



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 283 581**

51 Int. Cl.:
A61K 35/76 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **02751919 .8**

86 Fecha de presentación : **18.07.2002**

87 Número de publicación de la solicitud: **1406642**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **14.04.2004**

54

Título: **Procedimientos de preparación de bacteriófagos polivalentes para el tratamiento de infecciones bacterianas.**

30

Prioridad: **18.07.2001 PL 348740**
30.06.2002 PL 354822

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.11.2007

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.11.2007

73

Titular/es:
**Instytut Immunologii i Terapii Doswiadczalnej-Pan
ul. Weigla 12
53-114 Wroclaw, PL**

72

Inventor/es: **Weber-Dabrowska, Beata;**
Mulczyk, Marian;
Gorski, Andrzej;
Boratynski, Janusz;
Lusiak-Szelachowska, Marzanna y
Syper, Danuta

74

Agente: **Zea Checa, Bernabé**

ES 2 283 581 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

Procedimientos de preparación de bacteriófagos polivalentes para el tratamiento de infecciones bacterianas.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a cepas multivalentes de bacteriófagos, a procedimientos para obtenerlas y a su aplicación en el tratamiento de infecciones bacterianas, particularmente las producidas por cepas de bacterias resistentes a fármacos.

10 **Antecedentes de la invención**

Los bacteriófagos (fagos) son un grupo diverso de virus cuyo ciclo de vida está relacionado exclusivamente con las células bacterianas. Los bacteriófagos se caracterizan por un ciclo de vida lisogénico o lítico. Como agentes antibacterianos son especialmente útiles los bacteriófagos líticos que, después de una infección por células bacterianas a las que son sensibles, se replican dentro de ellas, conduciendo a su destrucción total (por lisis) y a la liberación de nuevos fagos que atacan y destruyen células bacterianas posteriores. Este proceso puede tener lugar tanto *in vitro* como *in vivo*.

Una de las características esenciales de los bacteriófagos es la alta especificidad bien conocida de su actividad lítica. Esta característica se aprovecha, por ejemplo, en la determinación de especies (tipificación de fagos) de diversas bacterias (véanse, por ejemplo, las descripciones de patente GB 2285684, US 5824468 y SU 543260, así como las notificaciones de patente internacional WO 0100786 y WO 0109370). Otras aplicaciones conocidas de bacteriófagos incluyen su utilidad como herramientas en biología molecular, por ejemplo en la expresión y selección de proteínas específicas (por ejemplo, descripción de patente US 6027930) y en la esterilización y limpieza de medios (por ejemplo, descripciones de patente EP 0414304, EP 0290295 y GB 2253859, así como las notificaciones de patente internacional WO 9808944 y WO 9003122). En la producción de vacunas se usan fagos modificados (por ejemplo, documento WO 9505454). También se usan ciertas proteínas procedentes de bacteriófagos (por ejemplo, documentos EP 0510907, US 5470573, WO 9607329). Los procedimientos para aislar bacteriófagos y obtener preparaciones de fagos son bien conocidos y se están perfeccionando constantemente (por ejemplo, documentos GB 829266, CS 192212, RU 2109055).

La terapia con fagos se ha empleado en una escala amplia desde la Segunda Guerra Mundial en el Instituto de Microbiología y Virología de Tbilisi, Georgia. Allí se usa un banco de diversas preparaciones de fagos en el tratamiento de infecciones bacterianas y en profilaxis. Los datos disponibles indican una gran eficacia de la terapia con fagos. Se ha realizado una investigación similar en Polonia durante más de 25 años. En el Laboratorio de Bacteriófagos del Instituto de Inmunología y Terapia Experimental de la Academia Polaca de Ciencias en Wroclaw se usa la terapia con fagos para el tratamiento de infecciones producidas por formas de bacterias resistentes a fármacos y las no susceptibles a antibióticos (véase: Stefan Ślopek *et al.*, Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis, 1981, 31, 293; Stefan Ślopek *et al.*, Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis, 1983, 31, 267; Stefan Ślopek *et al.*, Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis, 1984, 32, 317; Stefan Ślopek *et al.*, Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis, 1985, 33, 219; Stefan Ślopek *et al.*, Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis, 1985, 33, 241; Stefan Ślopek *et al.*, Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis, 1987, 35, 569; Beata Weber-Dabrowska *et al.*, Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis, 2000, 48, 31-37; Beata Weber-Dabrowska *et al.*, Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis, 2000, 48, 547-551). La terapia con fagos realizada en dicho laboratorio durante los últimos 14 años, que ha incluido 1473 pacientes con infecciones purulentas de diferentes tejidos y órganos, indica la alta eficacia de la terapia con fagos.

Se notificó una desaparición completa de los síntomas de la enfermedad y la recuperación de la salud en 1289 casos. Debe subrayarse que al menos en una docena o un número similar de casos la terapia con fagos presentó la única posibilidad de eliminar la infección que ponía en peligro la vida. La terapia se realizó en pacientes individuales afectados. Consistía en:

- a) el crecimiento e identificación de cepas bacterianas aisladas a partir de un material obtenido del paciente,
- b) determinación de la susceptibilidad de la cepa a fagos específicos y selección del fago que muestra la mayor actividad lítica hacia la cepa,
- c) preparación de un lisado del fago con un gran número de partículas de fago,
- d) producción de una preparación estéril del fago para el tratamiento.

Este procedimiento es bastante costoso, laborioso y requiere tiempo. En algunas ocasiones, pasan de 7 a 10 días desde el momento de la 5 obtención del material de investigación hasta que se dispone de la preparación de fago esterilizada y terminada para el tratamiento. Este periodo de retraso es demasiado largo en ciertas patologías.

Con el procedimiento empleado hasta ahora no puede realizarse una terapia con fagos a escala amplia.

Las infecciones que acompañan a la mucoviscidosis presentan un problema particular. Ésta es una enfermedad sistémica hereditaria consistente en una disfunción de las glándulas secretoras de moco, predisposición del paciente a enfermedades bronquiales y pulmonares crónicas. El moco secretado es espeso y pegajoso, lo cual dificulta su eliminación por las vías naturales (tosiendo). La acumulación y persistencia de moco en los bronquios y la imposibilidad de eliminarlo crea condiciones favorables para infecciones bacterianas, produciéndose bronquitis crónica y neumonía. Los patógenos más amenazadores que producen infecciones que acompañan a la mucoviscidosis son *Staphylococcus aureus* y bacilos del género *Pseudomonas*. Las infecciones recurrentes permanentemente por estos microorganismos producen cambios patológicos graves en el sistema respiratorio y la muerte prematura. Pocos pacientes sobreviven más de 25 años. El tratamiento de estas infecciones con los antibióticos disponibles ha creado un problema terapéutico serio a nivel mundial, especialmente en los 5 últimos años. La terapia con antibióticos de estas infecciones se ha ido haciendo cada vez menos eficaz debido a que la inmensa mayoría de cepas bacterianas muestran resistencia a todos los antibióticos, incluyendo el antibiótico de último recurso - vancomicina. Por lo tanto, existe la necesidad urgente de introducir un método terapéutico alternativo en la práctica médica para el tratamiento de infecciones bacterianas refractarias y muy peligrosas.

Objetivo de la invención

En los últimos años se ha visto una propagación masiva de cepas bacterianas resistentes a todos los antibióticos, incluyendo la vancomicina, el antibiótico de último recurso. Como resultado, el tratamiento con antibióticos de infecciones bacterianas inducidas por estas formas resistentes a fármacos es ineficaz. Esta situación ha creado problemas terapéuticos drásticos. De esta manera, existe la necesidad urgente de introducir métodos terapéuticos alternativos en la práctica médica para el tratamiento de infecciones bacterianas refractarias.

Teniendo en cuenta el objetivo anterior, esta invención es una elaboración de un procedimiento para obtener cepas de fagos multivalentes que pueden usarse en la producción de preparaciones de eficacia garantizada en el tratamiento de infecciones bacterianas sin la necesidad de seleccionar fagos individuales en cada caso. En esta realización particular, el objetivo de la invención es la presentación de una forma que permite obtener preparaciones de fagos de alta pureza, en particular sin endotoxinas.

