

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 000 192**

51 Int. Cl.:

| | |
|-------------------|-----------|
| A61K 39/00 | (2006.01) |
| A61K 48/00 | (2006.01) |
| A61K 35/76 | (2015.01) |
| C12N 9/24 | (2006.01) |
| C12N 15/86 | (2006.01) |
| A61P 31/04 | (2006.01) |

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.01.2017 PCT/EP2017/050095**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.07.2017 WO17114979**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.01.2017 E 17700778 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.10.2024 EP 3397277**

54 Título: **Composición inmunogénica**

30 Prioridad:

03.01.2016 GB 201600075

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.02.2025

73 Titular/es:

GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.
(100.00%)
Rue de l'Institut, 89
1330 Rixensart, BE

72 Inventor/es:

FERON, CHRISTIANE MARIE-PAULE SIMONE
JEANNE y
GIANNINI, SANDRA

74 Agente/Representante:

ARIZTI ACHA, Monica

ES 3 000 192 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

Composición inmunogénica

5 Campo técnico

La presente invención se refiere a un bacteriófago recombinante que comprende un polinucleótido de genoma de fago que incluye un gen que codifica para una proteína de antígeno heterólogo en donde la proteína de antígeno heterólogo es una proteína bacteriana que se origina de una bacteria grampositiva o gramnegativa, que es una proteína estafilocócica, estreptocócica, meningocócica o de *Pseudomonas*, *Propionibacterium*, *Acinetobacter* o una proteína de *P. aeruginosa*, *C. difficile*, *P. acnes* o *N. gonorrhoeae*, en donde la proteína de antígeno heterólogo está presente naturalmente en una bacteria que es infectable por el bacteriófago recombinante, en donde la proteína heteróloga se expresa a un nivel más alto después de la infección con el bacteriófago recombinante y es capaz de generar una respuesta inmunitaria contra el hospedador bacteriano y un gen de aniquilación que codifica para una proteína que es capaz de aniquilar la bacteria hospedadora en donde la proteína de antígeno heterólogo, después de la expresión se libera en el citoplasma de la bacteria infectada por el bacteriófago debido a la ausencia de una secuencia guía del antígeno de proteína heteróloga.

Antecedentes

20

Los bacteriófagos se han conocido durante muchos años después de haber sido descubiertos por Fredrick Twart en 1915 y Felix d'Herelle en 1917. Son virus con genomas de ADN o ARN que infectan y se replican dentro de las bacterias. Los bacteriófagos pueden experimentar ciclos líticos o lisogénicos dentro de las bacterias. Durante el ciclo lítico, el material genético del bacteriófago se inyecta en una bacteria, donde tiene lugar la transcripción, traducción y replicación, lo que conduce al ensamblaje y empaquetamiento de proteínas y ácidos nucleicos del bacteriófago y, finalmente, a la lisis donde se liberan muchos bacteriófagos, listos para infectar más bacterias. Algunos bacteriófagos también pueden llevar a cabo un ciclo lisogénico en el que el material genético del bacteriófago se incorpora en un genoma bacteriano.

25

30 Actualmente se están probando bacteriófagos en estudios clínicos para el tratamiento de infecciones bacterianas. Se están atacando patógenos tal como *S. aureus*, *E. coli* y *P. aeruginosa*. Wright A Clin Otolaryngol (2009) 34:349, describe un rastro clínico controlado de una preparación de bacteriófago terapéutico para el tratamiento de otitis crónica debido a *Pseudomonas aeruginosa resistente a antibióticos*. Sarker SA et al. Virology (2012) 434:222 describen la administración de un cóctel de fagos tipo T4 oral a voluntarios adultos sanos de Bangladesh (ClinicalTrials.govidentifier: NCT01818206).

35

Se han desarrollado bacteriófagos diseñados para múltiples dianas bacterianas con el objetivo de eliminar o reducir la carga bacteriana. Los ejemplos incluyen; SASP gene delivery: a novel antibacterial approach. Fairhead H Drug News Perspect. (2009): 197-203, Engineered Phagemids for Nonlytic, Targeted Antibacterial Therapies; Krom RJ et al Nano Lett. (2015) 15, 4808-4813; Sequence-specific antimicrobials using efficient delivered RNA-guided nucleases Citorik RJ et al. Nature Biotechnology (2014) 32 1141, Exploiting CRISPR-Cas nucleases to produce sequence-specific antimicrobials, Bikard D. Nature Biotechnology (2014) 32 1146. Bacteriófagos adicionales se divulgan en WO 03/076583, WO 03/067991, WO 03/026690, WO 11/014693 y WO 10/141135.

40

45 Además, los bacteriófagos modificados también se han desarrollado como vacunas o para administración dirigida para aniquilar células de cáncer. Sin embargo, no se propone que estos bacteriófagos infecten bacterias (Therapeutic and prophylactic applications of bacteriophage components in modern medicine. Adhya S et al. Cold Spring Harb Perspect Med. (2014) 1 1., Killing cancer cells by targeted drug-carrying phage nanomedicines Bar H. et al. BMC Biotechnol. (2008) 37, Phage protein- targeted cancer nanomedicines Petrenko VA and Jayanna PK. FEBS Lett. (2014) 588:341).

50

Sumario de la invención

La invención es como se define en las reivindicaciones. Con el crecimiento de la resistencia a antibióticos, es importante que se desarrollen estrategias adicionales para tratar o prevenir la infección bacteriana. La presente invención representa un avance en el uso de bacteriófagos recombinantes. Los bacteriófagos recombinantes de la invención no sólo se dirigen a una bacteria para aniquilarla utilizando la maquinaria lítica del bacteriófago u otras moléculas heterólogas para aniquilar las bacterias, sino que también expresan un antígeno. El antígeno se sobreexpresa durante el período cuando los genes de bacteriófagos se transcriben y traducen y se libera en la lisis/muerte de la bacteria. El antígeno es capaz de inducir una respuesta inmunitaria tal que el bacteriófago sea capaz no sólo de aniquilar la bacteria directamente, sino también de cebar una respuesta inmunitaria tal que las bacterias se puedan eliminar por el sistema inmunitario para eliminar las bacterias residuales o prevenir la recaída/reinfección en un punto de tiempo posterior. Por lo tanto, el bacteriófago de la invención puede aniquilar bacterias y cebar la respuesta inmunitaria para eliminar adicionalmente las bacterias.

60

Por consiguiente, se proporciona un bacteriófago recombinante que comprende un polinucleótido de genoma de fago que incluye un gen que codifica para una proteína de antígeno heterólogo en donde la proteína de antígeno heterólogo es una proteína bacteriana que se origina a partir de una bacteria grampositiva o gramnegativa, que es una proteína estafilocócica, estreptocócica, meningocócica, o de *Pseudomonas*, *Propionibacterium*, *Acinetobacter* o una proteína de *P. aeruginosa*, *C. difficile*, *P. acnes* o *N. gonorrhoeae*, en donde la proteína de antígeno heterólogo está presente naturalmente en una bacteria que es infectable por el bacteriófago recombinante, en donde la proteína heteróloga se expresa a un nivel más alto después de la infección con el bacteriófago recombinante y es capaz de generar una respuesta inmunitaria contra el hospedador bacteriano y un gen de aniquilación que codifica para una proteína que es capaz de aniquilar la bacteria hospedadora en donde la proteína de antígeno heterólogo, después de la expresión se libera en el citoplasma de la bacteria infectada por el bacteriófago debido a la ausencia de una secuencia guía del antígeno de proteína heteróloga.

