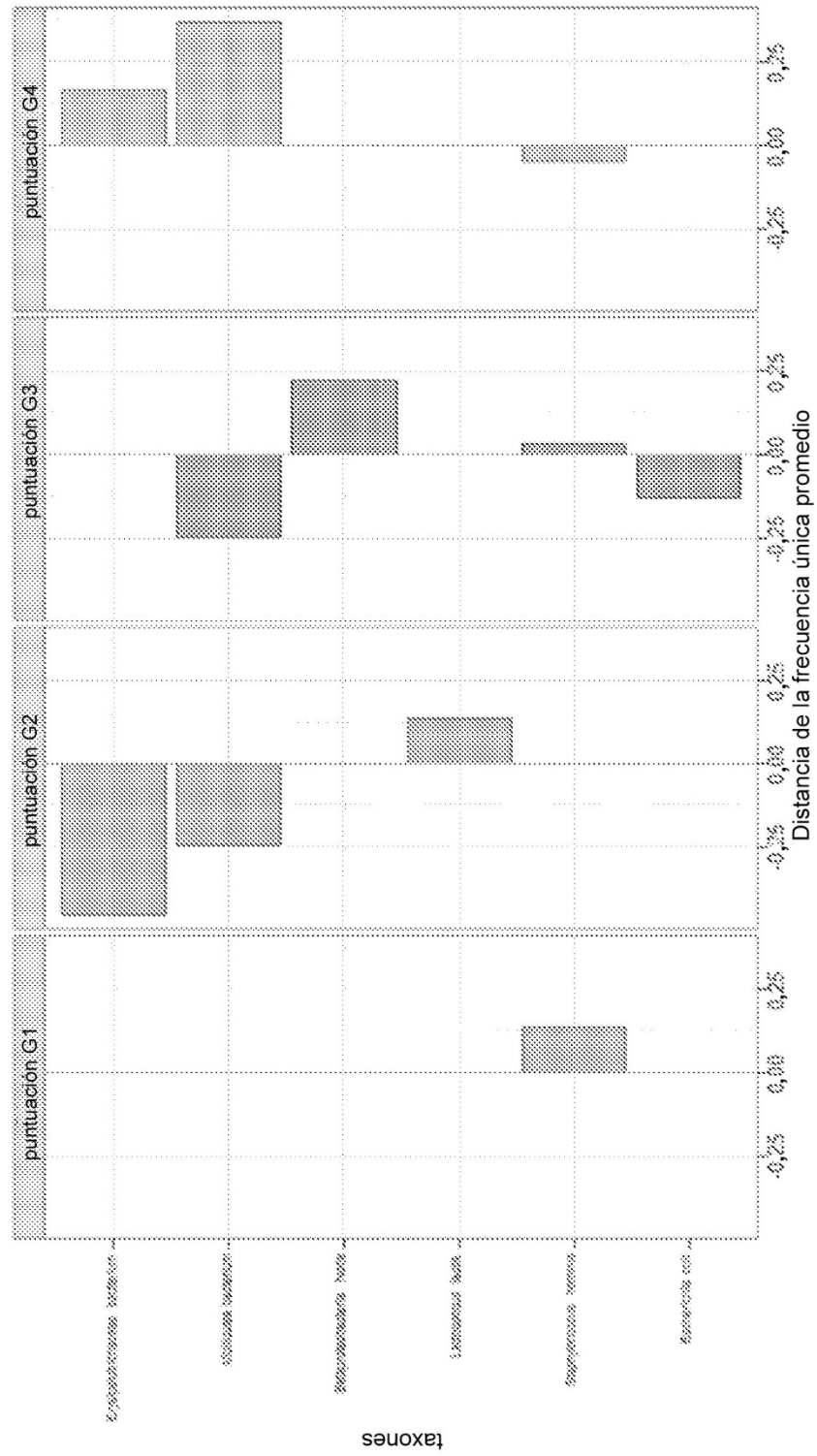


Figura 17



