



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 292 996**

51 Int. Cl.:

C12N 7/00 (2006.01)

A61K 35/76 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **03744903 .0**

86 Fecha de presentación : **19.03.2003**

87 Número de publicación de la solicitud: **1504088**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **09.02.2005**

54

Título: **Bacteriófagos útiles para la terapia y profilaxis de infecciones bacterianas.**

30

Prioridad: **25.03.2002 GB 0207021**
07.08.2002 US 215056

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.03.2008

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.03.2008

73

Titular/es: **University of Warwick**
Gibbet Hill Road
Coventry, Warwickshire CV4 7AL, GB

72

Inventor/es: **Rapson, Mark, Edward;**
Burden, Faith, Adelaide;
Glancey, Liudmilla, Pencheva;
Hodgson, David, Allan y
Mann, Nicholas, Harold

74

Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

ES 2 292 996 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

Bacteriófagos útiles para la terapia y profilaxis de infecciones bacterianas.

5 La aplicación se relaciona con paneles de bacteriófagos que comprenden los mutantes *vir*, las composiciones que contienen tales mutantes, los métodos de identificación y la producción de dichos paneles de bacteriófagos y el uso de estos paneles como agentes antibacterianos, en el tratamiento de infecciones bacterianas y para profilaxis.

10 Los agentes antibacterianos, en la forma de antibióticos basados químicamente (i.e. agentes no-virales), tales como la penicilina o tetraciclina, son bien conocidos. El problema con dichos antibióticos es que la resistencia a estos es cada vez más común. Las mutaciones que confieren resistencia al antibiótico, o genes que codifican enzimas resistentes a los antibióticos, tales como las penicilinasas, son cada vez más comunes en bacterias patógenas en todo el mundo. La bacteria *Staphylococcus aureus* (MRSA) resistente a la Metilicina, por ejemplo, se ha incrementado comúnmente en forma de infección, frecuentemente adquirida durante cirugía por otras causas en los hospitales. Las infecciones por
15 MRSA son extremadamente difíciles de tratar usando los antibióticos convencionales.

Una alternativa de acercamiento en el tratamiento de infecciones bacterianas es infectar la bacteria con un virus, conocido como un bacteriófago. Dicha "terapia de bacteriófago" primero se desarrolló a principios del siglo veinte, pero ha sido poco usada en Occidente debido a la llegada de los antibióticos en los años de 1940. Muchos trabajos
20 extensos han sido llevados a cabo en Europa Oriental.

Los bacteriófagos (también conocidos como "fagos") son específicos para clases específicas de células bacterianas. No pueden infectar las células de organismos más complejos, debido a grandes diferencias en los mecanismos intracelulares claves, así como de los componentes de la superficie celular. La mayoría de los bacteriófagos presentan
25 estructuras, tales como colas, las cuales permiten que los bacteriófagos se unan a moléculas específicas sobre la superficie de la bacteria diana. El ADN viral dentro de los bacteriófagos luego se inyecta a través de la cola en la célula huésped, que luego se dirige a la producción de nuevos bacteriófagos.

Se ha encontrado, que diversas clases de bacteriófagos, infectan bacterias diferentes. Convencionalmente, pueden ser aislados del ambiente en el que crece una bacteria particular, por ejemplo de aguas residuales o de heces. La
30 presencia de un bacteriófago se puede determinar mediante el crecimiento de la bacteria en un apropiado medio de cultivo, haciendo rotar el medio de cultivo para separar completamente la parte líquida del caldo de la bacteria, y pasando el líquido separado a través de un filtro de poros suficientemente pequeños para prevenir el paso de la bacteria a través del filtro. El extracto filtrado se suele mezclar con medio de cultivo, bacteria adicionada, y luego diseminar,
35 por ejemplo sobre una placa de agar. La presencia de manchas claras, llamadas plaquetas, sobre el césped resultante de la bacteria indica la presencia de uno o más bacteriófagos, los cuales provocan la lisis de la bacteria.

Los bacteriófagos que pueden solamente matar la bacteria se conocen como bacteriófagos "líticos". Los bacteriófagos líticos existen en el exterior de la célula bacteriana en la forma de material de ácido nucleico, frecuentemente el
40 ADN, se rodea por una cubierta proteica. La cubierta proteica generalmente presenta una o más moléculas ligadas a esta, las cuales permiten que los bacteriófagos se unan a moléculas específicas sobre la superficie de la bacteria. En el enlace a la bacteria el ADN consigue ingresar en la bacteria huésped donde se transcribe y traduce en varias proteínas necesarias para la replicación y formación de un nuevo bacteriófago. El ADN también se replica y empaqueta en un nuevo bacteriófago el cual se libera mediante la lisis de la célula bacteriana.