En un segundo aspecto de la invención, se proporciona un polinucleótido del genoma del bacteriófago recombinante que comprende un gen de antígeno heterólogo que codifica para una proteína de antígeno heterólogo en donde la proteína de antígeno heterólogo es una proteína bacteriana que se origina de una bacteria grampositiva o gramnegativa, que es una proteína estafilocócica, estreptocócica, meningocócica o de *Pseudomonas*, *Propionibacterium*, *Acinetobacter* o una proteína de *P. aeruginosa*, *C. difficile*, *P. acnes* o *N. gonorrhoeae*, en donde la proteína de antígeno heterólogo está presente naturalmente en una bacteria que es infectable por el bacteriófago recombinante, en donde la proteína heteróloga se expresa a un nivel más alto después de la infección con el bacteriófago recombinante y es capaz de generar una respuesta inmunitaria contra el hospedador bacteriano y un gen de aniquilación que codifica para una proteína que es capaz de aniquilar la bacteria hospedadora en donde la proteína de antígeno heterólogo, después de la expresión se libera en el citoplasma de la bacteria infectada por el bacteriófago debido a la ausencia de una secuencia guía del antígeno de proteína heteróloga.

Breve descripción de las figuras

La figura 1 demuestra estrategias para generar el bacteriófago recombinante de la invención

La figura 2 demuestra posibilidades para la modificación genética del bacteriófago recombinante.

La figura 3 demuestra el uso propuesto de bacteriófagos recombinantes de la invención.

Descripción detallada

La presente invención divulga un bacteriófago recombinante que comprende un polinucleótido de genoma de fago que incluye un gen que codifica para una proteína de antígeno heterólogo en donde la proteína de antígeno heterólogo es una proteína bacteriana que se origina de una bacteria grampositiva o gramnegativa, que es una proteína estafilocócica, estreptocócica, meningocócica o de *Pseudomonas*, *Propionibacterium*, *Acinetobacter* o una proteína de *P. aeruginosa*, *C. difficile*, *P. acnes* o *N. gonorrhoeae*, en donde la proteína de antígeno heterólogo está presente naturalmente en una bacteria que es infectable por el bacteriófago recombinante, en donde la proteína heteróloga se expresa a un nivel más alto después de la infección con el bacteriófago recombinante y es capaz de generar una respuesta inmune contra el hospedador bacteriano y un gen de aniquilación que codifica para una proteína que es capaz de aniquilar la bacteria hospedadora en donde la proteína de antígeno heterólogo, después de la expresión se libera en el citoplasma de la bacteria infectada por el bacteriófago debido a la ausencia de una secuencia guía del antígeno de proteína heteróloga. La proteína de antígeno heterólogo no se expresa como parte de una proteína de cubierta/cápside de fago. El bacteriófago recombinante habitualmente comprende una cabeza viral compuesta por proteínas de cápside y que comprende un polinucleótido de genoma de fago recombinante, una estructura de cola que contiene medios para unirse a una célula hospedadora bacteriana y medios para insertar el polinucleótido de genoma de fago recombinante en una célula hospedadora. El polinucleótido de genoma se modifica para retener secuencias esenciales para la transcripción y traducción del genoma de bacteriófago, así como al menos la señal de empaquetamiento, sin embargo, otras partes del genoma de bacteriófago se pueden reemplazar con uno o más genes que codifican para un antígeno heterólogo. Se prefiere que el genoma del bacteriófago no contenga genes que codifiquen para proteínas que permitan que el ciclo lisogénico proceda. También se prefiere que el genoma de bacteriófago de la invención no contenga todos los genes que permiten la replicación y liberación de bacteriófagos viables. Por lo tanto, los genes que codifican para proteínas implicadas con el inicio del ciclo lisogénico o que codifican para algunas de las proteínas estructurales del bacteriófago se pueden eliminar y/o se pueden reemplazar con genes que codifican para al menos un antígeno. Opcionalmente, el bacteriófago recombinante comprende un receptor para una bacteria hospedadora. Esta es habitualmente una proteína de la cola del bacteriófago que se une específicamente a una bacteria hospedadora, permitiendo que el bacteriófago se una a la bacteria hospedadora e inserte polinucleótido de genoma en la bacteria hospedadora.

Por "antígeno heterólogo" se entiende que el antígeno heterólogo es un antígeno que no está presente en el bacteriófago tipo silvestre. De acuerdo con la invención, el antígeno está presente naturalmente en las bacterias que el bacteriófago está diseñado para infectar.

- 5 Por "patógeno heterólogo" se entiende un patógeno que no es un bacteriófago.

El término "bacteria hospedadora" se refiere a una bacteria a la cual se une el bacteriófago recombinante y en el que es capaz de insertar el polinucleótido del genoma.

- 10 El bacteriófago recombinante de la invención codifica para una proteína de antígeno heterólogo que es capaz de generar una respuesta inmunitaria contra el hospedador bacteriano. De acuerdo con la invención, el bacteriófago recombinante se dirige a la misma especie de bacterias al ingresar y lisar en primer lugar la bacteria y también al provocar que un antígeno de la bacteria se exprese y se presente al sistema inmunitario de un hospedador tal que el sistema inmunitario se dirija y aniquile otras bacterias de la misma variedad que no se infectaron inicialmente por el bacteriófago. Por lo tanto, el concepto de "aniquilar y cebar" permite un tratamiento de bacteriófagos más eficiente de una bacteria dirigida.

En un aspecto de la divulgación, un bacteriófago recombinante comprende un polinucleótido de genoma de fago que incluye un gen que codifica para proteínas antigénicas heterólogas y un gen de aniquilación que codifica para una proteína que es capaz de aniquilar una bacteria hospedadora. Por lo tanto, el genoma de bacteriófago recombinante codifica para proteínas que son capaces de cebar una respuesta inmunitaria y aniquilar la bacteria hospedadora. El gen de aniquilación es opcionalmente un gen de bacteriófago que codifica para una proteína que es capaz de lisar una bacteria. El gen de aniquilación es opcionalmente un gen heterólogo con actividad bactericida. Los ejemplos de estos genes son las nucleasas CRISPR-Cas y los genes SASP que codifican para péptidos que se unen e inactivan el ADN bacteriano (WO 04/113375, WO 16/55585, WO 16/55584, WO 16/55586, WO 16/55587, Selle K. et al. Trends Microbiol. 23 (2015) 225-232, Qi L et al Nat. Biotechnology 30, (2012) 1002-1006, Mali et al Science 339, (2013) 823-826, Gaj T. et al Trends Biotechnol. 31, (2013) 397-405, Wang H et al Cell 153, (2013) 910-918. Otros ejemplos de genes de aniquilación incluyen aquellos descritos en Mehta et al , Biotechnology and Bioengineering (2016) 113; 2568-2576; SASP gene delivery: a novel antibacterial approach. Fairhead H Drug News Perspect. (2009) : 197-203, Engineered Phagemids for Nonlytic, Targeted Antibacterial Therapies; Krom RJ et al Nano Lett. (2015) 15, 4808-4813; Sequence-specific antimicrobials using efficient delivered RNA-guided nucleases Citorik RJ et al. Nature Biotechnology (2014) 32 1141, Exploiting CRISPR-Cas nucleases to produce sequence-specific antimicrobials, Bikard D. Nature Biotechnology (2014) 32 1146.