Un objetivo particular de la invención es obtener preparaciones de fagos polivalentes que puedan emplearse eficazmente en el tratamiento de infecciones bacterianas asociadas con mucoviscidosis sin necesidad de realizar una selección de fagos individuales en cada caso.

Explicación de la invención

La presente invención proporciona un procedimiento para obtener una cepa de bacteriófago multivalente, mediante el cual:

- a) se acumula un número suficiente (n) de diferentes cepas de patógenos bacterianos de un género definido, que aparecen aleatoriamente en una región dada, con lo que las cepas bacterianas aisladas preferiblemente son resistentes a fármacos,
- b) se acumula un número suficiente de diferentes cepas de bacteriófagos, específicas para al menos una de las cepas bacterianas del género dado,
- c) se determina la actividad lítica de una cepa de bacteriófago acumulada en cada cepa bacteriana acumulada, y después se calcula el valor p , que es la proporción entre el número de cepas lisadas por un fago dado y el número de todas las cepas bacterianas acumuladas;
- d) para el valor resultante de p , se determina si n cumple la condición:

$$n \geq \frac{pq}{d^2} z_{1-\alpha}^2$$

donde:

$$q = 1 - p$$

d es una constante no mayor de 0,1, óptimamente no mayor del 10% de p

$z_{1-\alpha}$ es una variable aleatoria de la distribución normal dependiente del factor de confianza $1 - \alpha$, que no es menor de 0,95,

- e) se selecciona la cepa de bacteriófago que cumple el criterio definido en d) y tiene un valor de p no menor de $2/n$, preferiblemente no menor de 0,5.

ES 2 283 581 T3

El intervalo de actividad lítica de cada bacteriófago aislado se determina en relación con la población de cepas bacterianas patógenas presentes en la región dada. Para este fin, debe acumularse una colección suficientemente grande de cepas bacterianas resistentes a fármaco elegidas aleatoriamente. En relación con la gran muestra establecida de bacterias de un tamaño de población de n cepas (en el ejemplo descrito, n era 845 y 880, respectivamente, para las cepas resistentes a fármacos de *Pseudomonas* y *Staphylococcus* aisladas en Polonia), se calcula la frecuencia de éxito o se estudia la proporción entre el número de cepas lisadas por un fago dado y el número total de cepas estudiadas. Esta frecuencia se considera la probabilidad de éxito p . La probabilidad de fallo entonces es $q = 1 - p$.

Es esencial elegir el tamaño n que debe tener una muestra para que pueda considerarse representativa de la población general de cepas del género dado (por ejemplo, *Pseudomonas* o *Staphylococcus*). Para este fin, se establece el siguiente criterio para que la muestra sea representativa:

$$P(|v - p| < d) = P(-d < v - p < d) = 1 - \alpha$$

La probabilidad de que el valor absoluto de la diferencia entre la frecuencia de la muestra v y la probabilidad de éxito p sea menor que el valor preasignado de d es $1 - \alpha$, que corresponde a un nivel de confianza de $1 - \alpha$. Normalmente se establece un valor de $1 - \alpha$ de 0,95 ó 0,98.

El número de muestras n debe cumplir la condición:

$$n \geq \frac{pq}{d^2} z_{1-\alpha}^2$$

donde $z_{1-\alpha}$ es una variable aleatoria de la distribución normal. Para $1 - \alpha = 0,95$, $z_{1-\alpha} = 1,96$, y para $1 - \alpha = 0,98$, $z_{1-\alpha} = 2,33$. Basándose en este criterio y en el valor de la frecuencia p obtenida para el fago caracterizado, asignando valores razonables a d y al intervalo de confianza $1 - \alpha$, es posible verificar la magnitud n usada para determinar el intervalo de actividad lítica de un fago dado y averiguar si la actividad lítica obtenida para esta magnitud n , con los valores asignados de d y $1 - \alpha$, puede considerarse correcta con respecto a la población general de las cepas bacterianas del género dado.

La cepa de bacteriófagos preferiblemente se aísla en la etapa b) a partir de una muestra procedente del medio pasándola a través de un filtro de membrana con un tamaño de poro de 0,2 - 0,4 μm , añadiendo medio de cultivo al filtrado y mezclándolo con un caldo de cultivo de bacterias del género definido, incubando esta mezcla a una temperatura de aproximadamente 37°C durante aproximadamente una hora, retirando una parte de la suspensión y extendiéndola sobre placas con medio de cultivo sólido, incubando a aprox. 37°C durante un periodo de 2 a 24 horas, aislando una muestra del medio que rodea a la calva individual, transfiriéndola al caldo de cultivo de bacterias del género definido e incubando hasta que se aclara el cultivo, y obteniendo la preparación de bacteriófagos pasando el lisado a través de un filtro de membrana con un tamaño de poros de 0,2 - 0,4 μm , prefiriéndose repetir la inoculación del medio de cultivo sólido y el re-aislamiento de las calvas 5 veces.

Las cepas bacterianas de la etapa c) preferiblemente se inoculan en un medio de cultivo sólido, sobre el cual se deposita una parte de la preparación de bacteriófagos obtenida en la etapa b), y se incuban a aproximadamente 37°C durante aproximadamente 4 horas, después de lo cual la temperatura se fija a aproximadamente 4°C durante un periodo de aproximadamente 2 a 24 horas, demostrándose la actividad lítica de la cepa del bacteriófago por la aparición de, al menos, calvas individuales.

Después, es posible realizar una purificación adicional del lisado, particularmente con respecto a las endotoxinas, poniendo en contacto la mezcla que contiene bacteriófagos con un sustrato que contiene celulosa o un derivado parcialmente esterificado de la misma, y después aclarando con una solución que elimina las impurezas, especialmente las endotoxinas, después de lo cual los bacteriófagos purificados se retiran por lavado. La endotoxina puede eluirse eficazmente con agua, una solución de una sustancia no disociadora, o una solución salina con una concentración no mayor de 0,1 M, posiblemente tamponada. La fracción de bacteriófago también puede eluirse eficazmente con una solución de una sustancia no disociadora, o cualquier tampón, o una solución salina de concentración mayor de 0,05 M, posiblemente tamponada. Además, la elución de la endotoxina y los bacteriófagos se realiza a temperaturas comprendidas entre -25°C y +100°C. Preferiblemente, la elución de la endotoxina y el bacteriófago puede realizarse usando una solución salina acuosa que contiene un disolvente orgánico. El disolvente orgánico en el mejor de los casos se selecciona entre un grupo que comprende dimetilsulfóxido, dimetilformamida, isopropanol y acetona, y como sustrato puede usarse celulosa parcialmente esterificada con un ácido orgánico o inorgánico. Puede usarse un sustrato de celulosa parcialmente esterificada con ácido acético, nítrico, sulfuroso o fosfórico, en particular, como sustrato puede usarse celulosa de la que se han esterificado de un 0,01 a un 5% de las moléculas de glucosa, preferiblemente de un 0,25 a un 1%, más preferiblemente de un 0,5 a un 1% de las moléculas de glucosa.

Preferiblemente, las cepas bacterianas patógenas son de los géneros *Staphylococcus* o *Pseudomonas*.

Otro aspecto de la invención es una medicación para el tratamiento o prevención de infecciones producidas por patógenos bacterianos que contiene un agente activo y un posible portador farmacéuticamente admisible, de tal forma que el agente activo comprende una cepa de bacteriófago multivalente específica para las bacterias del género indicado y obtenida usando el procedimiento de esta invención.

5

De acuerdo con la invención, la medicación puede tener la característica de que, como cepa de bacteriófago multivalente específica para bacterias del género *Staphylococcus*, contiene al menos una cepa de bacteriófagos seleccionada entre S1 (PCM F/00001), S2 (PCM F/00002), S3 (PCM F/00003), S4 (PCM F/00004), S5 (PCM F/00006), S6 (PCM F/00006) y S7 (PCM F/00007), preferiblemente los fagos S1, S2 y S4 o S5. Esta medicación producida de acuerdo con un aspecto de la invención es de utilidad en el tratamiento o prevención de infecciones que se producen en personas que padecen mucoviscidosis y, como cepa de bacteriófagos multivalentes específica para bacterias del género *Staphylococcus*, contiene al menos una cepa de bacteriófagos seleccionada entre F/00002, F/00004 y F/00007.

