

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 969 034**

51 Int. Cl.:

A61K 35/76

(2015.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.05.2013** **E 19215938 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.10.2023** **EP 3656390**

54 Título: **Composiciones bacteriófagas terapéuticas**

30 Prioridad:

04.05.2012 GB 201207910

09.10.2012 GB 201218083

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

16.05.2024

73 Titular/es:

ARMATA PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)

4503 Glencoe Avenue

Marina del Rey, CA 90292, US

72 Inventor/es:

HARPER, DAVID y

BLAKE, KATY

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

ES 2 969 034 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composiciones bacteriófagos terapéuticas

Campo de la invención

La presente invención se refiere a procedimientos para preparar paneles de bacteriófagos (ya sea como un cóctel premezclado o para mezclar antes de su uso).

Antecedentes de la invención

La resistencia a los antibióticos se considera actualmente uno de los principales retos a los que se enfrenta la medicina moderna. Dada la escasez de nuevos antibióticos, se están investigando varios enfoques alternativos, entre ellos el uso de bacteriófagos como agentes terapéuticos (Harper, Anderson & Enright, *Therapeutic Delivery* (2011), 2, 935-947; Hausler T, *Viruses vs. Superbugs: A Solution to the Antibiotics Crisis?* (2006) MacMillan, New York).

Los bacteriófagos (a menudo conocidos simplemente como "fagos") son virus que crecen dentro de las bacterias. El nombre se traduce como "comedores de bacterias" y refleja el hecho de que, a medida que crecen, la mayoría de los bacteriófagos matan al huésped bacteriano y liberan la siguiente generación de bacteriófagos. Los primeros trabajos con bacteriófagos se vieron obstaculizados por muchos factores, uno de los cuales era la creencia generalizada de que sólo existía un tipo de bacteriófago, un virus inespecífico que mataba todas las bacterias. En cambio, actualmente es sabido que la gama de huéspedes de los bacteriófagos (el espectro de bacterias que son capaces de infectar) suele ser muy específica. Esta especificidad, sin embargo, tiene la desventaja de que es difícil conseguir una amplitud de eficacia bacteriófaga adecuada en todas las especies/cepas bacterianas objetivo. Por lo tanto, existe la necesidad en la técnica de procedimientos para identificar combinaciones mejoradas de bacteriófagos que tengan una capacidad de selección eficaz en relación con las especies/cepas bacterianas - véase, por ejemplo, Pirsi, *The Lancet* (2000) 355, 1418. Por estas razones, los ejemplos de composiciones de fagos que demuestran una eficacia clínica sólida son muy limitados. A modo de ejemplo, se hace referencia a los ensayos clínicos (veterinarios y humanos) realizados con éxito por el solicitante con un panel de bacteriófagos dirigidos contra *Pseudomonas aeruginosa* - véase Wright et al, *Clinical Otolaryngology* (2009) 34, 349-357. Por lo tanto, existe la necesidad en la técnica de desarrollar más paneles de bacteriófagos que tengan una aplicabilidad clínica óptima.

El documento WO 2005/009451 desvela combinaciones y paneles de bacteriófagos para controlar enfermedades causadas por bacterias patógenas de la especie *Pseudomonas aeruginosa*.

El documento WO 2010/090542 se refiere al campo de la terapia con fagos para el control y tratamiento de infecciones bacterianas.

En particular, existe la necesidad en la técnica de diseñar paneles de dos o más bacteriófagos dirigidos contra la misma especie/cepa bacteriana huésped, en los que dicho panel de bacteriófagos proporcione una eficacia adecuada contra una especie/cepa bacteriana diana en comparación con la eficacia individual de dicho bacteriófago contra dicha especie/cepa bacteriana diana. A este respecto, es necesario que los bacteriófagos miembros del panel funcionen bien juntos en una combinación (por ejemplo, que el panel demuestre una eficacia equivalente o mejorada con respecto a los miembros individuales del mismo).

La presente invención aborda uno o más de los problemas anteriores.

Sumario de la invención

La presente invención resuelve los problemas descritos anteriormente proporcionando procedimientos para diseñar paneles de bacteriófagos, como se especifica en las reivindicaciones.

En un primer aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento de diseño de un panel de bacteriófagos como composición terapéutica contra una infección bacteriana, comprendiendo el procedimiento:

- a) proporcionar un primer bacteriófago que retrase el crecimiento de una especie o cepa bacteriana diana;
- b) propagar dicho primer bacteriófago en un cultivo de la especie o cepa bacteriana diana hasta el desarrollo de resistencia bacteriana contra dicho primer bacteriófago, para obtener un primer cultivo bacteriano resistente;
- c) proporcionar un segundo bacteriófago;
- d) determinar el crecimiento del primer cultivo bacteriano resistente en presencia de dicho segundo bacteriófago;
- e) en el que, si dicho segundo bacteriófago retrasa el crecimiento del primer cultivo bacteriano resistente, el segundo bacteriófago se selecciona para su uso en un panel de bacteriófagos.

En un segundo aspecto, la presente invención también proporciona el procedimiento del primer aspecto de la invención, en el que, si dicho segundo bacteriófago retrasa el crecimiento del primer cultivo bacteriano resistente, la combinación de primer y segundo bacteriófagos se selecciona para su uso en el panel de bacteriófagos.

En un tercer aspecto la presente invención también proporciona el procedimiento del primer o segundo aspecto de la invención, comprendiendo además:

a) propagar dicho segundo bacteriófago en el primer cultivo bacteriano resistente hasta el desarrollo de resistencia bacteriana contra dicho segundo bacteriófago para formar un segundo cultivo bacteriano resistente;

b) proporcionar un tercer bacteriófago;

c) determinar el crecimiento del segundo cultivo bacteriano resistente en presencia de dicho tercer bacteriófago;

d) en el que, si dicho tercer bacteriófago retrasa el crecimiento del segundo cultivo bacteriano resistente, el tercer bacteriófago se selecciona para su uso en el panel de bacteriófagos.

En un cuarto aspecto, la presente invención también proporciona el procedimiento del tercer aspecto de la invención, en el que, si dicho tercer bacteriófago retrasa el crecimiento del segundo cultivo bacteriano resistente, se selecciona una combinación del tercer bacteriófago y al menos uno de los primeros y segundos bacteriófagos para su uso en un panel de bacteriófagos.

En un quinto aspecto, la presente invención proporciona el procedimiento del tercer o cuarto aspecto de la invención, en el que, si dicho tercer bacteriófago retrasa el crecimiento del segundo cultivo bacteriano resistente, se selecciona una combinación de los bacteriófagos primero, segundo y tercero para su uso en un panel de bacteriófagos.

La presente invención también proporciona el procedimiento de cualquier aspecto anterior, en el que un cultivo bacteriano es un cultivo bacteriano líquido. La presente invención también proporciona el procedimiento de cualquier aspecto anterior, en el que el crecimiento se determina en un cultivo bacteriano líquido. La presente invención también proporciona el procedimiento de cualquier aspecto anterior, en el que el crecimiento se determina en un cultivo bacteriano líquido midiendo la densidad óptica del cultivo líquido. La presente invención también proporciona el procedimiento de cualquier aspecto anterior, en el que la densidad óptica se mide a 600 nm. La presente invención también proporciona el procedimiento de cualquier aspecto anterior, en el que la especie o cepa bacteriana diana se selecciona de: *Acinetobacter baumannii*, *Clostridium difficile*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia*, especies bacterianas causantes del olor corporal, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus mutans*.

En un aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para diseñar un panel terapéutico óptimo de bacteriófagos (que comprende dos o más bacteriófagos). Dicho procedimiento incluye el ensayo de la actividad de bacteriófagos individuales en cultivos líquidos de una especie/cepa bacteriana diana para determinar la cinética del crecimiento bacteriano, junto con el desarrollo y la especificidad de la resistencia desarrollada por la diana bacteriana en dicho cultivo. El procedimiento incluye además la determinación de la eficacia de los paneles de bacteriófagos en dicho cultivo, y por tanto la identificación de un panel de bacteriófagos ventajoso para su uso contra la especie/cepa bacteriana diana,

Los bacteriófagos que infectan la misma especie/cepa bacteriana pueden emplear mecanismos de infección similares, lo que significa que la resistencia de la especie/cepa bacteriana a un bacteriófago confiere resistencia cruzada a otros bacteriófagos - véase Gill & Hyman, Curr. Pharm. Biotech. (2010) 11, 2-14y Guidolin & Manning, Eur.J. Biochem (1985) 153, 89-94. Está claro que esto no es deseable. Además, los presentes inventores han identificado de forma inesperada que los bacteriófagos pueden ser antagonistas entre sí cuando se dirigen a una especie/cepa bacteriana determinada, limitando así el efecto de la coinfección de bacteriófagos.