- 35 La elección de promotores para impulsar la expresión de la proteína de antígeno heterólogo es importante puesto que se debe producir suficiente antígeno antes de que se aniquile la bacteria hospedadora. Por lo tanto, en una realización, el bacteriófago recombinante de la invención utiliza un promotor fuerte o un promotor temprano para impulsar la expresión del gen que codifica para la proteína de antígeno heterólogo. Opcionalmente, la expresión de la proteína de antígeno heterólogo se impulsa por un promotor temprano fuerte. De manera alternativa, la expresión de la proteína de antígeno heterólogo se impulsa por un promotor tardío fuerte. En una realización, múltiples copias del gen que codifica para la proteína de antígeno heterólogo están presentes en el bacteriófago recombinante tal que se incremente la expresión. Por ejemplo, 1, 2, 3, 4 o 5 copias del gen que codifica para la proteína de antígeno heterólogo están presentes en el genoma de bacteriófago recombinante.

- 45 El bacteriófago recombinante de la invención contiene un polinucleótido de genoma de fago que comprende un gen de aniquilación que codifica para una proteína que es capaz de aniquilar una bacteria hospedadora. En una realización, el gen de aniquilación está bajo el control de un promotor tardío o débil. Esto tiene la ventaja de garantizar que la bacteria hospedadora exprese suficiente antígeno para cebar una respuesta inmunitaria antes de que se aniquile. En una realización, el gen de aniquilación está bajo el control de un promotor que es un promotor tardío y un promotor débil. En una realización, la proteína de antígeno heterólogo se impulsa por un promotor fuerte y/o temprano y el gen de aniquilación está bajo el control de un promotor tardío y débil.

En una realización, el bacteriófago recombinante se selecciona del grupo de familias que consta de; myoviridae, siphoviridae, podoviridae, corticiviridae, tectiviridae, leviviridae, cystoviridae, inoviridae, lipothruxviridae, ruidiviridae, plasmaviridae y fuselloviridae. En una realización, el bacteriófago es un myoviridae o un siphoviridae. En una realización, el bacteriófago es un siphoviridae.

La proteína de antígeno heterólogo es una proteína bacteriana que se origina a partir de una bacteria grampositiva o gramnegativa. La proteína de antígeno heterólogo está presente naturalmente en una bacteria que es infectable por el bacteriófago recombinante (es decir, la bacteria hospedadora). La proteína heteróloga se expresa a un nivel más alto después de la infección con el bacteriófago recombinante. De esta manera, se puede cebar una respuesta inmunitaria contra una proteína en el hospedador bacteriano tal que la cebadura y la aniquilación se dirijan a la misma bacteria. Este enfoque puede ser aplicable cuando la proteína de antígeno heterólogo se expresa usualmente a un nivel bajo dentro de la bacteria hospedadora.

La proteína de antígeno heterólogo es una proteína estafilocócica, estreptocócica, meningocócica o de *Pseudomonas*, *Propionibacterium*, *Acinetobacter* o una proteína de *P. aeruginosa*, *C. difficile*, *P. acnes* o *N. gonorrhoeae*.

5

La proteína de antígeno heterólogo, después de la expresión, se libera en el citoplasma de una bacteria infectada por el bacteriófago. Esto se puede lograr por la ausencia de una secuencia guía apropiada del antígeno de proteína heteróloga. La proteína de antígeno heterólogo se expresa en la bacteria hospedadora y está inicialmente presente en el citoplasma. Conforme se lisa la bacteria hospedadora, la proteína de antígeno heterólogo se libera de la bacteria y es capaz de interactuar con el sistema inmunitario tal que se provoque una respuesta inmunitaria contra la proteína de antígeno heterólogo. Esto se puede presentar en la muerte de la bacteria.

10

En una realización, el bacteriófago recombinante de la invención comprende un polinucleótido de genoma de fago que incluye al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 genes que codifican para al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 proteínas de antígeno heterólogo. En una realización, cada uno de los genes codifica para una proteína de antígeno heterólogo diferente. En una realización, los genes codifican para múltiples copias de la misma proteína de antígeno heterólogo. Por ejemplo, 1, 2, 3, 4 o 5 genes codifican para copias de la misma proteína de antígeno heterólogo. Alternativamente, 2 genes codifican para 2 proteínas de antígeno heterólogo diferentes, 3 genes codifican para 3 proteínas de antígeno heterólogo diferentes, 4 genes codifican para 4 proteínas de antígeno heterólogo diferentes, 5 genes codifican para 5 proteínas de antígeno heterólogo diferentes, etc.

15

20

En una realización, múltiples proteínas del mismo organismo se codifican por el polinucleótido de genoma de fago. En una realización, cada proteína de antígeno heterólogo es de un organismo separado tal que se provoca una respuesta inmunitaria contra múltiples organismos (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 especies bacterianas o una mezcla de especies bacterianas, virales y/o micóticas). En una realización, el bacteriófago recombinante comprende un genoma que codifica para al menos 1 proteína de antígeno heterólogo, que normalmente se encuentra en un organismo individual. En una realización, el bacteriófago recombinante comprende un genoma que codifica para al menos 2 proteínas de antígeno heterólogo, que normalmente se encuentran en un organismo individual. En una realización, el bacteriófago recombinante comprende un genoma que codifica para al menos 3 proteínas de antígeno heterólogo, que normalmente se encuentran en un organismo individual. En una realización, el bacteriófago recombinante comprende un genoma que codifica para al menos 4 proteínas de antígeno heterólogo, que normalmente se encuentran en un organismo individual. En una realización, el bacteriófago recombinante comprende un genoma que codifica para al menos 5 proteínas de antígeno heterólogo, que normalmente se encuentran en un organismo individual. En una realización, el bacteriófago recombinante comprende un genoma que codifica para al menos 2 proteínas de antígeno heterólogo, que normalmente se encuentran en dos organismos diferentes. En una realización, el bacteriófago recombinante comprende un genoma que codifica para al menos 3 proteínas de antígeno heterólogo, que normalmente se encuentran en dos organismos diferentes. En una realización, el bacteriófago recombinante comprende un genoma que codifica para al menos 4 proteínas de antígeno heterólogo, que normalmente se encuentran en dos organismos diferentes. En una realización, el bacteriófago recombinante comprende un genoma que codifica para al menos 5 proteínas de antígeno heterólogo, que normalmente se encuentran en dos organismos diferentes. En una realización, el bacteriófago recombinante comprende un genoma que codifica para al menos 3 proteínas de antígeno heterólogo, que normalmente se encuentran en tres organismos diferentes. En una realización, el bacteriófago recombinante comprende un genoma que codifica para al menos 4 proteínas de antígeno heterólogo, que normalmente se encuentran en tres organismos diferentes. En una realización, el bacteriófago recombinante comprende un genoma que codifica para al menos 5 proteínas de antígeno heterólogo, que normalmente se encuentran en tres organismos diferentes.