10

De acuerdo con la invención, la medicación debería tener la característica de que, como cepa de bacteriófagos multivalentes específica para bacterias del género *Pseudomonas*, contiene al menos una cepa de bacteriófagos seleccionada entre P1 (PCM F/00008), P2 (PCM F/00009), P3 (PCM F/00010), P4 (PCM F/00011), P5 (PCM F/00012), P6 (PCM F/00013), P7 (PCM F/00014), P8 (PCM F/00015), P9 (PCM F/00016), P10 (PCM F/00017), P11 (PCM F/00018), P12 (PCM F/00019), P13 (PCM F/00020), P14 (PCM F/00021), P15 (PCM F/00022), P16 (PCM F/00023), P17 (PCM F/00024), P18 (PCM F/00025), P19 (PCM F/00026) y P20 (PCM F/00027), óptimamente los fagos P7, P20 y P6. La medicación producida de acuerdo con cierto aspecto de la invención es de utilidad en el tratamiento o prevención de infecciones que se producen en personas que padecen mucoviscidosis y, como cepa de bacteriófagos multivalentes específica para bacterias del género *Pseudomonas*, contiene al menos una cepa de bacteriófagos seleccionada entre F/00010, F/00013 y F/00018.

15

20

Otro objeto de esta invención es la aplicación de una cepa de bacteriófagos multivalentes obtenida de acuerdo con el procedimiento de la invención en el desarrollo de una medicación para el tratamiento o prevención de infecciones bacterianas producidas por patógenos bacterianos.

25

Para la producción de una medicación para el tratamiento o prevención de infecciones producidas por bacterias del género *Staphylococcus*, es ventajoso el empleo de al menos una cepa de bacteriófagos seleccionada entre S1 (PCM F/00001), S2 (PCM F/00002), S3 (PCM F/00003), S4 (PCM F/00004), S5 (PCM F/00006), S6 (PCM F/00006) y S7 (PCM F/00007), óptimamente los fagos S1, S2 y S4 o S5. Para la creación de una medicación para el tratamiento o prevención de infecciones producidas por bacterias del género *Staphylococcus* en personas que padecen mucoviscidosis, es ventajoso el uso de al menos una cepa de bacteriófagos elegida entre F/00002, F/00004 y F/00007.

30

35

También es ventajoso para la creación de una medicación para el tratamiento o prevención de infecciones producidas por bacterias del género *Pseudomonas* el uso de al menos una cepa de bacteriófagos seleccionada entre P1 (PCM F/00008), P2 (PCM F/00009), P3 (PCM F/00010), P4 (PCM F/00011), P5 (PCM F/00012), P6 (PCM F/00013), P7 (PCM F/00014), P8 (PCM F/00015), P9 (PCM F/00016), P10 (PCM F/00017), P11 (PCM F/00018), P12 (PCM F/00019), P13 (PCM F/00020), P14 (PCM F/00021), P15 (PCM F/00022), P16 (PCM F/00023), P17 (PCM F/00024), P18 (PCM F/00025), P19 (PCM F/00026) y P20 (PCM F/00027), óptimamente los fagos P7, P20 y P6. Para la creación de una medicación para el tratamiento o prevención de infecciones producidas por bacterias del género *Pseudomonas* en personas que padecen mucoviscidosis es ventajoso el uso de al menos una cepa de bacteriófagos seleccionada entre F/00010, F/00013 y F/00018.

40

45

Otro objeto de la invención es una cepa de bacteriófagos multivalentes específica para bacterias del género *Staphylococcus* seleccionada entre S1 (PCM F/00001), S2 (PCM F/00002), S3 (PCM F/00003), S4 (PCM F/00004), S5 (PCM F/00006), S6 (PCM F/00006) y S7 (PCM F/00007), óptimamente entre S1, S2, S4 y S5.

50

55

Un objeto de la invención también es una cepa de bacteriófagos multivalentes específica para bacterias del género *Pseudomonas*, seleccionada entre P1 (PCM F/00008), P2 (PCM F/00009), P3 (PCM F/00010), P4 (PCM F/00011), P5 (PCM F/00012), P6 (PCM F/00013), P7 (PCM F/00014), P8 (PCM F/00015), P9 (PCM F/00016), P10 (PCM F/00017), P11 (PCM F/00018), P12 (PCM F/00019), P13 (PCM F/00020), P14 (PCM F/00021), P15 (PCM F/00022), P16 (PCM F/00023), P17 (PCM F/00024), P18 (PCM F/00025), P19 (PCM F/00026) y P20 (PCM F/00027), óptimamente entre P7, P20 y P6.

En la investigación se usó la propia colección de fagos de los presentes solicitantes activos contra especies de bacterias que son los factores etiológicos más frecuentes de las infecciones bacterianas de los seres humanos. Los ejemplos prácticos descritos hacen referencia a bacteriófagos multivalentes que actúan líticamente sobre cepas de estafilococos (*Staphylococcus aureus*), incluyendo sus cepas resistentes a meticilina, y el bacilo del pus azul (*Pseudomonas aeruginosa*), que aparece en los pacientes de mucoviscidosis en particular. Estas especies actualmente son la causa de infecciones graves que producen una alta mortalidad.

60

Ventajas de la invención

65

La introducción en terapia de preparaciones de fagos polivalentes que contienen fagos multivalentes obtenidos por medio de esta invención es un avance importante para combatir infecciones bacterianas que no son susceptibles de tratamiento con antibióticos. Con esta nueva tecnología también se asocian ciertas ventajas económicas. Permite una

reducción significativa en los costes de material y acorta el tiempo desde la recogida del material para el examen hasta la obtención de la preparación de fagos terapéutica. Gracias a esto, la preparación de fagos esperará al paciente, y no el paciente a la producción de la preparación de fagos individual.

5 La amplia serie de preparaciones de fagos líticos compuestas de varios fagos multivalentes obtenidos por medio del procedimiento de esta invención es una ventaja muy importante desde el punto de vista de su aplicación en el tratamiento de infecciones bacterianas. Es bien conocido que dentro de una población bacteriana, pueden aparecer formas resistentes a bacteriófagos con una frecuencia de aproximadamente 1×10^{-7} . En presencia de dos fagos, la frecuencia de esta mutación es de aproximadamente 1×10^{-4} y con tres fagos sólo de 1×10^{-21} . Con esta disposición, prácticamente no existe el problema de resistencia de las cepas bacterianas a los fagos.

10 La gran aplicabilidad de las medicaciones ejemplificadas compuestas de fagos multivalentes merece un énfasis especial. Pueden emplearse en la práctica médica en general y proporcionan un medio de copia eficaz con infecciones bacterianas de riesgo. También es posible aprovechar fagos obtenidos de acuerdo con esta invención en la preparación de medicaciones para uso externo, empleándolos, por ejemplo, en el tratamiento y prevención de infecciones dermatológicas. Se ha descubierto que la administración oral de lisados de fagos obtenidos de acuerdo con esta invención aumenta la resistencia a una posible infección bacteriana futura.

20 En ciertos casos, la terapia con fagos puede usarse junto con una terapia con antibióticos.

Se ha demostrado que las preparaciones de fagos polivalentes usadas en el tratamiento de infecciones bacterianas son muy eficaces. Se ha observado una eficacia particular en el tratamiento de sepsis (con una proporción de cura del 88%) y en el tratamiento de infecciones en pacientes con mucoviscidosis.

25 Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 presenta los resultados del análisis de parámetros estadísticos adquiridos para los fagos S1 -S7.

30 La Figura 2 presenta los resultados del análisis de parámetros estadísticos adquiridos para los fagos P1-P20.

La Figura 3 presenta los resultados del análisis estadístico de la eficacia de cepas de fagos seleccionadas con respecto a cepas bacterianas que pertenecen al género *Staphylococcus* aisladas a partir de pacientes con mucoviscidosis.

35 La Figura 4 presenta los resultados del análisis estadístico de la eficacia de cepas de fagos seleccionadas con respecto a cepas bacterianas que pertenecen al género *Pseudomonas* aisladas a partir de pacientes con mucoviscidosis.