En un aspecto, la presente invención proporciona por tanto un procedimiento para diseñar un panel de bacteriófagos (que comprende dos o más bacteriófagos), que minimiza la resistencia de la especie/cepa bacteriana diana a cada uno de dichos bacteriófagos individuales (es decir, resistencia cruzada) en el panel, y/o antagonismo entre dichos bacteriófagos cuando se dirigen a la especie/cepa bacteriana. Dicho procedimiento emplea un proceso de medición de las características de crecimiento de la diana bacteriana y/o de las características de crecimiento del bacteriófago cuando está presente en cultivos líquidos de su bacteria huésped (diana), seguido de la selección de un panel terapéutico de bacteriófagos.

Los bacteriófagos líticos individuales pueden probarse en ensayo de placa y/o en cultivo líquido (caldo) con su huésped bacteriano - preferentemente se emplean ambas pruebas (por ejemplo, una prueba puede realizarse secuencialmente o antes de la siguiente, o ambas pueden realizarse sustancialmente de forma simultánea). Los que muestran una eliminación eficaz del huésped bacteriano en estos dos sistemas no son necesariamente idénticos. A modo de ejemplo, el ensayo de placas es un proceso dinámico complejo (Abedon & Yin, Methods Mol. Biol. (2009) 501, 161-174),

mientras que el cultivo en caldo proporciona un entorno menos estructurado en el que controlar la lisis (muerte) del huésped bacteriano.

El número de bacterias en tales cultivos líquidos puede controlarse directamente por recuento viable de una alícuota del medio de cultivo. Alternativamente, el número de bacterias puede medirse analizando la densidad óptica del cultivo.

- 5 A modo de ejemplo, los sistemas de lectura de placas permiten controlar directamente estos cultivos en sistemas de alto rendimiento, normalmente con una densidad óptica medida a 600 nm.

En cultivos líquidos no tratados con bacteriófagos, el número de bacterias aumenta durante varias horas, y finalmente se ralentiza a medida que se agotan los nutrientes y el número de bacterias alcanza un nivel máximo. Cuando se trata con bacteriófagos, el número de bacterias suele aumentar durante un breve periodo de tiempo y luego disminuye rápidamente. Sin embargo, cuando se trata con un único bacteriófago (o una mezcla de bacteriófagos cuando se produce resistencia cruzada), al cabo de varias horas empiezan a aparecer bacterias resistentes y el número de bacterias vuelve a aumentar.

- 10
- 15 Mediante el muestreo de estas bacterias resistentes y el ensayo del efecto de diferentes bacteriófagos (por ejemplo, segundo y/o tercer bacteriófagos, etc.) sobre ellas, se identifican bacteriófagos (por ejemplo, segundo y/o tercer bacteriófagos diferentes, etc.) en los que la resistencia bacteriana a un fago (por ejemplo, el primer fago) no confiere resistencia a otros fagos (por ejemplo, segundo y/o tercer bacteriófagos diferentes, etc.), lo que en el presente documento se denomina falta de resistencia cruzada a los fagos. La selección y el uso de paneles de bacteriófagos que comprendan bacteriófagos que demuestren una falta de resistencia cruzada a una especie/cepa bacteriana diana son muy deseables en los paneles de bacteriófagos diseñados para su uso como terapéutica antimicrobiana.

- 20 Una vez obtenido un panel de bacteriófagos (con las características deseadas, tal como se han identificado anteriormente), el panel puede probarse en cultivo líquido. Inesperadamente, algunas mezclas de bacteriófagos individuales no producen necesariamente efectos aditivos. En particular, se produce antagonismo cuando los efectos de los fagos combinados son menos eficaces para reducir el número de bacterias que los que se consiguen con los correspondientes bacteriófagos individuales aislados. El control de la eficacia de estas mezclas en la reducción del
- 25 número de bacterias en cultivo líquido permite identificar las combinaciones antagonistas, que se consideran no óptimas para su desarrollo como candidatos terapéuticos.

- 30 Los procedimientos para determinar el crecimiento de bacterias (como una especie o cepa bacteriana diana) son conocidos en la técnica. A modo de ejemplo, puede determinarse el crecimiento de una especie o cepa bacteriana diana que crece en un cultivo, como un cultivo líquido. A este respecto, a medida que las bacterias se multiplican y aumentan en número, la densidad óptica del cultivo líquido aumenta (debido a la presencia de un número creciente de células bacterianas). Por lo tanto, un aumento de la densidad óptica indica crecimiento bacteriano. La densidad óptica puede medirse a 600 nm (DO_{600}). Por ejemplo, la densidad óptica a 600 nm puede determinarse dentro de los pocillos de una placa de pocillos múltiples (por ejemplo, una placa de 96 pocillos) utilizando un lector de placas automatizado (por ejemplo, un lector de placas BMG Labtech FLUOstar Omega).

- 35 El crecimiento de una especie o cepa bacteriana diana puede determinarse y/o supervisarse durante un periodo de tiempo definido (por ejemplo, al menos 2, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 36 o 48 horas).

- 40 En algunas realizaciones, un periodo de tiempo puede definirse a partir de la adición de uno o más bacteriófagos diferentes a una especie o cepa bacteriana diana. Alternativamente, un periodo de tiempo puede definirse como a partir de un punto predeterminado después de la adición de uno o más bacteriófagos diferentes a una especie o cepa bacteriana diana (por ejemplo, a partir de al menos 0,25, 0,5, 1, 1,5, 2, 3, 4, 6, 8, 10 o 12 horas después).

Los procedimientos para determinar si un bacteriófago o una combinación de bacteriófagos retrasa el crecimiento (es decir, produce un retraso del crecimiento) de una población dada de bacterias (por ejemplo, una especie o cepa bacteriana diana, como se especifica en las reivindicaciones; o un cultivo resistente, como se especifica en las reivindicaciones) son conocidos en la técnica.

- 45 A medida que un bacteriófago (o combinación de bacteriófagos) se multiplica en las bacterias huésped, se produce la lisis bacteriana, matando a las bacterias y provocando una disminución del crecimiento bacteriano. Una disminución del crecimiento bacteriano puede incluir una disminución de la tasa de crecimiento (por ejemplo, la tasa a la que aumenta el número de células bacterianas), un cese del crecimiento (de forma que el número de células bacterianas permanece constante) o una disminución del número total de células bacterianas.

- 50 En una realización, el retraso del crecimiento (es decir, cuando un bacteriófago o combinación de bacteriófagos retrasa el crecimiento) significa que el crecimiento bacteriano en presencia de un determinado bacteriófago o combinación de bacteriófagos disminuye en comparación con el crecimiento bacteriano de una población equivalente de bacterias (en las mismas condiciones o en condiciones equivalentes) en ausencia de dicho bacteriófago o combinación de bacteriófagos.

- 55 Los procedimientos para determinar el crecimiento bacteriano son conocidos en la técnica, como se ha descrito anteriormente. Por lo tanto, los procedimientos utilizados para determinar el crecimiento bacteriano (por ejemplo, mediante la medición del número de bacterias) también pueden utilizarse para determinar el retraso del crecimiento.

Por lo tanto, a modo de ejemplo, el retraso del crecimiento puede determinarse en un punto temporal específico o durante un periodo de tiempo específico tras la adición de un bacteriófago o combinación de bacteriófagos a una población bacteriana (por ejemplo, al menos 2, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 36 o 48 horas). A modo de ejemplo, el periodo de tiempo especificado puede abarcar la fase logarítmica del crecimiento bacteriano.