25

30

35

40

45

En una realización, el bacteriófago recombinante es incapaz de llevar a cabo el ciclo lisogénico. Esto se puede lograr al eliminar porciones del polinucleótido de genoma de fago que codifican para enzimas requeridas para el ciclo lisogénico, por ejemplo, genes que codifican para recombinasas. Estas porciones de polinucleótido se reemplazan opcionalmente por un gen que codifica para una proteína heteróloga. En una realización, estas porciones de polinucleótido se reemplazan por un gen que codifica para un gen de aniquilación, por ejemplo, un gen SASP o una nucleasa CRISPR-Cas (Mehta K et al *Biotechnology and Bioengineering* (2016) 113; 2568-2576), WO 04/113375, WO 16/55585, WO 16/55584, WO 16/55586, WO 16/55587).

50

55

El bacteriófago recombinante es capaz de entrar en una bacteria patógena tal como bacteria estafilocócica, estreptocócica, *Pseudomonas*, *Propionibacterium*, *Acinetobacter*, *P. aeruginosa*, *C. difficile*, *P. acnes*, *N. meningitidis* o *N. gonorrhoeae*. El bacteriófago recombinante contiene un polinucleótido de genoma de fago que comprende opcionalmente un gen que codifica para una proteína que se une específicamente a una de las bacterias mencionadas anteriormente. Estos genes se retienen opcionalmente en el polinucleótido de genoma de fago. En una realización, el bacteriófago recombinante se adapta para ingresar a una bacteria de *S. aureus*.

60

En una realización, el bacteriófago recombinante se adapta para degradar la biopelícula. En una realización, esto se logra al modificar el fago para que exprese enzimas disruptivas de biopelícula. En una realización, el

polinucleótido del genoma del bacteriófago recombinante contiene un gen que codifica para la dispersina B (DspB) (Itoh Y et al (2005) J. Bacteriol. 187: 382-387), un gen que codifica para una despolimerasa portada en la superficie del fago que degrada los polisacáridos capsulares bacterianos (Hughes KA et al Microbiology 144: 3039-3047 (1998)) .

5

En una realización, el gen heterólogo codifica para una proteína estafilocócica seleccionada del grupo que consta de SitC/MntC/proteína de unión a saliva, EbhA, EbhB, proteína de unión a elastina (EbpS), EFB (FIB), SBI, ClfA, SdrC, SdrG, SdrH, Lipasa GehD, SasA, FnbA, FnbB, Cna, ClfB, FbpA, Npasa, IsaA/PisA, SsaA, EPB, SSP-1, SSP-2, HBP, proteína de unión a vitronectina, proteína de unión a fibrinógeno, coagulasa, Fig y MAP, lsdA, lsdB, HarA, MntC, toxina alfa (Hla), mutación puntual de toxina alfa destoxificada, opcionalmente con una mutación puntual en H35, proteína de activación de ARN III (RAP), proteína A, una variante de proteína A. En una realización, el gen heterólogo codifica para una proteína descrita en WO 06/32472.

10

El bacteriófago recombinante es como se describe en las reivindicaciones y comprende genes que codifican para una proteína de antígeno heterólogo. Cuando el bacteriófago recombinante ingresa a una célula hospedadora bacteriana, la expresión de la proteína de antígeno heterólogo se impulsa por un promotor apropiado que permite que la proteína de antígeno heterólogo se libere de la célula hospedadora bacteriana, lo que permite que el sistema inmunitario de un hospedador mamífero genere una respuesta inmunitaria contra la proteína de antígeno heterólogo. La respuesta inmunitaria puede generar anticuerpos contra la proteína de antígeno heterólogo (respuesta humoral) o puede generar una respuesta inmunitaria mediada por células T (respuesta celular) o la respuesta inmunitaria puede ser una mezcla de componentes humorales y celulares.

15

20

En una realización, el bacteriófago recombinante es como se describe en las reivindicaciones y comprende un polinucleótido de genoma de fago que incluye un gen que codifica para una proteína de antígeno heterólogo que está bajo el control de un promotor fuerte y un gen de aniquilación que codifica para una proteína que es capaz de aniquilar una bacteria hospedadora bajo el control de un promotor débil y/o tardío, opcionalmente en donde el polinucleótido de genoma de fago se modifica genéticamente tal que el gen que codifica para una proteína de antígeno heterólogo reemplaza a un gen de fago que codifica para una proteína estructural y el gen de aniquilación reemplaza a un gen implicado en el ciclo lisogénico. Esto permite que el bacteriófago recombinante sea incapaz de producir fagos de progenie viables e incapaz de llevar a cabo un ciclo lisogénico. Sin embargo, el bacteriófago recombinante es capaz de generar una proteína de antígeno heterólogo en una cantidad suficiente para cebar una respuesta inmunitaria y aniquilar al hospedador bacteriano a través de la producción de una proteína capaz de aniquilar a la bacteria hospedadora.

25

30

En una realización, el bacteriófago recombinante es como se describe en las reivindicaciones y comprende un polinucleótido de genoma de fago que incluye un gen que codifica para una proteína de antígeno heterólogo que está bajo el control de un promotor fuerte y un gen de aniquilación que codifica para una proteína que es capaz de aniquilar una bacteria hospedadora bajo el control de un promotor débil y/o tardío, opcionalmente en donde el polinucleótido de genoma de fago se modifica genéticamente tal que el gen que codifica para una proteína de antígeno heterólogo reemplaza a un gen de fago que codifica para una proteína estructural y el gen de aniquilación reemplaza a un gen implicado en el ciclo lisogénico. Esto permite que el bacteriófago recombinante sea incapaz de producir fagos de progenie viables e incapaz de llevar a cabo un ciclo lisogénico. Sin embargo, el bacteriófago recombinante es capaz de generar una proteína de antígeno heterólogo en una cantidad suficiente para cebar una respuesta inmunitaria y aniquilar al hospedador bacteriano a través de la producción de una proteína capaz de aniquilar a la bacteria hospedadora. Además, el bacteriófago recombinante se adapta para unirse a una bacteria hospedadora al contener un componente modificado (por ejemplo, una fibra de cola o placa) que se modifica para unirse a la bacteria hospedadora requerida con mayor afinidad que el componente equivalente de un bacteriófago tipo silvestre.

35

40

45

En una realización, el bacteriófago recombinante es como se describe en las reivindicaciones y comprende un polinucleótido de genoma de fago que incluye un gen que codifica para una proteína de antígeno heterólogo que está bajo el control de un promotor fuerte y un gen de aniquilación que codifica para una proteína que es capaz de aniquilar una bacteria hospedadora bajo el control de un promotor débil y/o tardío, opcionalmente en donde el polinucleótido de genoma de fago se modifica genéticamente tal que el gen que codifica para una proteína de antígeno heterólogo reemplaza a un gen de fago que codifica para una proteína estructural y el gen de aniquilación reemplaza a un gen implicado en el ciclo lisogénico. Esto permite que el bacteriófago recombinante sea incapaz de producir fagos de progenie viables e incapaz de llevar a cabo un ciclo lisogénico. Sin embargo, el bacteriófago recombinante es capaz de generar una proteína de antígeno heterólogo en una cantidad suficiente para cebar una respuesta inmunitaria y aniquilar al hospedador bacteriano a través de la producción de una proteína capaz de aniquilar a la bacteria hospedadora. Además, el bacteriófago recombinante se adapta para degradar la biopelícula (por ejemplo, al contener un gen bajo el control de un promotor que expresa enzimas de alteración de la biopelícula) y se adapta para unirse a una bacteria hospedadora al contener un componente modificado (por ejemplo, una fibra de cola o placa) que se modifica para unirse a la bacteria hospedadora requerida con mayor afinidad que el componente equivalente de un bacteriófago tipo silvestre.