Además de los bacteriófagos líticos, están los bacteriófagos atemperados, o bacteriófagos lisogénicos. Estos bacteriófagos atemperados, presentan dos ciclos de vida, uno en el cual lisan las células infectadas, y el otro en donde
45 entran a un estado de profago. Los bacteriófagos líticos siempre tienen que infectar desde afuera, reprogramar la célula huésped y liberar una explosión del bacteriófago mediante rompimiento o lisado. Estos bacteriófagos "lisogénicos" pueden integrar su ADN en el ADN de la bacteria huésped conduciendo a una asociación virtualmente permanente como un profago dentro de una bacteria específica y su progenie. Algunos profagos no integrados físicamente en el cromosoma, pero presentes como un replicón autónomo. El profago conduce la síntesis de un represor que bloquea la expresión de sus propios genes y también de aquellos bacteriófagos lisogénicos estrechamente relacionados. Ocasionalmente, el profago puede escapar a la regulación de su represor. El ADN del profago puede luego ser recortado del
50 genoma por recombinación de sitios- específicos, replicación, y la progenie liberada a partir de las células huésped, en muchos casos por lisis.

El bacteriófago lítico ha sido usado en el tratamiento de infecciones bacterianas. Los bacteriófagos líticos aislados han sido aplicados a heridas o inyectados vía intravenosa para que estos maten la bacteria. La ventaja de los bacteriófagos es que estos se auto-repican, con tan solo unos cientos y de esta manera los bacteriófagos son capaces de matar
60 hasta cien millones de bacterias. Los bacteriófagos simplemente se replican a si mismos matando bacterias hasta que se hayan eliminado del individuo o del ambiente. WO 01/51066, por ejemplo, revela un método para tratar un paciente con uno o más bacteriófagos líticos. De igual manera, US 4,957,686 revela un método de tratamiento de caries dental con un bacteriófago.

65 Un posible problema con el uso de los bacteriófagos ha sido que el cuerpo de los mismos pacientes presenta frecuentemente una respuesta inmune contra los bacteriófagos y los eliminan de la sangre. US 5,660,812, US 5,688,501 y US 5,766,892 todos muestran los métodos de selección de bacteriófagos para mejorar el tiempo de vida media del

bacteriófago dentro de la sangre de un paciente que se trata. En US 5,811,093 se discute la amplificación de un único gen codificante de las proteínas (cápside E) de la cápside (cubierta) de tal manera que los bacteriófagos sobreviven en un sistema circulatorio animal por más tiempo. En el caso de patentes más recientes, la modificación se identificó como un punto de mutación dentro de un gen.

5 Convencionalmente, los bacteriófagos lisogénicos se han considerado malos candidatos para la terapia con bacteriófagos. Esto se debe a que ellos pueden potencialmente conducir a la transferencia de genes comprometidos en la patogenicidad bacteriana. Algunos bacteriófagos llevan genes de toxinas, y por lo tanto lisogenes que pueden exhibir un incremento de la virulencia. Sin embargo, no todos los bacteriófagos atemperados portan genes de virulencia. Además, los genes bacterianos pueden ser transferidos de un huésped a otro durante la infección con bacteriófago y estos genes pueden incluir genes de virulencia. El primer proceso se llama conversión a bacteriófago y el segundo se llama transducción. En consecuencia, el uso de bacteriófagos lisogénicos ha sido tradicionalmente considerado problemático dado que los bacteriófagos lisogénicos pueden propagar genes responsables de la patogenicidad a otra bacteria. Sin embargo, los bacteriófagos líticos también pueden bien causar transducción.

15 Mientras que los bacteriófagos líticos se conocen por haber sido empleados en el tratamiento de infecciones bacterianas, la identificación de los bacteriófagos líticos es a menudo muy dispendiosa en tiempo dado que los bacteriófagos líticos para algunas bacterias patógenas son relativamente poco frecuentes y difíciles de aislar.

20 Los inventores se han dado cuenta que los bacteriófagos lisogénicos parecen estar presentes más comúnmente en algunas bacterias. Se han dado cuenta que seleccionando un número de diferentes bacteriófagos lisogénicos por su capacidad de infectar diferentes cepas de bacteria, y, por ejemplo, por su ausencia de genes codificantes de algunas toxinas u otras sustancias comprometidas en la patogenicidad bacteriana, estos pueden formar un panel de bacteriófagos. Los miembros del panel, pueden ser seleccionados, por ejemplo para tratar diferentes cepas de la misma bacteria.