40 Para comprender mejor la esencia de la invención, se ilustra a continuación por medio de ejemplos.

Ejemplo 1

Aislamiento de bacteriófagos

45 Se aislaron bacteriófagos para *Staphylococcus* y *Pseudomonas* a partir de aguas residuales municipales. Las aguas residuales se pasaron a través de un filtro de membrana con un tamaño de poro de 0,2 - 0,4 μm , que captura las bacterias pero permite que los bacteriófagos pasen a su través. A partir del filtrado resultante, se añadió medio de cultivo líquido concentrado y se mezclaron diferentes diluciones de filtrado con caldos de cultivo jóvenes de bacterias (*Staphylococcus aureus* o *Pseudomonas aeruginosa*). Las muestras se incubaron a 37°C durante 1 hora, después de lo cual se extrajeron 0,2 ml de suspensión de cada muestra con una pipeta y se extendieron en placas que contenían medio de agar usando una varilla de vidrio, y las placas se incubaron durante la noche a 37°C. En caso de que estuviera presente el fago deseado en las placas inoculadas con la dilución adecuada de filtrado que contenía el cultivo bacteriano joven, se observaba un crecimiento uniforme (nebuloso) de bacterias, campos pequeños transparentes separados, las denominadas calvas, que normalmente contenían varios millones de partículas de fagos. La calva individual junto con el agar que la rodeaba se cortó con la ayuda de un asa de platino, después se transfirió a un nuevo caldo de cultivo de bacterias y se incubó hasta que el cultivo se aclaró. Después de pasarlo a través de un filtro de membrana con un tamaño de poro de 0,2 - 0,4 μm , que retiene cualquier bacteria que quede en el lisado, el filtrado contenía sólo bacteriófagos. La inoculación de diferentes diluciones de los fagos obtenidos con las respectivas bacterias en medio de agar, y el re-aislamiento de las calvas se realizaron cinco veces, lo cual permitió obtener una línea pura de fagos.

Ejemplo 2

Determinación de la susceptibilidad de cepas de Staphylococcus aureus a microorganismos bacteriófagos específicos para ellas

65 La susceptibilidad se determinó usando el medio de cultivo descrito por Wahl. Se secaron placas con este medio a una temperatura de 37°C durante 30 minutos, se cubrieron con un caldo de cultivo joven de 4 horas de *Staphylococcus*

ES 2 283 581 T3

aureus que se mezcló por agitación, se retiró el exceso de la suspensión con una pipeta y las placas se secaron de nuevo durante 30 minutos a 37°C. En una placa, dividida en 6 segmentos, se determinaron las susceptibilidades de la cepa que se estaba estudiando frente a 6 bacteriófagos diferentes pero específicos. Se puso una gota de una dilución de bacteriófago 1/10 en la superficie de cada segmento. Las placas se incubaron en una estufa a 37°C durante aproximadamente 4 horas, después de lo cual se pusieron en un refrigerador hasta el día siguiente. En caso de una alta susceptibilidad de la cepa al fago definido, son visibles campos transparentes en el sitio en el que se introdujo el fago en el medio de cultivo que estaba cubierto uniformemente con el cultivo bacteriano, siendo estos el resultado de la destrucción total de las células bacterianas (lisis). Una menor susceptibilidad de la cepa se manifiesta por la aparición de calvas individuales.

Ejemplo 3

Determinación de la susceptibilidad de cepas de Pseudomonas a microorganismos bacteriófagos específicos para ellas

El procedimiento para determinar la sensibilidad fue similar al descrito en el Ejemplo 2. En este caso, sin embargo, el medio de reserva fue agar con un suplemento de tampón fosfato y el tiempo de incubación del fago depositado en las placas fue de 5 horas.

Ejemplo 4

Selección de fagos con el espectro más amplio de actividad con respecto a cepas de Staphylococcus y Pseudomonas - obtención de cepas de fagos multivalentes

Se aislaron bacteriófagos de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 1. Se determinaron las susceptibilidades de 845 cepas clínicas resistentes a fármacos de diversas especies de *Staphylococcus* aisladas en toda Polonia a fagos de la colección de bacteriófagos específica para *Staphylococcus*, y las susceptibilidades de 880 cepas clínicas resistentes a fármacos de diferentes especies de *Pseudomonas* a fagos de la colección de bacteriófagos específica para *Pseudomonas*.

Un análisis de las susceptibilidades de los dos grupos de cepas a los fagos respectivos permitió la selección de fagos con una actividad inesperadamente elevada y un amplio espectro de efecto lítico. Estos fagos se presentan en las tablas 1 y 2.

TABLA 1

Fagos para Staphylococcus con alta actividad lítica depositados en la Polish Collection of Microorganisms (PCM), Wroclaw, Polonia

| DENOMINACIÓN DEL FAGO | POLISH COLLECTION OF MICROORGANISMS (PCM) NÚMERO DE ACCESO DEL DEPÓSITO |
|-----------------------|---|
| S1 | F/00001 |
| S2 | F/00002 |
| S3 | F/00003 |
| S4 | F/00004 |
| S5 | F/00005 |
| S6 | F/00006 |
| S7 | F/00007 |

TABLA 2

Fagos para *Pseudomonas* con alta actividad lítica depositados en la Polish Collection of Microorganisms (PCM),
Wrocław, Polonia

| DENOMINACIÓN DEL FAGO | POLISH COLLECTION OF MICROORGANISMS (PCM) NÚMERO DE ACCESO DEL DEPÓSITO |
|-----------------------|--|
| P1 | F/00008 |
| P2 | F/00009 |
| P3 | F/00010 |
| P4 | F/00011 |
| P5 | F/00012 |
| P6 | F/00013 |
| P7 | F/00014 |
| P8 | F/00015 |
| P9 | F/00016 |
| P10 | F/00017 |
| P11 | F/00018 |
| P12 | F/00019 |
| P13 | F/00020 |
| P14 | F/00021 |
| P15 | F/00022 |
| P16 | F/00023 |
| P17 | F/00024 |
| P18 | F/00025 |
| P19 | F/00026 |
| P20 | F/00027 |

Los resultados para los fagos S1-S7 y P1-P20 se sometieron a un análisis estadístico para determinar si los valores de p obtenidos para los fagos particulares pueden considerarse correctos para las poblaciones generales de los géneros respectivos de bacterias. Los resultados se presentan en las Figuras 1 y 2. Los valores calculados de n para la mayoría de los bacteriófagos fueron menores que el número de cepas bacterianas de las muestras de investigación, lo que sugiere que los intervalos de los espectros líticos son al menos correctos con respecto a las cepas clínicas que aparecen en Polonia. Considerando estos resultados, los fagos indicados en las Tablas 1 y 2 pueden considerarse fagos multivalentes con respecto a esta invención.

Inesperadamente, en el caso de los fagos para *Staphylococcus*, 3 de los 7 más activos, es, es decir S1, S2 y S4 o S5, presentaron actividad lítica en el 95% de las cepas de *Staphylococcus* estudiadas. Además, 3 de los 21 fagos seleccionados para *Pseudomonas*, es decir P7, P20 y P6, presentaron actividad lítica en el 87% de las cepas de *Pseudomonas* estudiadas.

También se pueden considerar los pacientes que padecen mucoviscidosis como una “región dada de la aparición de una infección bacteriana”, como se define en la esencia de la invención. En el estudio de los patógenos que aparecen en este grupo de pacientes, se usaron 137 cepas bacterianas de las que se identificaron 84 como *Pseudomonas* y 53 como *S. aureus*. Todas las cepas se aislaron a partir de un material procedente de pacientes con mucoviscidosis de toda Polonia. El análisis de la susceptibilidad en las cepas de *Pseudomonas* y *S. aureus* estudiadas a los fagos permitió la selección de fagos con la mayor actividad lítica y el intervalo de acción más amplio. Inesperadamente, en el caso de fagos para *Pseudomonas*, 3 de los 21 fagos activos, es decir, F/00010, F/00013 y F/00018, presentaron actividad lítica

ES 2 283 581 T3

en el 75% de las cepas de *Pseudomonas* (véase la probabilidad de éxito en la fig. 3, en la que el fago 3 = F/00010, fago 6 = F/00013 y fago 11 = F/00018). Entre los fagos seleccionados para *Staphylococcus*, 3, es decir F/00002, F/00004 y F/00007, presentaron actividad lítica en el 98% de las cepas de *Staphylococcus* (véase la probabilidad de éxito en la fig. 4, en la que fago 1 = F/00002, fago 3 = F/00004 y fago 4 = F/00007).