50

55

60

Un aspecto adicional de la invención es un polinucleótido de genoma de bacteriófago recombinante que comprende un gen de antígeno heterólogo que codifica para una proteína de antígeno heterólogo en donde la proteína de antígeno heterólogo es una proteína bacteriana que se origina de una bacteria grampositiva o gramnegativa, que es una proteína estafilocócica, estreptocócica, meningocócica o de *Pseudomonas*, *Propionibacterium*, *Acinetobacter* o una proteína de *P. aeruginosa*, *C. difficile*, *P. acnes* o *N. gonorrhoeae*, en donde la proteína de antígeno heterólogo está presente naturalmente en una bacteria que es infectable por el bacteriófago recombinante, en donde la proteína heteróloga se expresa a un nivel más alto después de la infección con el bacteriófago recombinante y es capaz de generar una respuesta inmunitaria contra el hospedador bacteriano, y un gen de aniquilación que codifica para una proteína que es capaz de aniquilar la bacteria hospedadora en donde la proteína de antígeno heterólogo, después de la expresión se libera en el citoplasma de la bacteria infectada por el bacteriófago debido a la ausencia de una secuencia guía del antígeno de proteína heteróloga que se contiene opcionalmente dentro del bacteriófago de la invención o es independiente. La invención abarca el polinucleótido de genoma de bacteriófago recombinante asociado con cualquiera de los bacteriófagos recombinantes descritos anteriormente.

En una realización, el polinucleótido de genoma de bacteriófago recombinante retiene una secuencia asociada con el empaquetamiento del genoma en una cápside de fago y retiene genes asociados con la transcripción y/o replicación del genoma de bacteriófago, pero no retiene todos los genes requeridos para hacer todos los elementos estructurales de un bacteriófago completo. Algunos genes que codifican para proteínas estructurales de un bacteriófago se reemplazan opcionalmente con genes que codifican para uno o más antígenos heterólogos, como se describe anteriormente. En una realización, al menos un gen que codifica para una proteína estructural del bacteriófago se reemplaza por al menos un gen que codifica para una proteína que es capaz de aniquilar una bacteria hospedadora. En una realización, al menos un gen que codifica para una proteína estructural del bacteriófago se reemplaza por al menos un gen que codifica para una proteína de antígeno heterólogo y al menos un gen que codifica para una proteína que es capaz de aniquilar a una bacteria hospedadora.

En una realización, el por lo menos un gen que codifica para una proteína de antígeno heterólogo está bajo el control de un promotor fuerte y/o un promotor temprano. En una realización, el por lo menos un gen que codifica para una proteína que es capaz de aniquilar la bacteria hospedadora está bajo el control de un promotor débil o un promotor tardío.

Una realización adicional de la descripción es una composición farmacéutica que comprende el bacteriófago recombinante o el polinucleótido del genoma del bacteriófago recombinante descrito anteriormente. En una realización, la composición farmacéutica comprende además un excipiente farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, excipientes para permitir la administración como una crema o ungüento tópico.

Un aspecto adicional de la divulgación es una vacuna que comprende el bacteriófago recombinante o el polinucleótido de genoma de bacteriófago recombinante de la invención.

Un aspecto adicional de la divulgación son los usos médicos para el bacteriófago recombinante de la invención. Por consiguiente, se proporciona un bacteriófago recombinante que comprende un polinucleótido de genoma de fago que incluye un gen que codifica para una proteína heteróloga para uso en la prevención profiláctica de la enfermedad infecciosa bacteriana. La enfermedad infecciosa comprende opcionalmente una infección bacteriana, por ejemplo, una infección por *Staphylococcus aureus*.

El uso principal del bacteriófago recombinante de la invención es para el tratamiento y/o prevención de enfermedad bacteriana, particularmente enfermedad infecciosa que implica infección bacteriana o enfermedad que implica componentes bacterianos y virales o bacterianos y micóticos. El bacteriófago recombinante de la invención expresa al menos un antígeno heterólogo a un nivel suficiente para que se produzca una respuesta inmunitaria contra el antígeno heterólogo. El bacteriófago recombinante también expresa un gen de aniquilación tal que el hospedador bacteriano se aniquile después de la expresión del antígeno. De esta manera, una infección se trata al aniquilar un componente bacteriano de la infección y se ceba una respuesta inmunitaria.

A fin de que esta invención se pueda entender mejor, se exponen los siguientes ejemplos. Estos ejemplos son con propósitos de ilustración solamente, y no se van a interpretar como que limitan el alcance de la invención de ninguna manera.

Ejemplos

Ejemplo 1 Producción de un bacteriófago recombinante

Para producir efectivamente el bacteriófago modificado genéticamente, el genoma del bacteriófago se inserta en una estructura principal de cromosoma artificial de levadura (YAC) o cromosoma artificial bacteriano (BAC) que

incluye componentes para la selección y replicación en levadura o bacteria, respectivamente.

Alternativamente, el genoma del fago se puede modificar directamente dentro de las bacterias por el uso de una bacteria competente de recombinación homóloga (figura 1). Por ejemplo, como se describe en Nobrega FL. et al. Trends in Microbiology 2015 23:185

Hay muchas posibilidades para la ingeniería genética de fagos que se muestran en la figura 2. Las porciones del genoma de bacteriófago se pueden eliminar para obtener un genoma de bacteriófago sintético mínimo que retenga las secuencias esenciales para la transcripción y la traducción y la señal de empaquetamiento. Otros genes, incluyendo aquellos que codifican para proteínas implicadas en el ciclo lisogénico y las proteínas de cápside, se pueden eliminar y reemplazar con genes seleccionados. Las cuatro posibilidades descritas en la figura 2 incluyen i) el gen aniquilador (bajo el control de un promotor débil o tardío) que codifica para una proteína capaz de aniquilar la célula hospedadora seleccionada, ii) al menos un gen de antígeno heterólogo, bajo el control de un promotor fuerte o temprano para permitir niveles de expresión suficientemente altos antes de que se aniquile la bacteria hospedadora, iii) una fibra/placa de cola modificada para permitir que el bacteriófago infecte el intervalo requerido de células hospedadoras bacterianas y iv) opcionalmente un gen que codifica para una enzima destructora de biopelícula. La remoción selectiva y el reemplazo de genes permite que el genoma del bacteriófago conserve aproximadamente el mismo tamaño.