Los inventores también han reconocido que el problema con la mayoría de bacterias lisogénicas es que, sobre una célula infectada, el ADN del bacteriófago frecuentemente se integraría en el genoma de la bacteria, y no mataría a la bacteria. Este problema se resuelve mediante la identificación de uno o más mutantes “*vir*” para usar en el panel. Tales mutantes bacteriófagos generalmente comprenden una mutación en una región operadora del ADN del bacteriófago atemperado, la cual previene un enlace de la proteína represora al operador. La proteína represora normalmente se une, al operador y entonces así el profago no se transcribe, ni traduce y no entra al ciclo lítico. Sin embargo, en los mutantes *vir* la mutación significa que el ADN del bacteriófago infectado se transcribe y traduce resultando en la lisis de la bacteria.

35 La invención proporciona una composición farmacéutica y una composición antibacteriana como se define en la reivindicación 1 o en la reivindicación 2.

Los bacteriófagos lisogénicos generalmente comprenden un ADN que codifica uno o más genes para integrasa, resolvasa, trasposasa, excisionasa, *attP*, origen de la replicación y para otros genes asociados con el mantenimiento del profago dentro del genoma de la célula huésped.

Un mutante *vir*, de un bacteriófago atemperado, es aquel que puede líticamente infectar un huésped lisogénico llevando consigo un profago tipo salvaje. Los mutantes *vir* contienen una o más regiones operadoras mutadas en el ADN del bacteriófago, que controlan la transcripción del ADN del profago, que ha sido mutado, así que estos reducen especificidades de enlace para una proteína represora en comparación con el profago tipo salvaje. Teóricamente un mutante *vir* puede resultar debido a una mutación dominante negativa en el gen de la proteína represora. La proteína represora regula la región operadora y puede por si misma ser del bacteriófago o puede ser de un bacteriófago diferente, pero relacionado.

50 Las dos cepas de la bacteria se pueden distinguir por tener diferentes profagos dentro de ellas. Como ya se indicó, la presencia de un profago dentro de una bacteria conferirá protección contra la infección por el mismo bacteriófago y puede conferir protección contra diferentes bacteriófagos, pero relacionados. En consecuencia, teniendo un panel de diferentes bacteriófagos se permite que uno o más bacteriófagos diferentes sean seleccionados así como que un panel de dos o más bacteriófagos puedan ser efectivos contra un rango de bacterias, o que un único bacteriófago pueda ser seleccionado del panel con el fin de tratar una bacteria específica.

Preferiblemente, cada cepa de la bacteria es un patógeno animal o vegetal, especialmente un patógeno humano. Preferiblemente, la bacteria es *Staphylococcus* (especialmente *S. aureus*), *Helicobacter* (especialmente *H. pylori*), *Klebsiella*, *Listeria*, *Mycobacterium*, *Escherichia* (preferiblemente *E. coli*, especialmente *E. coli* 0157), *meningococcus*, *Campylobacter*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Shigella*, *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Clostridium*, *Legionella*, *Acinetobacter* o *Salmonella*. Preferiblemente, el panel contiene de al menos 5, al menos 10, al menos 15, al menos 20, al menos 25, al menos 30, al menos 35 o al menos 40 diferentes bacteriófagos. Preferiblemente, al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90%, más preferiblemente de al menos 95%, más preferiblemente del 100% del panel de los bacteriófagos son los mutantes *vir*. El panel también puede comprender uno o más bacteriófagos líticos.

ES 2 292 996 T3

El panel puede comprender al menos un cambio en el rango de huéspedes del bacteriófago mutante. Un cambio en el rango de huéspedes del mutante es un bacteriófago el cual, en el aislamiento de una bacteria huésped original, no es capaz de infectar una segunda cepa de bacteria, pero que, en mutación con un agente mutante, llega a ser capaz de infectar la segunda cepa de la bacteria.

Preferiblemente, al menos una de las cepas de la bacteria es resistente a uno o más antibióticos. Por antibióticos, indicamos uno o más antibióticos químicos. Es decir, no es un virus funcional que sea capaz de infectar una célula. Los antibióticos incluyen penicilinas, tetraciclinas y aminoglicosidos. Alternativamente la cepa de la bacteria no necesita ser resistente al antibiótico.

Se proporcionan las composiciones farmacéuticas que contienen un panel de bacteriófagos, en combinación con un excipiente farmacéuticamente aceptable. Tales portadores permiten que el panel de bacteriófagos sea aplicado a una parte del animal o a un paciente para ser tratado, o para ser colocado dentro del paciente o del animal a ser tratado.

Las rutas de administración incluyen, pero no se limitan a vía oral, nasal, auricular, vía intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, intratecal, vaginal, rectal, tópica, vía punción lumbar, o la aplicación directa al cerebro o a sus membranas asociadas. La administración se puede llevar a cabo mediante dispositivos tales como aerosoles, para usar como aerosol nasal o inhaladores. Además, la composición farmacéutica puede ser fabricada en tabletas o supositorios.