5

Ejemplo 5

Replicación de fagos contra Staphylococcus y fagos contra bacilos Gram-negativos, obteniendo lisados de fagos

10 Se añadió un lisado de fagos de aproximadamente un 5% a cultivos jóvenes de 4 horas de *Staphylococcus aureus* (fase logarítmica) en medio de caldo suplementado con glucosa. Los tubos de ensayo o frascos se mezclaron por agitación y se incubaron durante 3 horas a 37°C. Después de la aparición de un cultivo transparente (lisis), las muestras se mantuvieron en frío hasta el día siguiente. El lisado se pasó a través de un filtro de membrana con un tamaño de poro de 0,2-0,4 μm para retirar todas las células bacterianas no lisadas restantes. La concentración de partículas de fagos vivas se determinó por el procedimiento de dos capas de Gratia. Como control se utilizó un cultivo incubado sin la adición de lisado de fago.

15

Replicación de fagos contra bacilos Gram-negativos (*Pseudomonas*). Se usó agua de peptona para replicar fagos contra *Pseudomonas*. Se añadió un lisado de fagos al 5% a un cultivo joven de 4 horas de *Pseudomonas aeruginosa*, los tubos de ensayo o los frascos se mezclaron por agitación y las muestras se incubaron durante 5 horas a 37°C. Después de aclararse el cultivo, las muestras se dejaron hasta el día siguiente en un refrigerador, después de lo cual se filtraron a través de un filtro de membrana con el tamaño de poro indicado anteriormente. El número de partículas de fago vivas en el lisado se determinó por el procedimiento de Gratia.

20

25 Los lisados de fagos en caldo estéril muestran una actividad lítica de larga duración. Cuando se mantienen en frío, conservan su vitalidad durante varios años, en algunos casos durante más de 10 años.

Ejemplo 6

La producción y aplicación de preparaciones de fagos polivalentes

30 El lisado de caldo estéril obtenido por el procedimiento descrito en el Ejemplo 5, procedente de los fagos seleccionados con un amplio espectro de actividad lítica en el Ejemplo 4, o sus formas concentradas o purificadas adicionalmente (véase el siguiente ejemplo) se utilizaron en la preparación de medicaciones con fagos polivalentes.

35

La preparación de fagos polivalentes ejemplificada contra *Staphylococcus* es una mezcla que contiene diferentes cantidades de lisados de fagos S1, S2 y S4 o S5, o derivados de estos lisados. Para infecciones producidas por *Staphylococcus* en pacientes con mucoviscidosis, deberían usarse preparaciones de fagos F/00002, F/00004 y F/00007.

40

La preparación de fagos polivalentes ejemplificada contra *Pseudomonas* es una mezcla que contiene diferentes cantidades de los lisados de fagos P7, P20 y P6, o derivados de estos lisados. Para infecciones producidas por *Pseudomonas* en pacientes con mucoviscidosis, deberían usarse preparaciones de fagos F/00010, F/00013 y F/00018.

45

La medicación se administra por vía oral 3 veces al día, en cantidades correspondientes a 10 ml de lisado, 30 minutos antes de las comidas, después de la neutralización previa de los fluidos estomacales (por ejemplo, con Gel Alumini Phosphorici, bicarbonato sódico purificado o agua Vichy). Cuando se aplica la preparación directamente en heridas, esto debe hacerse 3 veces durante 24 horas. Por aplicación local, la herida no debe limpiarse con desinfectante, ya que esto puede ocasionar la inactivación de los fagos. Si es necesario, las heridas pueden limpiarse con un medio de cultivo estéril o con solución fisiológica de NaCl al 0,9%.

50

En ciertos casos, la terapia con fagos puede emplearse junto con una terapia de antibióticos.

55

Las preparaciones de fagos polivalentes usadas en el tratamiento de infecciones bacterianas han presentado una alta eficacia. Se ha observado una eficacia particular en el tratamiento de sepsis (con una proporción de cura del 88%) y en infecciones que se producen en pacientes con mucoviscidosis.

Ejemplo 7

Purificación adicional de preparaciones de bacteriófagos, retirando endotoxinas de mezclas que contienen bacteriófagos

65 En varias aplicaciones médicas, o también debido a los procedimientos de administración (por ejemplo, por vía intravenosa), se requieren preparaciones de bacteriófagos de alta pureza, en particular que carezcan de endotoxinas bacterianas. Siguiendo el procedimiento de esta invención, se usó la afinidad de bacteriófagos por un sustrato que contenía celulosa u, óptimamente, un derivado esterificado de ésta. En este ejemplo se usó un derivado de celulosa

ES 2 283 581 T3

sulfatado disponible en el mercado, que se caracterizaba por un bajo nivel de esterificación (8 $\mu\text{mol/ml}$ de gel). El sustrato se usó para retirar las endotoxinas de la mezcla que contenía bacteriófagos. Después de aclarar el sustrato y de retirar las endotoxinas, la siguiente etapa de purificación es la elución de los bacteriófagos adsorbidos.

5 Se puso 1 ml de sustrato que contenía el derivado de celulosa sulfatado en la columna estéril de un cromatógrafo. La salida del sustrato de la columna se impidió sellando la parte inferior de la columna con lana de vidrio humedecida con etanol al 70%.

Se prepararon los siguientes tampones de elución:

10

Tampón I: tampón fosfato 0,01 M, pH 7,6;

Tampón II: tampón fosfato 0,01 M, pH 7,6, que contiene cloruro sódico 1 M.

15 Las sales que entraron en la composición del eluyente se endurecieron durante 1 hora a 145°C.

Las soluciones se prepararon usando agua apirogénica destilada.

20 Antes de la cromatografía, se introdujo 1 ml de sustrato en una columna de cromatografía enjuagada con 5 ml de tampón I, y después con 5 ml de tampón II.

La columna se preparó para la cromatografía real enjuagándola con 10 ml de tampón I.

25 La eliminación de la endotoxina se realizó usando la fracción de molécula grande obtenida en el procedimiento de tamiz molecular en Sepharose 4B del lisado del bacteriófago concentrado Ps PCM F/00018.

30 Se transfirieron 0,2 ml de la mezcla de bacteriófagos a una columna de cromatografía que contenía 1 ml de sustrato que contenía el derivado sulfatado de celulosa. Se recogió una fracción de 0,2 ml en volumen. La primera fracción se eluyó con 3 ml de tampón I. En estas condiciones, salió de la columna la endotoxina no asociada. La segunda fracción se eluyó con el tampón II. La fracción II contenía bacteriófagos purificados.

Los resultados de unidades de endotoxina en las fracciones:

35 El material sometido a cromatografía en un sustrato que contenía un derivado sulfatado de celulosa contenía 2500 unidades de endotoxina/ml. La fracción eluida con tampón I contenía 600-1000 unidades de endotoxina/ml y la eluida con tampón II contenía bacteriófagos que carecían de endotoxinas (aproximadamente 1 unidad/ml).

40 Se determinó el contenido de endotoxinas en las preparaciones de bacteriófagos usando el procedimiento de gel de la compañía Charles River Endosafe, Charleston, USA.

Las cepas de bacteriófagos multivalentes de la presente invención se han depositado según las disposiciones del Tratado de Budapest y sus detalles se indican en la siguiente Tabla 3.