El bacteriófago modificado es con base en un genoma de fago mínimo que incluye componentes de genoma de fago esenciales tal como origen de replicación (ori), señales de empaquetamiento y componentes de reconocimiento de cola de fago además de varios componentes heterólogos. El primero de estos componentes es al menos un gen que codifica para un antígeno de vacuna impulsado por un promotor temprano o fuerte. El segundo componente es un gen que codifica para una molécula aniquiladora, cuya expresión se impulsa por un promotor tardío o débil. Un tercer componente opcional es al menos un gen que codifica para una despolimerasa que es capaz de destruir biopelículas, cuya expresión se impulsa por un promotor tardío. Al bacteriófago modificado genéticamente le faltan algunos genes esenciales, por lo que no podrá iniciar un ciclo lítico o lisogénico completo cuando se utiliza en el tratamiento de un sujeto mamífero. Sin embargo, será capaz de replicarse en *E. coli* u otras células bacterianas no patógenas que contienen maquinaria de ensamblaje de cápsides de bacteriófagos, como se muestra en la figura 3. Por ejemplo, una construcción de BAC incluye tanto los componentes de bacteriófagos modificados como los componentes específicos de bacterias (ver figura 3).

Amplificación y purificación de fagos

El bacteriófago modificado se produce en *E. coli* o en una cepa no patógena de la diana bacteriana que expresa la maquinaria de cápside de bacteriófago bajo un promotor inducible o constitutivo.

La célula hospedadora bacteriana se transfecta con un constructo de genoma artificial bacteriano (BAC) o genoma de bacteriófago modificado genéticamente artificial apropiado. Conforme la célula hospedadora bacteriana expresa la maquinaria de cápside *en trans*, la célula hospedadora bacteriana es capaz de producir fagos en los que el genoma del bacteriófago modificado se empaqueta en un bacteriófago completo. La célula hospedadora bacteriana transfectada se cultiva en un medio adecuado, lo que permite que la replicación del fago proceda en las células hospedadoras bacterianas. El crecimiento de fagos se puede monitorear usando turbidez de cultivo, pO₂, pH, o se puede permitir que continúe durante un período predeterminado de tiempo de incubación. Con base en parámetros conocidos de ciclo de vida de fago. Las células infectadas, concentradas por centrifugación, se pueden tratar con solventes orgánicos (por ejemplo, cloroformo), EDTA, lisinas de lisozima o bacteriófago para inducir la lisis y liberar el fago. (Gill JJ y Hyman P Current Pharmaceutical Biotechnology 2010 11:2-14).

Después de la lisis, las células restantes o los restos celulares más grandes se remueven por centrifugación a baja velocidad y se retiene el sobrenadante que contiene el fago. Entonces, el fago se puede purificar por precipitación con polietilenglicol (PEG) seguido por la remoción de PEG por diálisis (Yamamoto et al (1970) 40; 734-744) o al pasar a través de un filtro de 0,2 mm para remover los desechos celulares y entonces al usar filtración de flujo tangencial contra una membrana de 100 kDa que retiene el fago pero permite el pasaje de los componentes de medio y algunas proteínas celulares. Este paso se sigue por cromatografía escalable que puede producir una tasa de recuperación de hasta 70% (Yamamoto et al (1970) 40; 734-744). La cromatografía de hidroxipatita de viriones de expresión en fagos se describe en Biotechniques (2005) 39; 879. El bacteriófago T4 se puede purificar usando columnas de cromatografía monolítica de intercambio aniónico fuerte (Smrekar F et al J. Chromotogr. B Analyt. Technol. Life. Sci. (2008) 861; 177-180).

Tratamiento de la enfermedad utilizando bacteriófago adaptado a cebar y aniquilar

El objetivo general del tratamiento terapéutico con bacteriófagos modificados es tratar la enfermedad bacteriana aguda o crónica y prevenir la recaída de la enfermedad a largo plazo mediante la inmunidad persistente.

Tanto los experimentos *in vitro* como *in vivo* se realizan para demostrar que el concepto de sensibilización y aniquilación de bacteriófagos es capaz de aniquilar las bacterias hospedadoras en tanto que permite que se produzca suficiente antígeno de vacuna para conducir a la cebadura de una respuesta inmunitaria contra el antígeno elegido. Para la demostración *in vitro*, el bacteriófago modificado infectará a las bacterias. El antígeno de vacuna se expresa bajo el control de un promotor fuerte tal que se produzca suficiente antígeno antes de que se aniquile la célula hospedadora. El antígeno se puede secretar en tanto que la bacteria hospedadora está viva o se puede liberar del citoplasma bacteriano después de que se aniquila la bacteria. Una molécula aniquiladora se expresa bajo el control de un promotor tardío tal que la molécula aniquiladora no se exprese hasta que se han expresado cantidades considerables del antígeno de cebadura. Cuando se ha expresado un nivel suficiente de la molécula aniquiladora, esto aniquilará a las bacterias. Por lo tanto, estos experimentos tienen como objetivo demostrar tanto la eficacia de aniquilación como el potencial para inducir inmunidad duradera.

Se utiliza un modelo preclínico *in vivo* que utiliza una bacteria como un patógeno para demostrar el concepto de "cebar y aniquilar". Los animales se infectan con el patógeno bacteriano en un modelo de infección establecido. Posteriormente, los animales se tratan con el bacteriófago modificado. Se toman muestras de sangre de los animales después de 7-14 días para que se puedan evaluar las respuestas inmunitarias contra el antígeno de vacuna y se demuestra la capacidad del bacteriófago para aniquilar el patógeno bacteriano al evaluar el número de CFLI de la bacteria aislable de animales tratados con bacteriófago en comparación a un grupo de control tratado con excipiente. La inducción de una respuesta inmunitaria protectora dirigida al antígeno de vacuna se monitorea por un ensayo adecuado tal como un ELISA en suero tomado del animal.

Los experimentos posteriores demuestran protección contra la recurrencia de la enfermedad provocada por las mismas bacterias. En estos experimentos, los animales se infectan con el patógeno bacteriano y posteriormente con el bacteriófago modificado. Tiene lugar un ciclo inicial de cebar y aniquilar en el que las bacterias infectadas con bacteriófagos ceban una respuesta inmunitaria y posteriormente se aniquilan por la molécula aniquiladora expresada por el bacteriófago recombinante. El ciclo inicial de cebar y aniquilar permite que los animales sobrevivan a la infección inicial con el patógeno bacteriano y se lleguen a cebar. En un punto de tiempo posterior, los animales cebados se estimulan con el patógeno contra el cual se han cebado. La supervivencia, recuperación y carga de patógenos de los animales cebados se comparará a esa de un grupo de control de animales.

Para potenciar la capacidad de la eficacia del concepto de bacteriófago, también se considera la opción de incluir la despolimerasa que degrada la biopelícula en el constructo de bacteriófago modificado. Los experimentos de estimulación descritos anteriormente se repiten usando ya sea un bacteriófago modificado para expresar un antígeno de vacuna y una molécula aniquiladora o un bacteriófago modificado para expresar un antígeno de vacuna, una molécula aniquiladora y una despolimerasa, capaz de degradar la biopelícula. Se demuestra la capacidad de la despolimerasa para potenciar la eficacia del bacteriófago modificado.

Ejemplo 2 - Demostración de la efectividad de un bacteriófago de cebadura y aniquilación

Tanto los experimentos *in vitro* como *in vivo* se realizan para demostrar que los bacteriófagos modificados infectan las bacterias, expresan el antígeno de vacuna y entonces aniquilan las bacterias. Se utilizan dos modelos de estimulación preclínica diferentes para demostrar la capacidad del bacteriófago modificado para aniquilar el patógeno, inducir una respuesta inmunitaria y proteger contra la infección recurrente.