5 Los procedimientos para determinar el desarrollo de resistencia bacteriana contra un bacteriófago o una combinación de bacteriófagos son conocidos en la técnica. A modo de ejemplo, el desarrollo de la resistencia bacteriana puede determinarse supervisando el crecimiento bacteriano en presencia de un bacteriófago o una combinación de bacteriófagos. El crecimiento bacteriano puede controlarse como se ha descrito anteriormente. Por lo tanto, en ausencia de resistencia bacteriana contra el bacteriófago o la combinación de bacteriófagos, puede observarse un retraso del crecimiento (como se ha descrito anteriormente). A medida que se desarrolla la resistencia bacteriana, se superan los efectos del retraso del crecimiento y éste aumenta. El desarrollo de la resistencia bacteriana puede determinarse supervisando el crecimiento bacteriano durante un periodo de tiempo específico, como se ha descrito anteriormente (por ejemplo, al menos 2, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 36 o 48 horas).

10 La determinación del desarrollo de resistencia bacteriana también puede permitir la identificación de combinaciones de bacteriófagos en las que la resistencia bacteriana a un bacteriófago no confiere resistencia a otro bacteriófago de la combinación (denominada falta de resistencia cruzada, como se ha descrito anteriormente).

Por lo tanto, en una realización, en la que la invención proporciona un procedimiento de diseño de un panel de bacteriófagos como composición terapéutica contra una infección bacteriana, como se especifica en la reivindicación 1, a continuación, si dicho segundo bacteriófago retarda el crecimiento del primer cultivo bacteriano resistente, se considera que la especie o cepa bacteriana diana carece de resistencia cruzada a la combinación de dichos primeros y segundos bacteriófagos.

En otra realización, en la que la invención proporciona un procedimiento de diseño de un panel de bacteriófagos como composición terapéutica contra una infección bacteriana, como se especifica en la reivindicación 3, a continuación, si dicho tercer bacteriófago retrasa el crecimiento del segundo cultivo bacteriano resistente, se considera que la especie o cepa bacteriana diana carece de resistencia cruzada a la combinación de al menos dichos segundo y tercer bacteriófagos; preferentemente, se considera que la especie o cepa bacteriana diana carece de resistencia cruzada a la combinación de dichos primer, segundo y tercer bacteriófagos.

Ejemplos

Se desarrolló una mezcla para uso *in vivo* contra la cepa PAK de *Pseudomonas aeruginosa*. Las etapas de este desarrollo ejemplifican las etapas de la invención.

Ensayos iniciales:

La cepa PAK de *Pseudomonas aeruginosa* se utiliza en estudios de infección pulmonar en ratones, utilizando un gen reportero luminiscente insertado para identificar de forma no invasiva los lugares y niveles de infección.

Para identificar bacteriófagos para una mezcla de bacteriófagos terapéuticos para su uso contra la cepa PAK, los bacteriófagos cultivados en cepas huésped permisivas se probaron contra la cepa PAK mediante pruebas puntuales en céspedes bacterianos, ensayo de placa enumerativa y cultivo de caldo utilizando un sistema de ensayo de lector de placas. El lector de placas controla de forma intensiva la densidad óptica de un cultivo de caldo que contiene bacteriófagos con un huésped adecuado en un formato de placa de múltiples pocillos. Este último procedimiento permite evaluar en detalle la cinética del proceso de infección.

La prueba de bacteriófagos individuales mediante ensayo en placa y en cultivo líquido produjo los resultados mostrados en la Tabla 1. [MOI = multiplicidad de infección (proporción entre el bacteriófago infectante y las células huésped bacterianas)].

Cabe señalar la marcada discrepancia entre la escasa formación de placas por el bacteriófago BCP37 y su eficacia en cultivo líquido.

Con base en los datos mostrados en la Tabla 1, se seleccionaron los bacteriófagos BCP1, BCP12, BCP14 y BCP37 para investigaciones posteriores.

Propagación y purificación de bacteriófagos:

Los bacteriófagos candidatos se propagaron en cultivo líquido (caldo) y se prepararon lisados a partir de ellos para trabajos posteriores. Los lisados clarificados se purificaron por centrifugación a través de un cojín de sacarosa (27 ml de cada lisado se colocan cuidadosamente sobre 5 ml de un "cojín" estéril de sacarosa al 10% p/v, en tubos de polipropileno de 36 ml antes de la centrifugación). El "cojín" de sacarosa ayuda a eliminar las endotoxinas, al tiempo que permite que las partículas de virus se conviertan en microgránulos en el fondo del tubo. Los microgránulos de bacteriófagos se resuspendieron en solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se pasaron por un filtro de jeringa de 0,2 µm para garantizar su esterilidad.

Pruebas iniciales de mezclas de bacteriófagos:

Los bacteriófagos individuales BCP12, BCP14 y BCP37 se volvieron a probar individualmente a MOI más altas y como una mezcla, con los resultados mostrados en la [Tabla 2](#).

5 Los resultados de estas pruebas fueron inesperados. Como se desprende de los datos mostrados en la [Tabla 2](#), el bacteriófago BCP37 produjo una reducción eficaz del número de huéspedes bacterianos con un desarrollo muy limitado de resistencia. Los bacteriófagos BCP12 y BCP14 permitieron un mayor desarrollo de la resistencia. Sin embargo, cuando se utilizó una mezcla de los tres bacteriófagos, aunque inicialmente se controló el número de bacterias, el desarrollo de formas resistentes fue claramente más rápido que con el BCP37 solo, lo que indica efectos antagonistas en la infección bacteriófaga mixta que permiten un mayor escape bacteriano.

10 Pruebas adicionales aclararon que el bacteriófago BCP14 parecía ser específicamente antagonista de los efectos del bacteriófago BCP37 en la reducción del desarrollo de resistencia bacteriana; los datos se muestran en la [Tabla 3](#).

15 El valor final de densidad óptica (DO600) dado en la Tabla 3 refleja el desarrollo de resistencia bacteriana después de 24 horas. Con mezclas de BCP 37 con BCP1 o BCP12, esto se redujo considerablemente en comparación con los controles no tratados. Esto se reduce aún más cuando se utiliza una mezcla de los tres bacteriófagos (BCP1, BCP12, BCP37). Sin embargo, cuando se utiliza el bacteriófago BCP14 en lugar de BCP1, la DO600 final (y, por tanto, el número de bacterias) es notablemente superior, lo que ilustra el efecto antagonista.

Identificación de la resistencia cruzada:

20 Las bacterias huésped que habían desarrollado resistencia al bacteriófago con el que fueron tratadas mostraron un marcado crecimiento a las 24 horas de la infección. Para determinar si los efectos observados con las mezclas iniciales de bacteriófagos se debían a la resistencia cruzada, se cosecharon mutantes resistentes ("de escape") de cada ensayo y se trataron con los otros bacteriófagos candidatos. Esto demostró que las formas resistentes a cada uno de los cuatro bacteriófagos eran también resistentes a todos los demás; los datos se muestran en la [Tabla 4](#).

25 Por lo tanto, los cuatro bacteriófagos (BCP1, BCP12, BCP14, BCP37) entran en el mismo grupo de complementación y permiten la generación de formas comunes de resistencia cruzada de la bacteria huésped. Por lo tanto, era deseable identificar al menos un bacteriófago que no permitiera el desarrollo de dicha resistencia cruzada.

Evaluación de bacteriófagos adicionales:

30 Dado que los mutantes PAK que desarrollaron resistencia a bacteriófagos candidatos individuales mostraron resistencia cruzada a otros bacteriófagos del grupo de prueba, se examinaron bacteriófagos adicionales para identificar candidatos de las soluciones madre existentes que no se vieran comprometidos por el mismo mecanismo de resistencia. Las pruebas de sensibilidad identificaron que los bacteriófagos BCP6, BCP21L, BCP26, BCP28 y BCP45 mostraban actividad contra mutantes PAK resistentes tanto a BCP12 como a BCP37. Se evaluó la actividad de estos bacteriófagos contra PAK en cultivo líquido; los datos se muestran en la [Tabla 5](#).

35 Estos resultados indicaron que BCP28 era el candidato más prometedor, mostrando efectos similares a BCP37 con un desarrollo mínimo de resistencia.