45

(Tabla pasa a página siguiente)

50

55

60

65

ES 2 283 581 T3

TABLA 3

Depósito de cepas de bacteriófagos

| DENOMINACIÓN DEL FAGO | POLISH COLLECTION OF MICROORGANISMS (PCM) NÚMERO DE ACCESO DEL DEPÓSITO | FECHA DE DEPÓSITO | DENOMINACIÓN TAXONÓMICA PROPUESTA |
|-----------------------|---|-------------------|-----------------------------------|
| S1 | F/00001 | 18.07.2001 | Siphoviridae SI19 |
| S2 | F/00002 | 18.07.2001 | Siphoviridae SI9 |
| S3 | F/00003 | 18.07.2001 | Siphoviridae SI19 |
| S4 | F/00004 | 18.07.2001 | Siphoviridae SI10 |
| S5 | F/00005 | 18.07.2001 | Siphoviridae SI19 |
| S6 | F/00006 | 18.07.2001 | Siphoviridae SI19 |
| S7 | F/00007 | 18.07.2001 | Siphoviridae SI19 |
| P1 | F/00008 | 18.07.2001 | Myoviridae MI1 |
| P2 | F/00009 | 18.07.2001 | Myoviridae MI3 |
| P3 | F/00010 | 18.07.2001 | Myoviridae MI9 |
| P4 | F/00011 | 18.07.2001 | Myoviridae MI3 |
| P5 | F/00012 | 18.07.2001 | Myoviridae MI9 |
| P6 | F/00013 | 18.07.2001 | Myoviridae MI3 |
| P7 | F/00014 | 18.07.2001 | Myoviridae MI9 |
| P8 | F/00015 | 18.07.2001 | Podoviridae P13 |
| P9 | F/00016 | 18.07.2001 | Myoviridae MI3 |
| P10 | F/00017 | 18.07.2001 | Myoviridae MI3 |
| P11 | F/00018 | 18.07.2001 | Myoviridae MI3 |
| P12 | F/00019 | 18.07.2001 | Siphoviridae SI7 |
| P13 | F/00020 | 18.07.2001 | Podoviridae PI1 |
| P14 | F/00021 | 18.07.2001 | Myoviridae MI3 |
| P15 | F/00022 | 18.07.2001 | Myoviridae MI3 |
| P16 | F/00023 | 18.07.2001 | Myoviridae MI3 |
| P17 | F/00024 | 18.07.2001 | Siphoviridae SII2 |
| P18 | F/00025 | 18.07.2001 | Myoviridae MI3 |
| P19 | F/00026 | 18.07.2001 | Myoviridae MI3 |
| P20 | F/00027 | 18.07.2001 | Myoviridae MI9 |

65

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para obtener una cepa de bacteriófago multivalente **caracterizado** porque:

5 a) se acumula un número suficiente (n) de cepas bacterianas patógenas de una especie específica que aparece aleatoriamente en una región dada, con lo que las cepas bacterianas aisladas son posiblemente cepas resistentes a fármacos;

10 b) se acumula un número suficiente de cepas de bacteriófagos específicas para al menos una de las cepas bacterianas de la especie dada,

15 c) se determina la actividad lítica de las cepas de bacteriófagos acumuladas en cada cepa bacteriana acumulada, se estima el valor de p, que es la proporción entre el número de cepas lisadas por un fago dado respecto el número de todas las cepas bacterianas acumuladas;

d) a partir del valor de p resultante se determina si n cumple la condición:

$$20 \quad n \geq \frac{pq}{d^2} z_{1-\alpha}^2$$

donde:

$$25 \quad q = 1 - p$$

d es una constante no mayor de 0,1, óptimamente no mayor de 10% de p

30 $z_{1-\alpha}$ es una variable aleatoria de la distribución normal dependiente del factor de confianza $1 - \alpha$, que no es menor de 0,95

e) se selecciona la cepa de bacteriófagos que cumple el criterio de d) y tiene un valor de p no menor de $2/n$, óptimamente no menor de 0,5.

35 2. Procedimiento de la reivindicación 1, donde en la etapa b) la cepa de bacteriófago se aísla a partir de una muestra que procede del entorno, pasándola a través de un filtro de membrana con un tamaño de poro de 0,2-0,4 μm , se añade medio de cultivo al filtrado obtenido y se mezcla con un caldo de cultivo de bacterias de un género definido, la mezcla se incuba a una temperatura de aproximadamente 37°C durante aproximadamente 1 hora, se retira una parte de la suspensión y se aplica a placas con medio de cultivo sólido, se incuba a aproximadamente 37°C durante 2 a 24 horas, se aísla una muestra del medio que rodea a una calva individual, se transfiere al caldo de cultivo de bacterias del género definido y se incuba hasta que el cultivo brilla, y el producto del bacteriófago se obtiene pasando el lisado a través de un filtro de membrana con un tamaño de poro de 0,2-0,4 μm , repitiéndose preferiblemente la inoculación del medio de cultivo sólido y el re-aislamiento de las calvas 5 veces.

45 3. Procedimiento de la reivindicación 1 ó 2, en el que en la etapa c) la cepa bacteriana en estudio se inocula en el medio sólido respectivo, sobre el cual se transfiere una parte de la preparación de bacteriófagos obtenida en la etapa b), se incuba a una temperatura de aproximadamente 37°C durante aproximadamente 4 horas, después de lo cual se deja a una temperatura de aproximadamente 4°C durante aproximadamente 2 a 24 horas, después de lo cual se evidencia la actividad lítica de la cepa de bacteriófago por la aparición de al menos calvas individuales.

50 4. Procedimiento de la reivindicación 1, en el que las cepas bacterianas patógenas son de los géneros *Staphylococcus* o *Pseudomonas*.

55 5. Procedimiento de la reivindicación 1 ó 4, en el que en la etapa c) la cepa de bacteriófago multivalente seleccionada específica para cepas bacterianas resistentes a fármacos del género *Staphylococcus* que aparecen en Polonia es una cepa de bacteriófagos seleccionada entre S1 (PCM F/00001), S2 (PCMF/00002), S3 (PCMF/00003), S4 (PCMF/00004), S5 (PCM F/00005), S6 (PCMF/00006) y S7 (PCMF/00007).

60 6. Procedimiento de la reivindicación 5, en el que en la etapa e) la cepa de bacteriófago multivalente seleccionada específica para cepas bacterianas resistentes a fármacos del género *Staphylococcus* que aparecen en pacientes con mucoviscidosis es una cepa de bacteriófagos seleccionada entre S2 (PCM F/00002), S4 (PCM F/00004) y S7 (PCMF/00007).

65 7. Procedimiento de la reivindicación 1 ó 4, en el que en la etapa e) la cepa de bacteriófago multivalente seleccionada específica para cepas bacterianas resistentes a fármacos del género *Pseudomonas* que aparecen en Polonia es una cepa de bacteriófagos seleccionada entre P1 (PCM F/00008), P2 (PCMF/00009), P3 (PCMF/00010), P4 (PCM F/00011), P5 (PCM F/00012), P6 (PCM F/00013), P7 (PCM F/00014), P8 (PCM F/00015), P9 (PCM F/00016), P10

ES 2 283 581 T3

(PCM F/00017), P11 (PCM F/00018), P12 (PCM F/00019), P13 (PCM F/00020), P14 (PCM F/00021), P15 (PCM F/00022), P16 (PCM F/00023), P17 (PCM F/00024), P18 (PCM F/00025), P19 (PCM F/00026) y P20 (PCM F/00027).

5 8. Procedimiento de la reivindicación 7, en el que en la etapa e) la cepa de bacteriófago multivalente seleccionada específica para cepas bacterianas resistentes a fármacos del género *Pseudomonas* que aparecen en pacientes con mucoviscidosis es una cepa de bacteriófago seleccionada entre P3 (PCM F/00010), P6 (PCM F/00013) y P11 (PCM F/00018).

10 9. Procedimiento de la reivindicación 1 ó 2, que comprende además la purificación del lisado, especialmente de endotoxinas, poniendo en contacto la mezcla que contiene bacteriófagos con un sustrato que contiene celulosa o un derivado al menos parcialmente esterificado de la misma, que después se lava con una solución que elimina impurezas, especialmente endotoxinas, después de lo cual se eluyen los bacteriófagos purificados.

15 10. Procedimiento de la reivindicación 9, en el que la elución de endotoxinas se realiza por medio de agua, una solución de una sustancia no disociante, o solución salina de una concentración no mayor de 0,1 M, especialmente tamponada.

20 11. Procedimiento de la reivindicación 9, en el que la elución de bacteriófagos se realiza por medio de una solución de una sustancia no disociante, o cualquier tampón, o solución salina de una concentración mayor de 0,05 M, especialmente tamponada.

12. Procedimiento de la reivindicación 9, en el que la elución de endotoxinas y bacteriófagos se realiza a temperaturas de -25°C a 100°C.

25 13. Procedimiento de la reivindicación 9, en el que la elución de endotoxinas y bacteriófagos se realiza usando una solución acuosa de sal que contiene un disolvente orgánico.