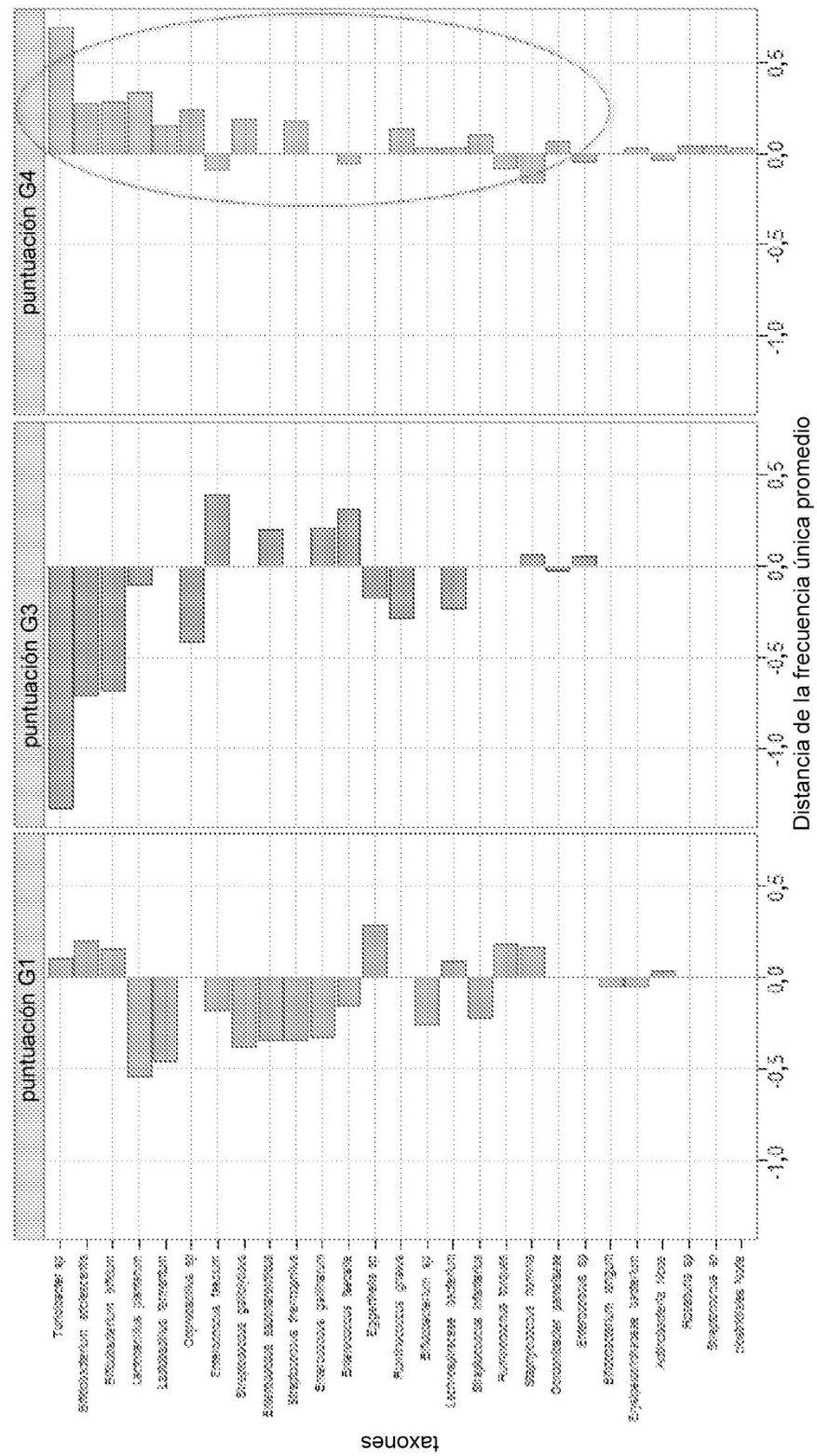


Figura 18