Staphylococcus aureus se utiliza como el patógeno modelo para demostrar el concepto. El antígeno de la vacuna contra la toxina alfa de *Staphylococcus aureus* se selecciona para la prueba de concepto preclínica.

Un genoma de bacteriófago se modifica en un BAG (o genoma de bacteriófago modificado artificialmente apropiado) tal que contenga un α -toxide marcado, desintoxicado de *S. aureus* bajo el control de un promotor temprano fuerte, como el antígeno de vacuna y la maquinaria lítica habitual del bacteriófago bajo un promotor tardío como la molécula aniquiladora. Otros componentes del genoma de bacteriófago se eliminan tal que el genoma de bacteriófago no produzca bacteriófago viable sin la ayuda de una célula hospedadora que contiene maquinaria de cápside de bacteriófago. El BAC se transfecta en *E. coli* que expresa la maquinaria de cápside del bacteriófago bajo un promotor inducible o constitutivo y se cultiva tal que se produzcan bacteriófagos. Estos se recolectan y purifican como se describe anteriormente.

El bacteriófago modificado purificado se evalúa *in vitro* para su capacidad para aniquilar (*S. aureus*) una bacteria hospedadora heteróloga que el bacteriófago se modifica para infectar. En un segundo ensayo *in vitro*, la expresión de un toxide alfa marcado en bacterias hospedadoras (*S. aureus*) infectadas por el bacteriófago modificado se evalúa por transferencia Western usando anticuerpos específicos para el toxide alfa marcado.

Después de demostrar que el bacteriófago modificado tanto aniquila como expresa eficientemente el toxide alfa, el bacteriófago modificado se evalúa en dos modelos *in vivo*: un modelo de exposición letal intranasal de ratón y un modelo de dermonecrosis de conejillo de indias. El modelo de exposición letal intranasal de ratón implica la

ES 3 000 192 T3

5 exposición de ratones negros C57 con 10^7 - 10^9 UFC de una cepa de *S. aureus* tal como Newman o Wright. La capacidad del bacteriófago modificado para proporcionar protección y generar una respuesta inmunitaria se evalúa por el tratamiento con el bacteriófago modificado poco después de la exposición bacteriana. La supervivencia se monitorea durante siete días y la respuesta inmunitaria se evalúa después de 7-21 días. Para el modelo de dermonecrosis de cobaya, las cobayas se exponen por vía intradérmica en seis sitios por cobaya utilizando una cepa secretora de toxina alfa de *S. aureus* (por ejemplo, Newman o Wright). La capacidad del bacteriófago modificado para proporcionar protección y generar una respuesta inmunitaria se evalúa por el tratamiento con el bacteriófago modificado poco después de la exposición bacteriana. La supervivencia se monitorea durante siete días y la respuesta inmunitaria se evalúa después de 7-21 días.

10

REIVINDICACIONES

1. Un bacteriófago recombinante que comprende un polinucleótido de genoma de fago que incluye un gen que codifica para una proteína de antígeno heterólogo, donde la proteína de antígeno heterólogo es una proteína bacteriana que se origina a partir de una bacteria grampositiva o gramnegativa que es una proteína estafilocócica, estreptocócica, meningocócica o de *Pseudomonas*, *Propionibacterium*, *Acinetobacter* o una proteína de *P. aeruginosa*, *C. difficile*, *P. acnes* o *N. gonorrhoeae*, en donde la proteína de antígeno heterólogo está presente naturalmente en una bacteria que es infectable por el bacteriófago recombinante, en donde la proteína heteróloga se expresa a un nivel más alto después de la infección con el bacteriófago recombinante y es capaz de generar una respuesta inmunitaria contra el hospedador bacteriano, y un gen de aniquilación que codifica para una proteína que es capaz de aniquilar la bacteria hospedadora en donde la proteína de antígeno heterólogo, después de la expresión, se libera en el citoplasma de la bacteria infectada por el bacteriófago debido a la ausencia de una secuencia guía del antígeno de proteína heteróloga.
2. El bacteriófago recombinante de la reivindicación 1, donde el bacteriófago recombinante se adapta para unirse a la bacteria hospedadora a través de la modificación de un gen que codifica para una fibra o placa de cola de bacteriófago e insertar el polinucleótido de genoma de fago en esta bacteria hospedadora.
3. El bacteriófago recombinante de cualquiera de las reivindicaciones 1-2, donde la bacteria hospedadora es una bacteria estafilocócica, estreptocócica, meningocócica, o de *Pseudomonas*, *Propionibacterium*, *Acinetobacter*, *P. aeruginosa*, *C. difficile*, *P. acnes* o *N. gonorrhoeae*.
4. El bacteriófago recombinante de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde el gen que codifica para la proteína de antígeno heterólogo está bajo el control de un promotor temprano o un promotor fuerte.
5. El bacteriófago recombinante de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde el gen de aniquilación está bajo el control de un promotor tardío o débil.
6. El bacteriófago recombinante de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, donde el bacteriófago se selecciona del grupo de familias que consta de myoviridae, siphoviridae, podoviridae, corticiviridae, tectiviridae, leviviridae, cystoviridae, inoviridae, lipothrixviridae, ruidiviridae, plasmaviridae y fuselloviridae.
7. El bacteriófago recombinante de la reivindicación 6, donde el bacteriófago es un myoviridae o un siphoviridae.
8. El bacteriófago recombinante de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, donde el bacteriófago recombinante es incapaz de llevar a cabo un ciclo lisogénico por la eliminación de una porción del polinucleótido de genoma de fago que codifica para una enzima requerida para el ciclo lisogénico, por ejemplo, un gen que codifica para una recombinasa.
9. Un polinucleótido de genoma de bacteriófago recombinante que comprende un gen de antígeno heterólogo que codifica para una proteína de antígeno heterólogo donde la proteína de antígeno heterólogo es una proteína bacteriana que se origina a partir de una bacteria grampositiva o gramnegativa, que es una proteína estafilocócica, estreptocócica, meningocócica o de *Pseudomonas*, *Propionibacterium*, *Acinetobacter* o una proteína de *P. aeruginosa*, *C. difficile*, *P. acnes* o *N. gonorrhoeae*, en donde la proteína de antígeno heterólogo está presente naturalmente en una bacteria que es infectable por el bacteriófago recombinante, en donde la proteína heteróloga se expresa a un nivel más alto después de la infección con el bacteriófago recombinante y es capaz de generar una respuesta inmunitaria contra el hospedador bacteriano, y un gen de aniquilación que codifica para una proteína que es capaz de aniquilar la bacteria hospedadora en donde la proteína de antígeno heterólogo, después de la expresión se libera en el citoplasma de la bacteria infectada por el bacteriófago debido a la ausencia de una secuencia guía del antígeno de proteína heteróloga.