30 14. Procedimiento de la reivindicación 13, en el que el disolvente orgánico se elige entre el grupo que comprende dimetilsulfóxido, dimetilformamida, isopropanol y acetona.

15. Procedimiento de la reivindicación 9, en el que se usa como sustrato celulosa parcialmente esterificada con ácido orgánico o inorgánico.

35 16. Procedimiento de la reivindicación 9, en el que se usa celulosa parcialmente esterificada con ácido acético, nítrico, sulfuroso o fosfórico.

17. Procedimiento de la reivindicación 9, **caracterizado** porque: se usa celulosa en la que se han esterificado del 0,01% al 5% de moléculas de glucosa, especialmente del 0,25% al 1% de moléculas de glucosa.

40 18. Medicamento para el tratamiento o prevención de infecciones debidas a un patógeno bacteriano, que comprende la cepa de bacteriófago multivalente obtenible mediante el procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1-17 específica para bacterias pertenecientes al género del patógeno bacteriano.

45 19. Medicamento de la reivindicación 18, en el que dicha cepa de bacteriófago multivalente específica para bacterias del género *Staphylococcus*, posiblemente cepas bacterianas resistentes a fármacos del género *Staphylococcus* que aparece en Polonia, es una cepa de bacteriófago seleccionada entre S1 (PCM F/00001), S2 (PCM F/00002), S3 (PCM F/00003), S4 (PCM F/00004), S5 (PCMF/00005), S6 (PCMF/00006) y S7 (PCMF/00007), especialmente, los fagos S1, S2 y S4 o S5.

50 20. Medicamento de la reivindicación 18, **caracterizado** porque: sirve en el tratamiento o prevención de infecciones que aparecen en pacientes con mucoviscidosis y, como cepa de bacteriófago multivalente específica para bacterias del género *Staphylococcus*, contiene al menos una cepa de bacteriófagos seleccionada entre F/00002, F/00004 y F/00007.

55 21. Medicamento de la reivindicación 18, en el que dicha cepa de bacteriófago multivalente específica para bacterias del género *Pseudomonas*, posiblemente cepas bacterianas resistentes a fármacos del género *Pseudomonas* que aparecen en Polonia, es una cepa de bacteriófago seleccionada entre P1 (PCM F/00008), P2 (PCM F/00009), P3 (PCM F/00010), P4 (PCM F/00011), P5 (PCM F/00012), P6 (PCM F/00013), P7 (PCM F/00014), P8 (PCM F/00015), P9 (PCM F/00016), P10 (PCM F/00017), P11 (PCM F/00018), P12 (PCM F/00019), P13 (PCM F/00020), P14 (PCM F/00021), P15 (PCM F/00022), P16 (PCM F/00023), P17 (PCM F/00024), P18 (PCM F/00025), P19 (PCM F/00026) y P20 (PCM F/00027), especialmente los fagos P7, P20 y P6.

60 22. Medicamento de acuerdo con la reivindicación 18, **caracterizado** porque sirve en el tratamiento o prevención de infecciones que aparecen en pacientes con mucoviscidosis y, como cepa de bacteriófago multivalente específica para bacterias del género *Pseudomonas*, contiene al menos una cepa de bacteriófagos seleccionada entre F/00010, F/00013 y F/00018.

ES 2 283 581 T3

23. Uso de una cepa de bacteriófago multivalente obtenida por el procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1-17 en la producción de una medicación para el tratamiento o prevención de infecciones producidas por bacterias patógenas.

5 24. Uso de la reivindicación 23, en el que para la producción de una medicación para el tratamiento o prevención de infecciones producidas por bacterias del género *Staphylococcus*, posiblemente producidas por cepas bacterianas resistentes a fármacos del género *Staphylococcus* que aparecen en Polonia, se usa al menos una cepa de bacteriófagos seleccionada entre S1 (PCM F/00001), S2 (PCM F/00002), S3 (PCM F/00003), S4 (PCM F/00004), S5 (PCM F/00005), S6 (PCM F/00006) y S7 (PCM F/00007), especialmente los fagos S1, S2 y S4 o S5.

10 25. Uso de la reivindicación 23, en el que para la producción de una medicación para el tratamiento o prevención de infecciones que se producen en pacientes con mucoviscidosis producidas por bacterias del género *Staphylococcus*, se usa al menos una cepa de bacteriófago seleccionada entre F/00002, F/00004 y F/00007.

15 26. Uso de la reivindicación 23, en el que para la producción de una medicación para el tratamiento o prevención de infecciones producidas por bacterias del género *Pseudomonas*, posiblemente provocadas por cepas bacterianas resistentes a fármacos del género *Pseudomonas* que aparecen en Polonia, se usa al menos una cepa de bacteriófago seleccionada entre P1 (PCM F/00008), P2 (PCM F/00009), P3 (PCM F/00010), P4 (PCM F/00011), P5 (PCM F/00012), P6 (PCM F/00013), P7 (PCM F/00014), P8 (PCM F/00015), P9 (PCM F/00016), P10 (PCM F/00017), P11 (PCM F/00018), P12 (PCM F/00019), P13 (PCM F/00020), P14 (PCM F/00021), P15 (PCM F/00022), P16 (PCM F/00023), P17 (PCM F/00024), P18 (PCM F/00025), P19 (PCM F/00026) y P20 (PCM F/00027), especialmente los fagos P7, P20 y P6.

20 27. Uso de la reivindicación 23, en el que para la producción de una medicación para el tratamiento o prevención de infecciones que aparecen en pacientes con mucoviscidosis producidas por bacteria del género *Pseudomonas*, se usa al menos una cepa de bacteriófagos seleccionada entre F/00010, F/00013 y F/00018.

25 28. Cepa de bacteriófago multivalente seleccionada entre S1 (PCM F/00001), S2 (PCM F/00002), S3 (PCM F/00003), S4 (PCM F/00004), S5 (PCM F/00005), S6 (PCM F/00006) y S7 (PCM F/00007), donde la cepa se **caracteriza** como específica para bacterias del género *Staphylococcus*, posiblemente específica para cepas bacterianas resistentes a fármacos del género *Staphylococcus* que aparecen en Polonia.

30 29. Cepa de bacteriófago multivalente seleccionada entre P1 (PCM F/00008), P2 (PCM F/00009), P3 (PCM F/00010), P4 (PCM F/00011), P5 (PCMF/00012), P6 (PCMF/00013), P7 (PCM F/00014), P8 (PCM F/00015), P9 (PCM F/00016), P10 (PCM F/00017), P11 (PCM F/00018), P12 (PCM F/00019), P13 (PCM F/00020), P14 (PCM F/00021), P15 (PCM F/00022), P16 (PCM F/00023), P17 (PCM F/00024), P18 (PCM F/00025), P19 (PCM F/00026) y P20 (PCM/00027), donde la cepa se **caracteriza** como específica para bacterias del género *Pseudomonas*, posiblemente específica para cepas bacterianas resistentes a fármacos del género *Pseudomonas* que aparecen en Polonia.