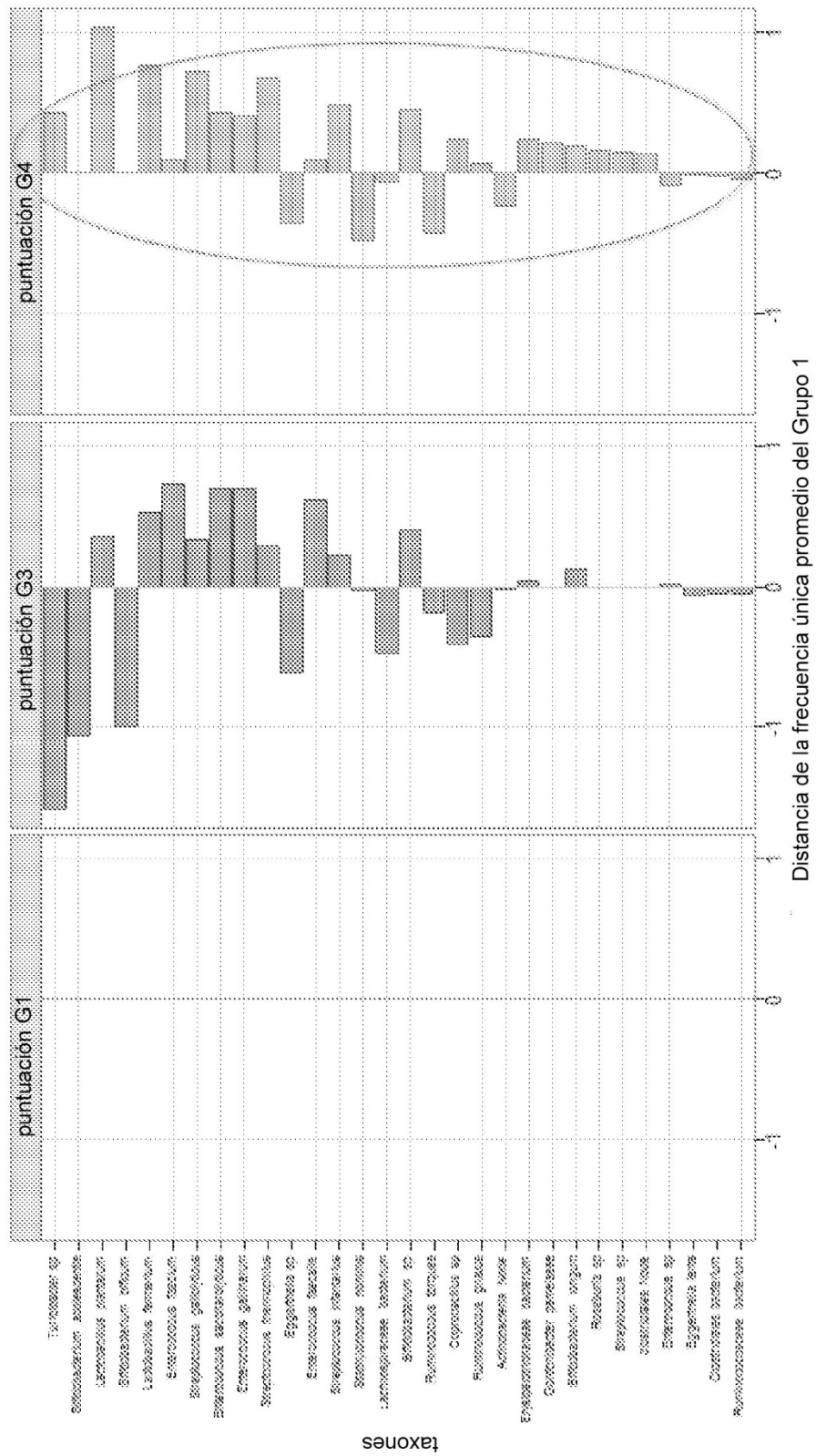


Figura 19

Figura 22