A continuación, se evaluaron todos los bacteriófagos candidatos en mezclas con BCP12 y BCP37; los datos se muestran en la [Tabla 6](#).

40 A pesar de los efectos limitados de BCP6, BCP21L, BCP26 y BCP45 en ensayos individuales, fueron relativamente eficaces en las mezclas. BCP6 y BCP 28 mostraron el desarrollo de resistencia más limitado.

Dada su aparente superioridad en cultivo individual, se seleccionó BCP28 para la mezcla terapéutica candidata, que se combinaría con BCP12 y BCP37. Esta mezcla (la mezcla de tres fagos) contiene tres bacteriófagos de dos grupos de complementación.

Evaluación final de la mezcla terapéutica candidata *in vitro*:

45 Los datos de la evaluación final se muestran en la [Tabla 7](#).

Por lo tanto, se identificó una mezcla candidata de tres bacteriófagos que "aplanaba" el crecimiento de la bacteria huésped, produciendo una muerte rápida y eficaz de la diana bacteriana y limitando notablemente el desarrollo de resistencia bacteriana.

Evaluación *in vivo* de la mezcla de tres fagos:

Los tres bacteriófagos se purificaron como se ha indicado anteriormente y se combinaron para su uso en un estudio *in vivo* en el que se estableció la infección utilizando una cepa luminiscente de PAK (PAK-lumi).

- 5 Se ensayaron bacteriófagos líticos con eficacia contra la cepa PAK de *P. aeruginosa* en cultivos líquidos de bacterias huésped, abordando tanto la resistencia cruzada como el antagonismo aparente entre bacteriófagos específicos en el desarrollo de una mezcla terapéutica optimizada. Se mezclaron tres bacteriófagos seleccionados y se utilizaron en un estudio *in vivo* en el que se estableció la infección utilizando una cepa luminiscente de PAK (PAK-lumi).

Cuatro grupos de ocho ratones BALB/C fueron infectados intranasalmente con PAK-lumi y tratados como sigue:

Los 32 ratones fueron infectados por vía intranasal con 9×10^6 UFC en 25 µl de PAK.Lumi en PBS

- 10 Grupo 1 (n=8): Obtención de imágenes y eutanasia a las t=2 h tras la infección

Grupo 2 (n=8): Obtención de imágenes y tratamiento con PBS en t=2 h tras la infección

Grupo 3 (n=8): Inyección subcutánea de 200mg/kg de ciprofloxacino 2 horas después de la infección, imágenes a las 2, 4, 6, 8 y 24 horas después de la infección y eutanasia a las 24 horas después de la infección (se trata de una dosis extremadamente alta)

- 15 Grupo 4 (n=8): Se tomaron imágenes y se trataron intranasalmente con 30 µl de la mezcla de tres fagos, a las 2 horas de la infección, se tomaron imágenes a las 6 y 8 horas de la infección y se les practicó la eutanasia a las 24 horas de la infección. Se observaron los signos clínicos y la luminiscencia de la infección en los ratones, medida con un sistema de obtención de imágenes IVIS *in vivo*. A las 24h a los animales se les practicó la eutanasia y se determinaron las UFC / UFP del homogeneizado pulmonar.

- 20 La eficacia de la mezcla de tres fagos *in vivo* se demostró tanto por imágenes de fluorescencia como por recuento de bacterias en el pulmón (Antibiótico = ATB = Ciprofloxacina como se indica) [Figuras 1-5].

La eficacia de la mezcla de tres fagos derivada mediante el procedimiento presentado se confirmó *in vivo*.

- 25 La mezcla de bacteriófagos mostró una potente actividad y ninguna resistencia *in vitro* a las 24 horas. *In vivo*, los ratones tratados con bacteriófagos mostraron una marcada disminución de la luminiscencia después de 6h con una mayor reducción global en comparación con el grupo de ciprofloxacino. Esto fue especialmente notable en el área nasofaríngea, aunque también se observaron reducciones de la luminiscencia en el área abdominal. La luminiscencia en los pulmones fue comparable en términos generales, pero se redujo notablemente tanto con la ciprofloxacina como con la mezcla de bacteriófagos. A las 24h, todos los ratones tratados con fagos y antibióticos sobrevivieron con una
30 reducción de ~3 log. en las UFC pulmonares observada en ambos grupos.

Conclusión:

La mezcla de tres fagos es muy eficaz *in vitro*.

También es capaz de controlar rápidamente las bacterias en la orofaringe y los pulmones de ratones infectados por la cepa PAK de *P. aeruginosa* en un modelo de fase aguda.

- 35 Su eficacia es equivalente o superior a una dosis elevada de un antibiótico de probada actividad contra el organismo infectante.

Su acción parece ser más rápida que la del antibiótico y se reduce la diseminación de la infección.

- 40 Partiendo de este modelo agudo, tanto los estudios de biopelícula en laboratorio como los datos de ensayos clínicos del oído infectado crónicamente sugieren que un entorno muy colonizado y rico en biopelícula puede proporcionar las condiciones óptimas para la terapia bacteriófaga.

El pulmón de la fibrosis quística puede proporcionar un entorno de este tipo.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de diseño de un panel de bacteriófagos como una composición terapéutica contra una infección bacteriana, comprendiendo el procedimiento:

a) proporcionar un primer bacteriófago que retrase el crecimiento de una especie o cepa bacteriana diana;

b) propagar dicho primer bacteriófago en un cultivo de la especie o cepa bacteriana diana hasta el desarrollo de resistencia bacteriana contra dicho primer bacteriófago, para obtener un primer cultivo bacteriano resistente;

c) proporcionar un segundo bacteriófago;

d) determinar el crecimiento del primer cultivo bacteriano resistente en presencia de dicho segundo bacteriófago;

e) en el que, si dicho segundo bacteriófago retrasa el crecimiento del primer cultivo bacteriano resistente, el segundo bacteriófago se selecciona para su uso en un panel de bacteriófagos.

2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que, si dicho segundo bacteriófago retrasa el crecimiento del primer cultivo bacteriano resistente, la combinación de primer y segundo bacteriófagos se selecciona para su uso en el panel de bacteriófagos.

3. El procedimiento de la reivindicación 1 o reivindicación 2, comprendiendo además:

a) propagar dicho segundo bacteriófago en el primer cultivo bacteriano resistente hasta el desarrollo de resistencia bacteriana contra dicho segundo bacteriófago para formar un segundo cultivo bacteriano resistente;

b) proporcionar un tercer bacteriófago;

c) determinar el crecimiento del segundo cultivo bacteriano resistente en presencia de dicho tercer bacteriófago;

d) en el que, si dicho tercer bacteriófago retrasa el crecimiento del segundo cultivo bacteriano resistente, el tercer bacteriófago se selecciona para su uso en el panel de bacteriófagos.

4. El procedimiento de la reivindicación 3, en el que, si dicho tercer bacteriófago retrasa el crecimiento del segundo cultivo bacteriano resistente, se selecciona una combinación del tercer bacteriófago y al menos uno de los primeros y segundos bacteriófagos para su uso en un panel de bacteriófagos.

5. El procedimiento de la reivindicación 3 o reivindicación 4, en el que, si dicho tercer bacteriófago retrasa el crecimiento del segundo cultivo bacteriano resistente, se selecciona una combinación del primer, segundo y tercer bacteriófago para su uso en un panel de bacteriófagos.

6. El procedimiento de cualquier reivindicación precedente, en el que un cultivo bacteriano es un cultivo bacteriano líquido.

7. El procedimiento de cualquier reivindicación precedente, en el que el crecimiento se determina en un cultivo bacteriano líquido.

8. El procedimiento de cualquier reivindicación precedente, en el que el crecimiento se determina en un cultivo bacteriano líquido midiendo la densidad óptica del cultivo líquido.

9. El procedimiento de cualquier reivindicación precedente, en el que la densidad óptica se mide a 600 nm.

10. El procedimiento de cualquier reivindicación precedente, en el que la especie o cepa bacteriana diana se selecciona de: *Acinetobacter baumannii*, *Clostridium difficile*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia*, especies bacterianas causantes del olor corporal, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus mutans*.