40

45

50

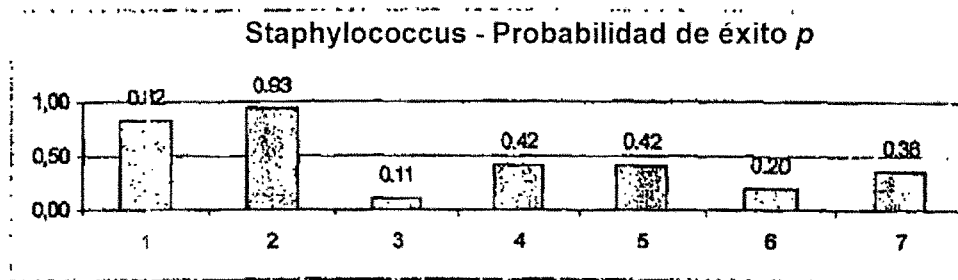
55

60

65

Staphylococcus

845 cepas empleadas en el estudio de 7 bacteriófagos



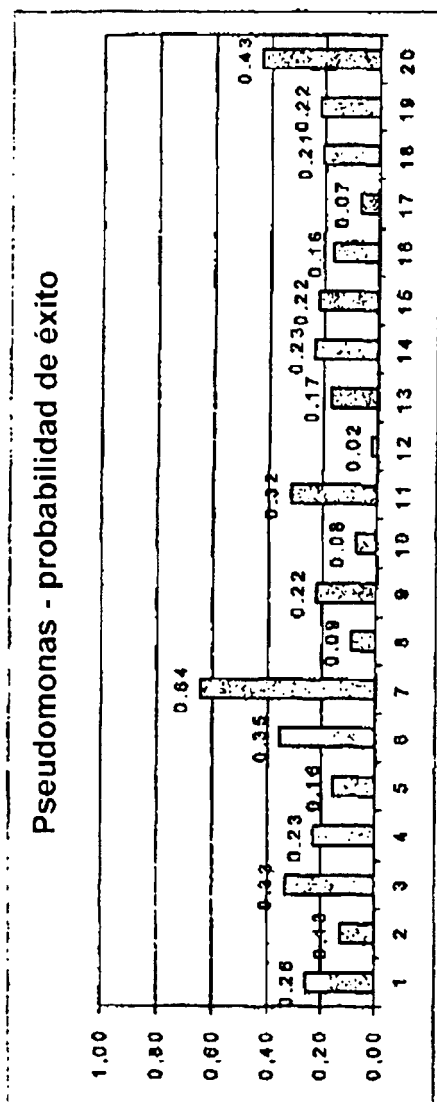
Número de cepas de Staph. *n* de una nueva muestra para cada fago

| Fago n° \ 1- α , d | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
|---------------------------|-----|----|------|-----|-----|------|-----|
| 0.95, 0.1 | 56 | 24 | 37 | 93 | 93 | 61 | 89 |
| 0.95, 0.05 | 222 | 97 | 149 | 374 | 373 | 245 | 355 |
| 0.95, 10% p | 82 | 28 | 3144 | 535 | 538 | 1548 | 673 |
| 0.98, 0.1 | 66 | 29 | 44 | 111 | 111 | 73 | 106 |

Fig. 1

Pseudomonas

Se investigó la eficacia de 20 fagos en 880 cepas.



Número de cepas de *Pseudomonas* *n* de una nueva muestra para cada fago

| Fago n° | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | |
|-----------------|------|------|-----|------|------|-----|-----|------|------|------|-----|-------|------|------|------|------|------|------|------|-----|--|
| 1- α , d | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 0.95, 0.1 | 76 | 48 | 88 | 70 | 53 | 90 | 84 | 33 | 68 | 28 | 86 | 8 | 57 | 71 | 68 | 55 | 26 | 66 | 68 | 95 | |
| 0.95, 0.05 | 304 | 183 | 350 | 280 | 212 | 360 | 335 | 133 | 274 | 112 | 342 | 32 | 228 | 285 | 271 | 221 | 106 | 262 | 272 | 381 | |
| 0.95, 10% p | 1027 | 2402 | 709 | 1218 | 1938 | 643 | 182 | 3621 | 1267 | 4470 | 764 | 17415 | 1738 | 1179 | 1293 | 1825 | 4783 | 1376 | 1285 | 459 | |
| 0.98, 0.1 | 90 | 54 | 104 | 83 | 63 | 107 | 100 | 40 | 82 | 33 | 102 | 10 | 68 | 85 | 81 | 66 | 31 | 78 | 81 | 113 | |

Fig. 2

Pseudomonas que aparecen en pacientes con mucoviscidosis

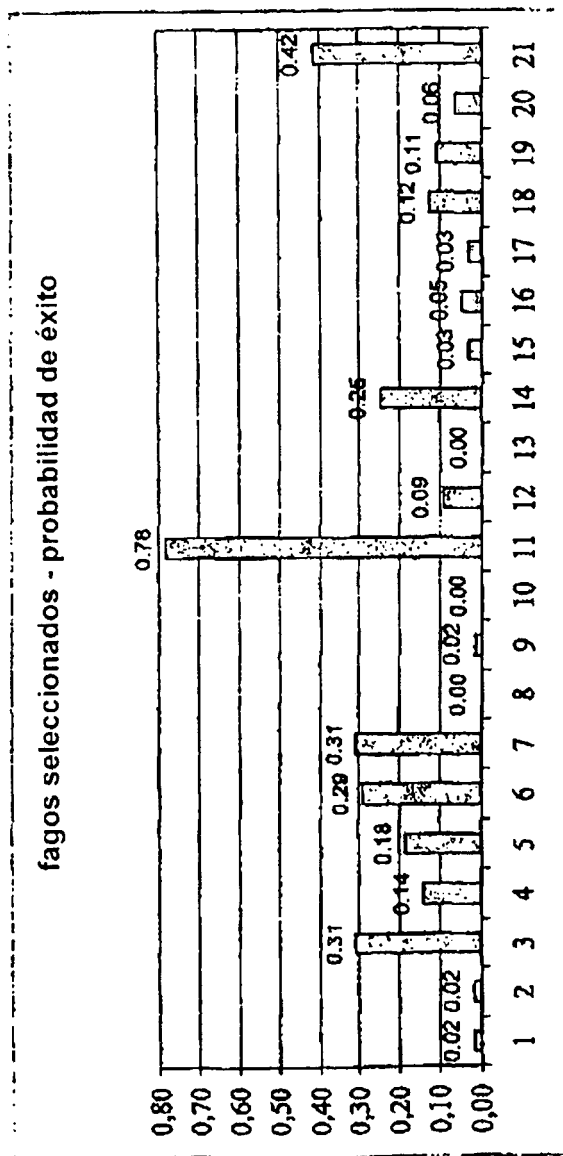


Fig. 3

Staphylococcus que aparecen en pacientes con mucoviscidosis

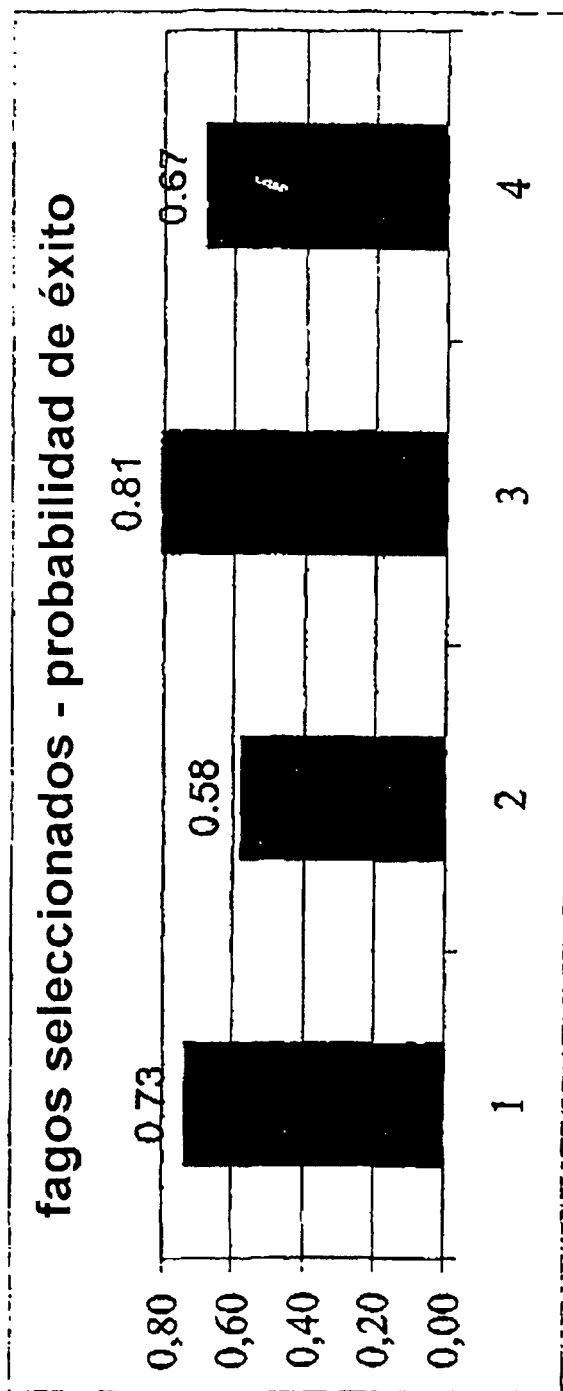


Fig. 4