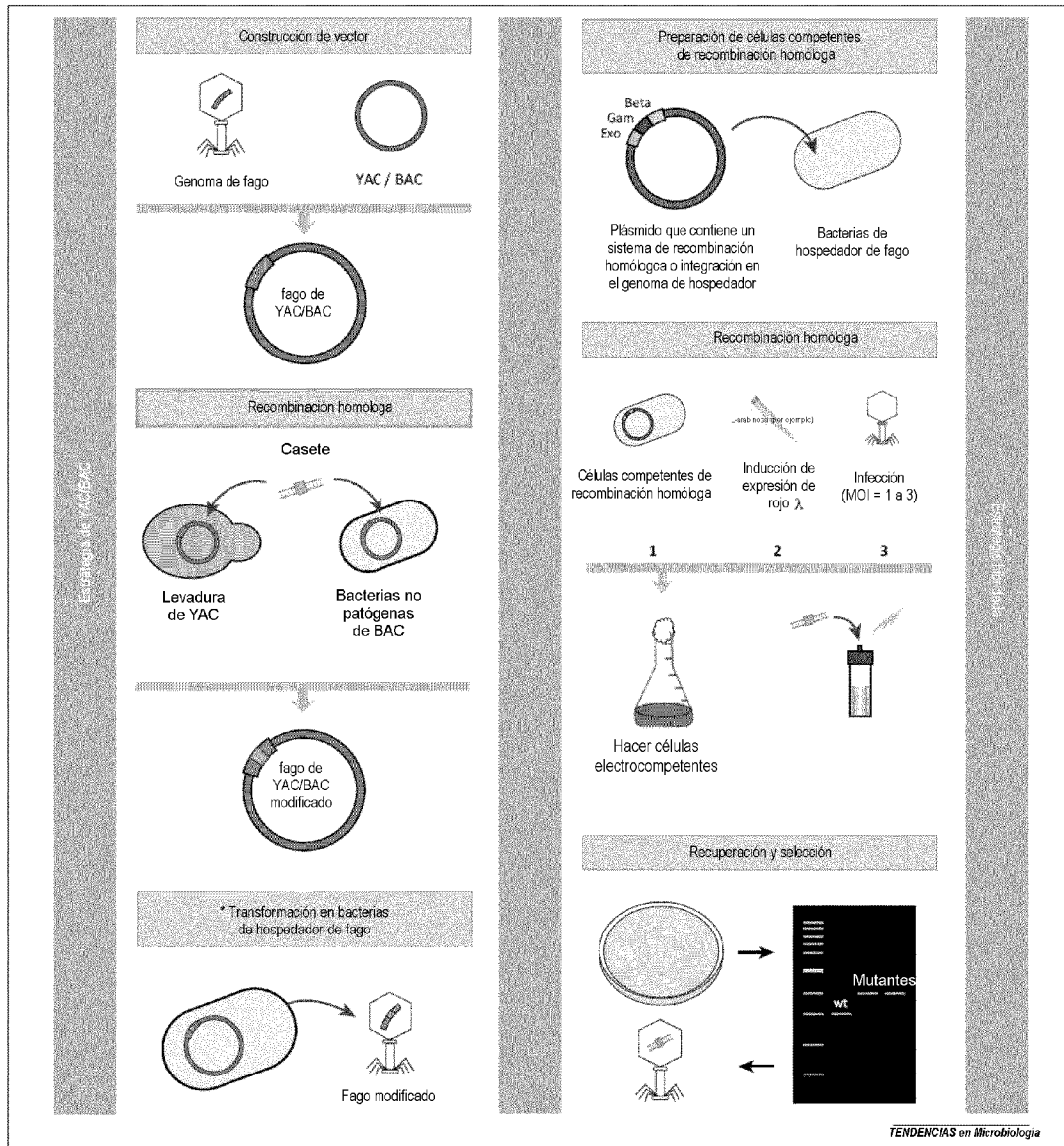
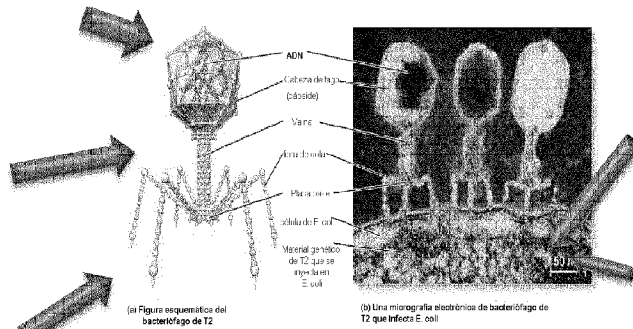


FIGURA 1

Genoma de fago sintético mínimo: Incapaz de lisogenia o propagación, sólo amplificación de genoma

Expresión de Enzima destructora de biopelícula.

Fibras de cola/placa modificada: Reconocimiento de cepa ampliada



Genoma de fago modificado capaz de aniquilar bacterias

Sobreexpresión de carga heteróloga (es decir, antígeno)

FIGURA 2

Diana de E. Coli o bacteria no patógena

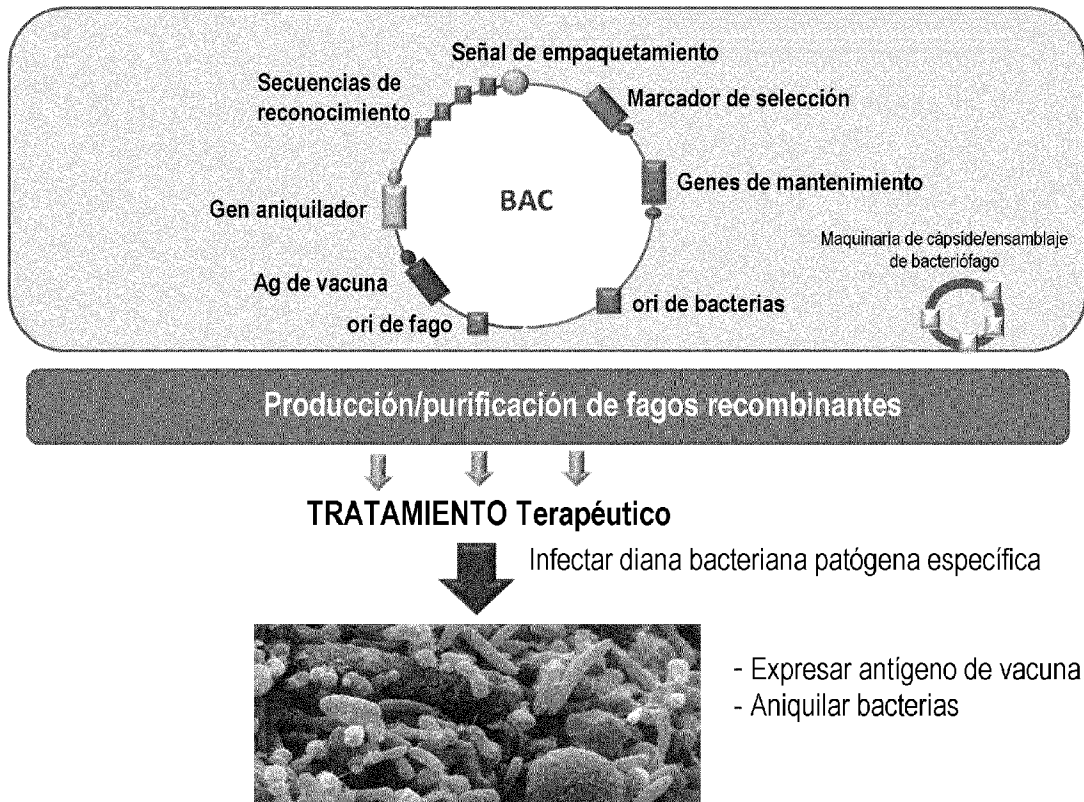


FIGURA 3