Tabla 1

Fago	Huésped Bacteriano	Título sol. madre (upf/ml)	¿Buena eficiencia de laminación en resultados de ensayo de placas?		
			Prueba de Sensibilidad	PAK	Ensayo lector de placas (MOI 0,1 en PAK)
			Formación de placas en PAK		
BCP1	BC12	4.3E+10	S	Si	
BCP2	BC254	1.0E+08	I	No	
BCP3	BC15	6.0E+09	R	No	
BCP4	BC207	5.0E+09	I	Si	
BCP6	BC15	4.5E+10	S	No	
BCP12	BC3	3.7E+10	S	Si	
BCP14	BC207	6.0E+09	S	Si	
BCP21L	BC178	1.6E+10	S	No	
BCP29	BC14	1.4E+10	S	Moderada	
BCP33	BC230	6.2E+10	I	No	
BCP37	BC193	3.5E+08	S/I	No	
BCP62	BC191	2.8E+08	R	No	
BCP69	BC254	1.9E+10	I	No	
BCP154	BC725	1.1E+10	S	No	

Tabla 2

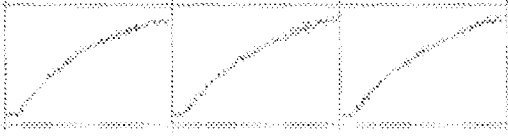
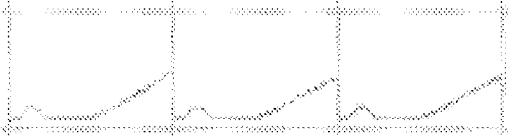
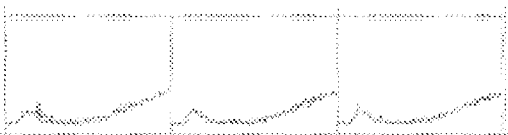
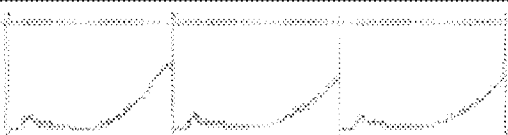
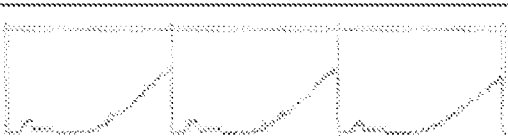
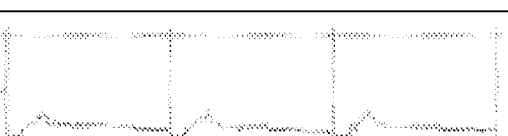

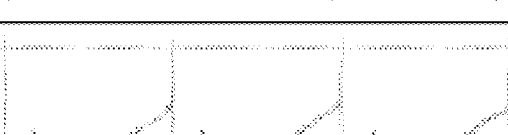
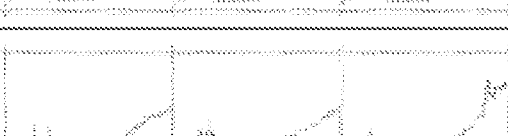
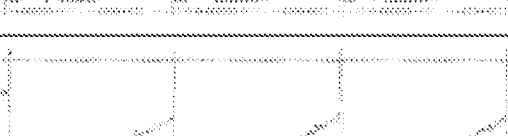
Fago	MOI	DO600 en 24 h
sin fago	-	
BCP12	1	
	10	
BCP14	1	
	10	
BCP37	1	
	10	
Mezcla BCP12 BCP14 BCP37	0.1	
	1	
	10	

Tabla 3

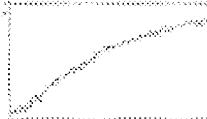
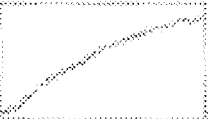
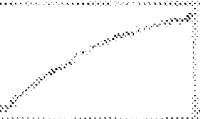


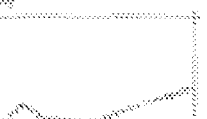


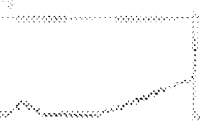






Fago	MOI	DO600 en 24 h y DO600 de punto final			Media DO600
sin fago	-				2.13
		2.09	2.12	2.19	
BCP1 BCP37	0.1				1.06
		1.04	1.10	1.05	
BCP12 BCP37	0.1				1.19
		1.11	1.18	1.28	
BCP1 BCP12 BCP37	0.1				0.95
		0.95	0.94	0.95	
BCP12 BCP14 BCP37	0.1				1.45
		1.39	1.57	1.38	

Tabla 4

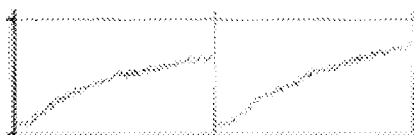
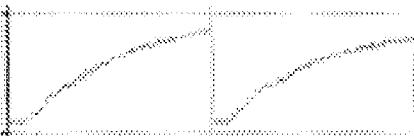

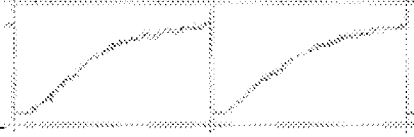
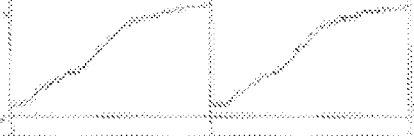
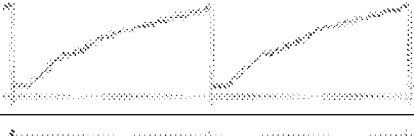
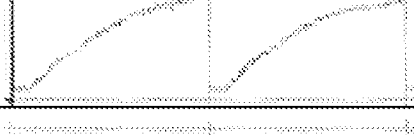
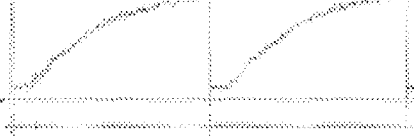

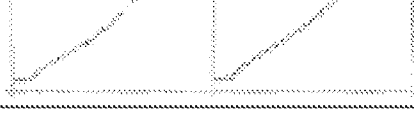
mutante PAK	Fago	MOI	DO600 en 24 h
colonia A mutante resistente a BCP-12	-	-	
	BCP1	1	
	BCP12	1	
	BCP14	1	
	BCP37	1	
colonia A mutante resistente a BCP-14	-	-	
	BCP1	1	
	BCP12	1	
	BCP14	1	
	BCP37	1	

Tabla 4 continuación

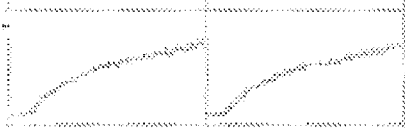
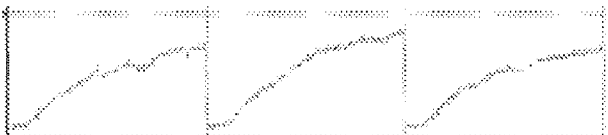
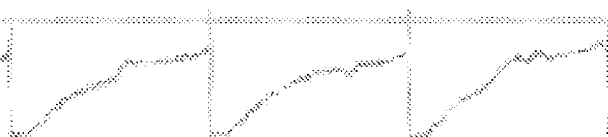
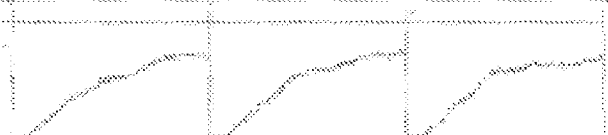
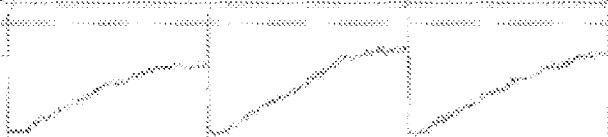
mutante PAK	Fago	MOI	DO600 en 24 h
colonia A mutante resistente a BCP37	-	-	
	BCP1	1	
	BCP12	1	
	BCP14	1	
	BCP37	1	

Tabla 5

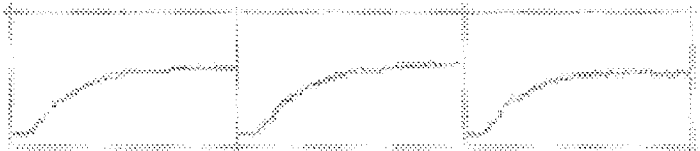
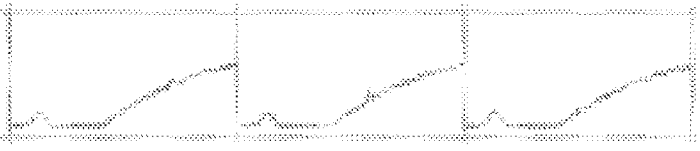
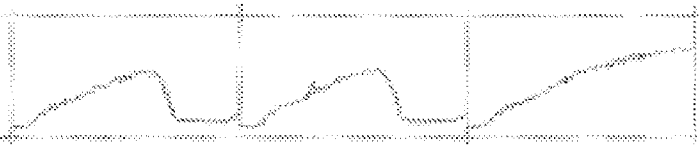
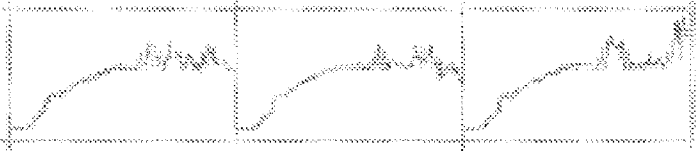
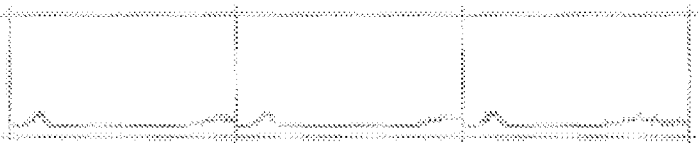
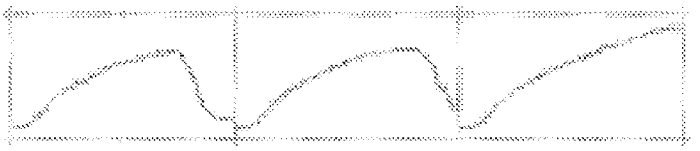
Fago	Crecimiento de Cepa	MOI	DO600 en 24 h
-			
BCP6	BC00015	1	
BCP21_L	BC00178	1	
BCP26	BC00010	1	
BCP28	BC00014	1	
BCP45	BC00237	1	

Tabla 6


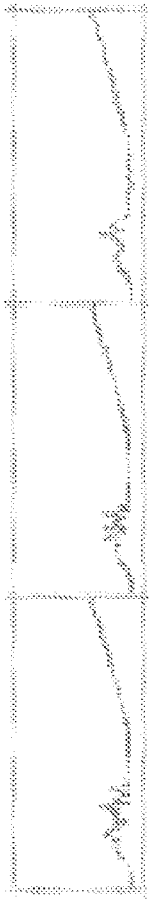


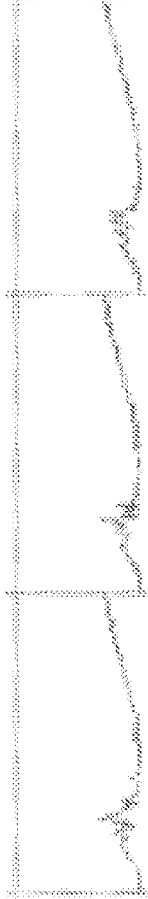
Fago	Crecimiento de Cepa	MOI	DO600 en 24 h
BCP12_PAK BCP37_BC00193 BCP6_BC00015		1	
BCP12_PAK BCP37_BC00193 BCP21L_BC00178		1	
BCP12_PAK BCP37_BC00193 BCP26_BC00010		1	
BCP12_PAK BCP37_BC00193 BCP28_BC00014		1	
BCP12_PAK BCP37_BC00193 BCP45_BC00237		1	

Tabla 7

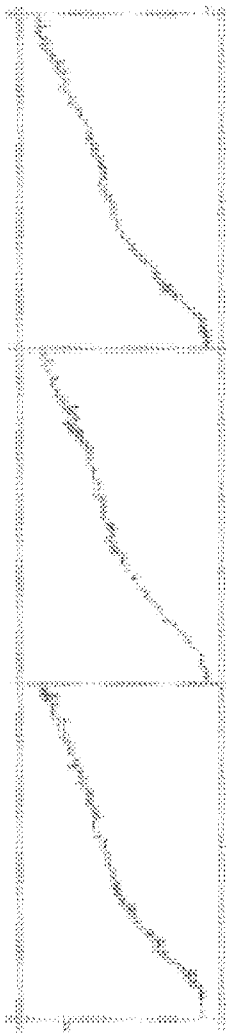
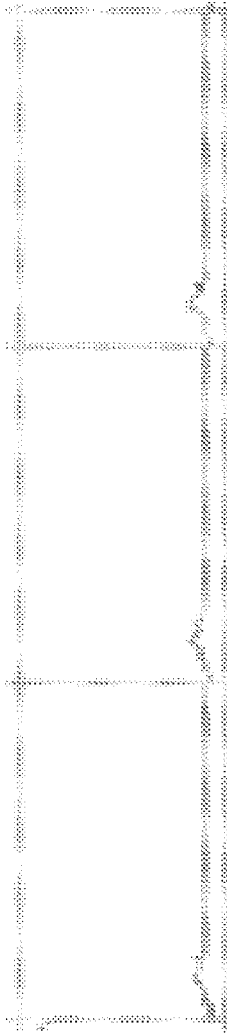
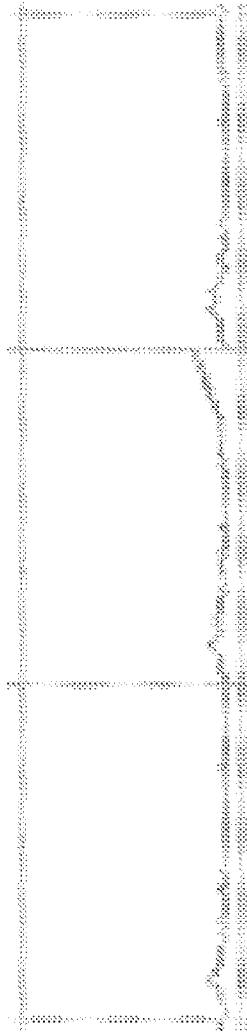
Fago	MOI	DO600 en 24 h
-	-	
BCP12_PAK BCP28_PAK BCP37_BC001 93	1	
BCP12_PAK BCP28_PAK BCP37_BC001 93	10	

Figura 1

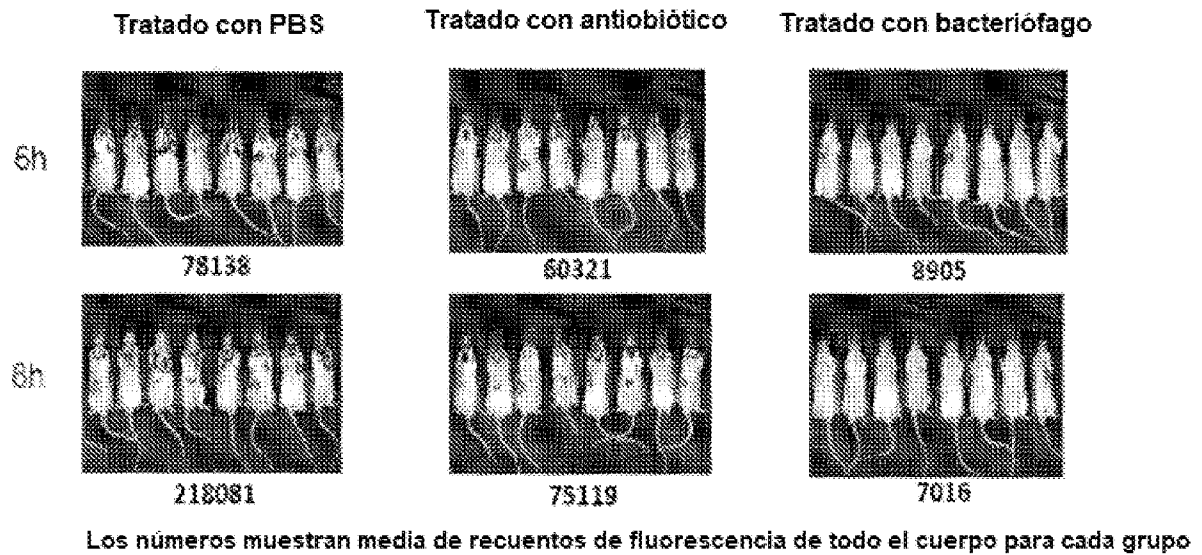


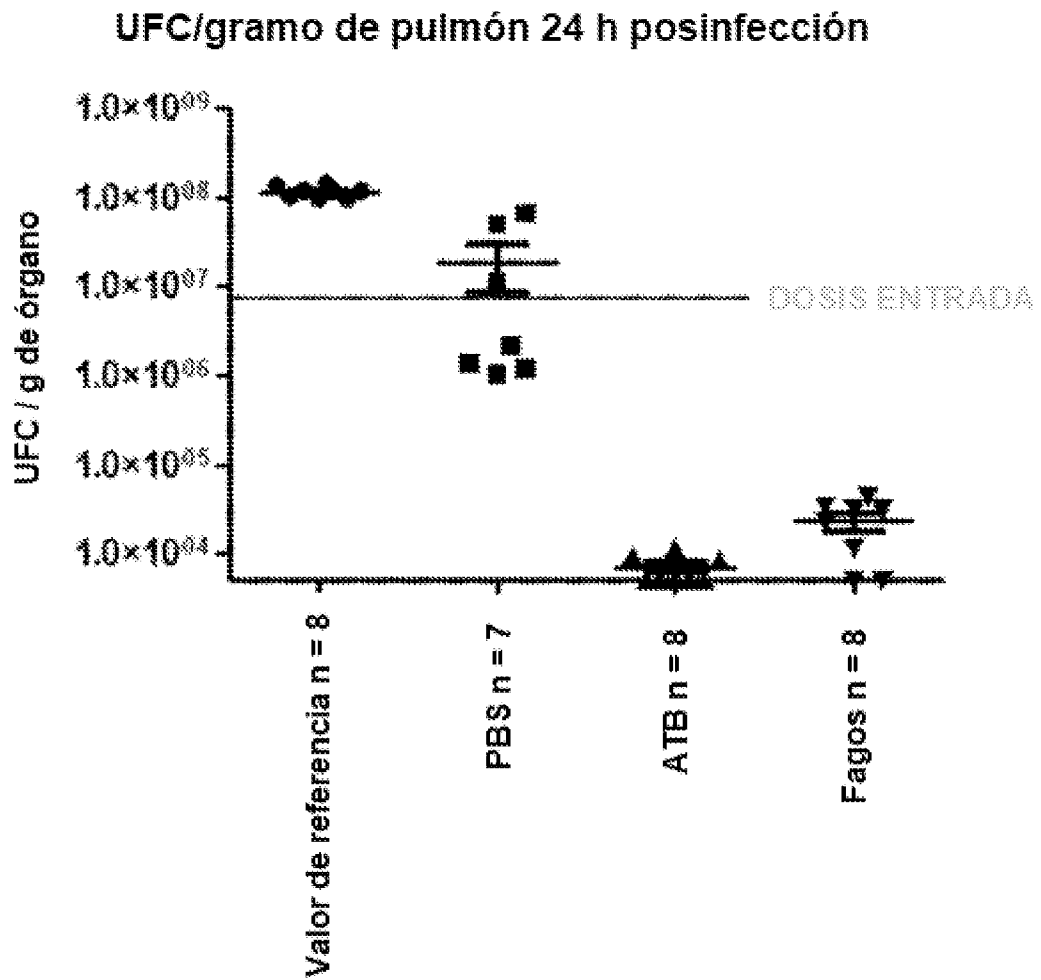
Figura 2

Figura 3

Luminiscencia en ratones infectados de 6 a 24 horas.

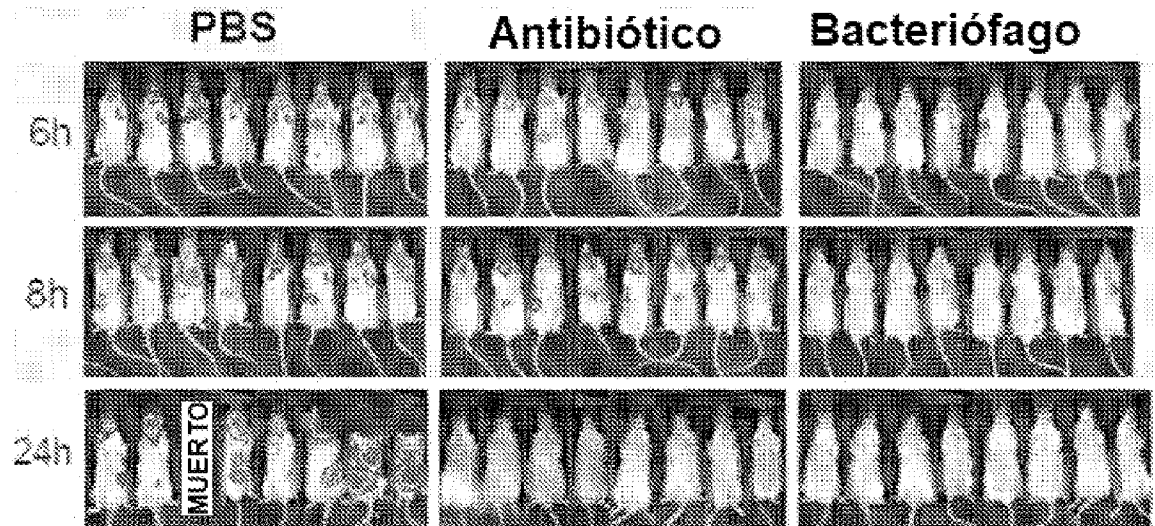
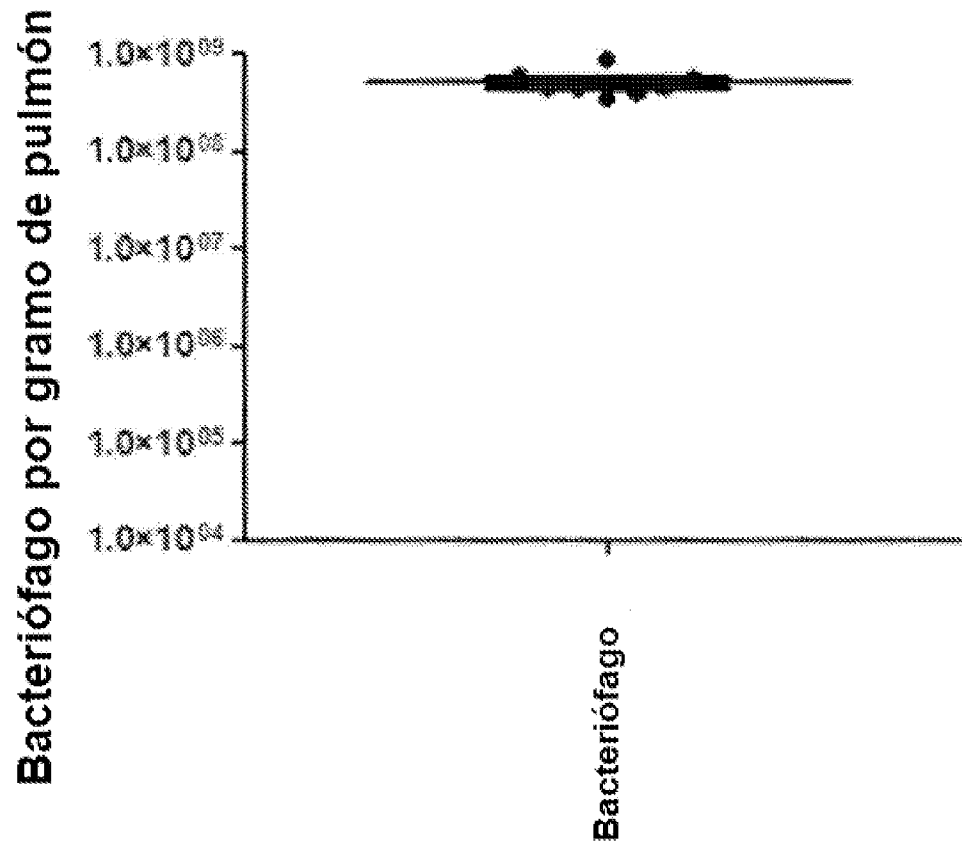


Figura 4

Recuentos de bacteriófago en el pulmón del ratón (sólo muestras tratadas con bacteriófago)



Figuras 5a-c

Luminiscencia en regiones de ratones infectados

Figura 5a

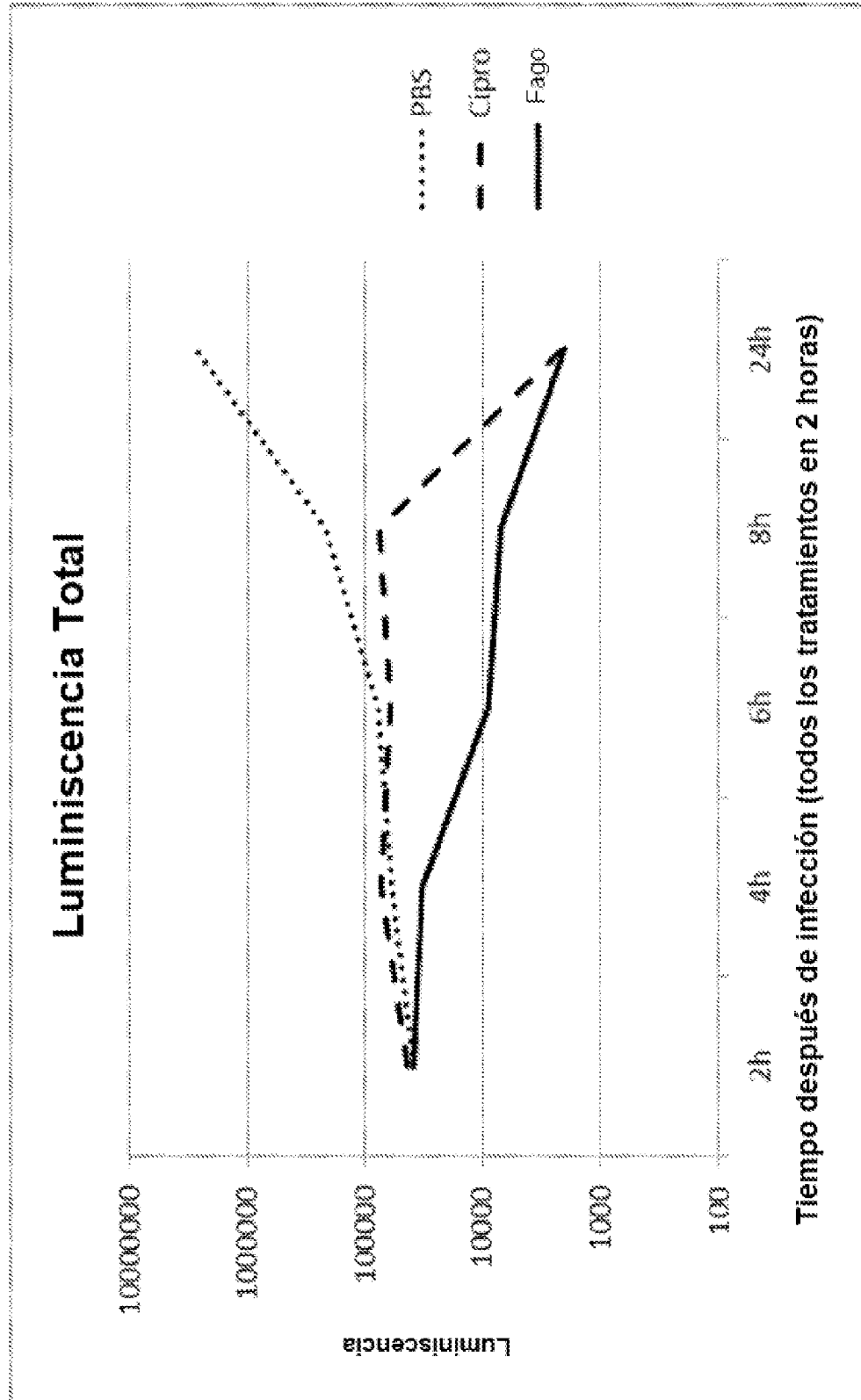


Figura 5b

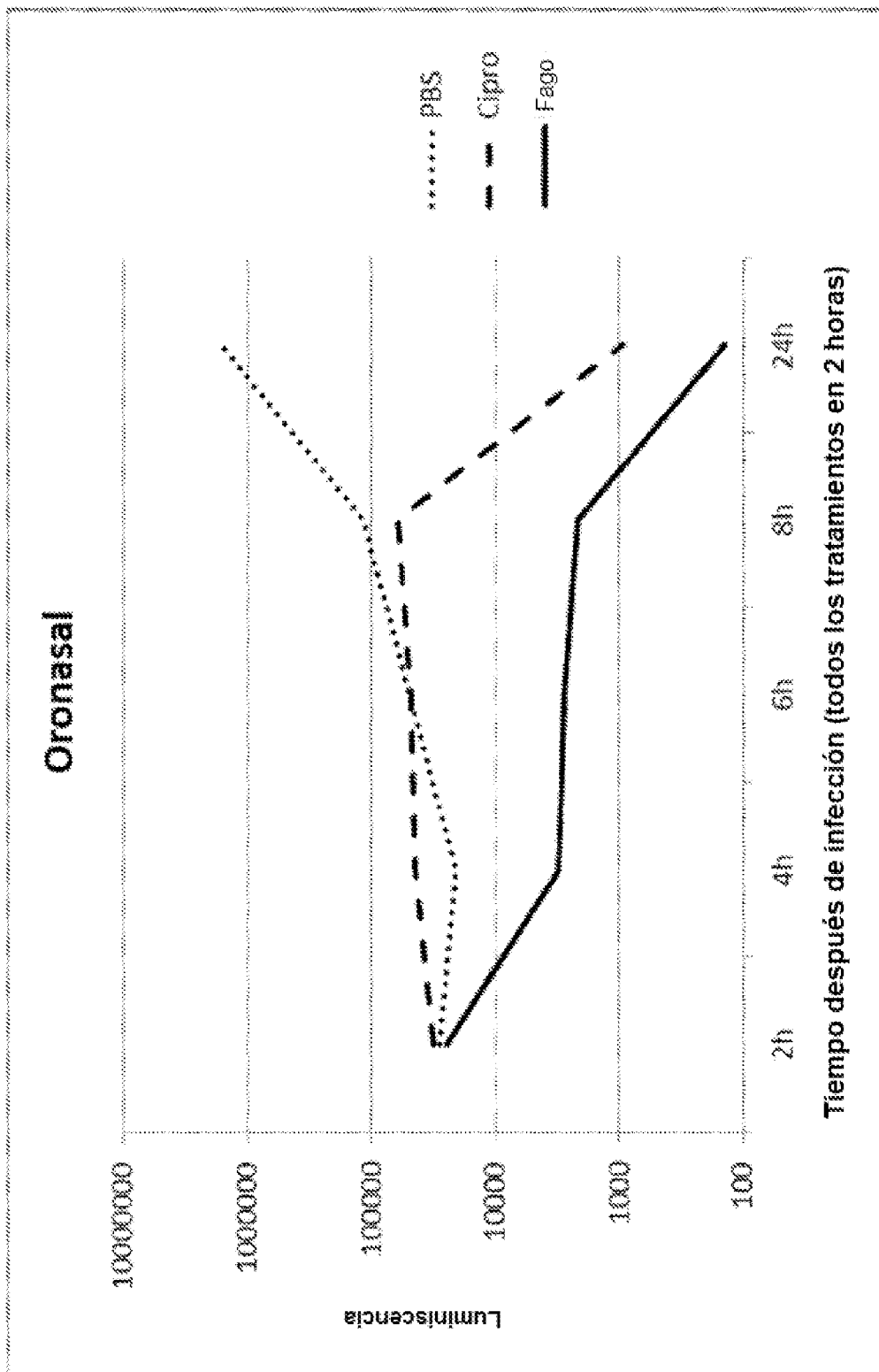


Figura 5c