Preferiblemente, la composición farmacéutica se adapta para aplicación tópica, mediante, por ejemplo, mezclando el panel o el bacteriófago con una crema apropiada que permita al bacteriófago ser aplicado tópicamente a una herida o a las vías nasales. Tales cremas incluyen parafina y cremas basadas en lanolina de los tipos conocidos en el oficio. Preferiblemente el bacteriófago puede ser incorporado en vendajes o vendas para heridas.

Los bacteriófagos pueden ser incorporados en artículos de consumo tales como jabones, cremas de manos o cremas faciales, cremas de afeitarse y espumas, seda dental, polvo dental, pasta dental, etc. Esto permite el tratamiento de enfermedades de la piel, tales como acné, mediante por ejemplo lavado, o el tratamiento de caries dental, por ejemplo mediante el cepillado de dientes con una pasta dental impregnada con los bacteriófagos.

El uso de las composiciones farmacéuticas de la invención como un medicamento o en la profilaxis también se incluye dentro del alcance de esta invención.

La composición se puede utilizar como un profiláctico para matar bacterias que se llevan asintóticamente antes de que estas puedan causar una enfermedad. Por ejemplo, la bacteria puede ser *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) la cual puede causar infecciones sistémicas y abscesos. Estas bacterias pueden residir en la cavidad nasal sin provocar cualquier síntoma aparente de enfermedad. Sin embargo, la bacteria puede ser propagada de persona a persona y puede causar la enfermedad en personas que tengan una reducida capacidad inmune. En consecuencia, la muerte de las bacterias toma parte en la prevención de la enfermedad. El panel de los bacteriófagos puede simplemente ser aplicado vía tópica como crema mediante un hisopo en la nariz.

La composición también se puede utilizar en combinación con un excipiente apropiado como un agente antibacteriano o un agente antiséptico. Dicha composición antibacteriana puede simplemente ser aplicada en la superficie, tal como en el suelo, para ser desinfectado. Alternativamente, los utensilios, tales como los utensilios quirúrgicos, para ser desinfectados, pueden simplemente ser colocados en una solución antibacteriana apropiada que contenga un panel de bacteriófagos. A los materiales que componen dichos utensilios también se les pueden incorporar tales bacteriófagos.

Además el panel de bacteriófagos puede ser incorporado en materiales, tales como plásticos, mediante técnicas tales como encolado, adhesión, o co-polimerización. Los materiales pueden luego ser usados para formar equipos tales como catéteres o cánulas, y similares. Igualmente, el panel de bacteriófagos puede ser incorporado en dichos equipos una vez producidos.

Como alternativa, una muestra de la bacteria a ser tratada o desinfectada puede ser obtenida, la bacteria identificada y un apropiado bacteriófago para matar aquella bacteria seleccionado a partir del panel de bacteriófagos.

El bacteriófago también puede ser utilizado para tratar la leche y productos lácteos. En una función asociada un panel bacteriófago podría también ser usado para prevenir o tratar la mastitis, ya sea incorporando el panel en la unidad de ordeño, o mediante el uso de un hisopo para aplicación tópica en el pezón.

Otro aspecto de la invención proporciona un método de identificación de un apropiado bacteriófago para matar una bacteria, incluyendo las etapas de:

- (i) obtención de una muestra de la bacteria a partir de un paciente, animal, o lugar infectado con una bacteria;
- (ii) identificación de uno o más fagos susceptibles a las características de la bacteria;

ES 2 292 996 T3

(iii) comparación de las características de la etapa (ii) con el conocido cambio en el rango de huéspedes de cada bacteriófago de una biblioteca de bacteriófagos, la biblioteca de bacteriófagos que comprende un primer bacteriófago mutante *vir* capaz de infectar y lisar una primera cepa de la bacteria, y un segundo mutante *vir* capaz de infectar y lisar una segunda cepa de bacteria; e

5

(iv) identificación de uno o más bacteriófagos del apropiado panel para matar bacterias.

La biblioteca de los bacteriófagos puede ser una colección de bacteriófagos que contienen miembros adicionales al panel del primer aspecto de la invención.

10

Una de las características de la bacteria puede ser la presencia o ausencia de un profago. La presencia del profago se puede determinar mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando una pareja de cebadores para amplificar parte del ADN del profago de la bacteria.

15

Otro aspecto de la invención proporciona un método de identificación de la presencia de un profago en una bacteria proporcionando una pareja de cebadores capaces de hibridar bajo altas condiciones de severidad a una secuencia de nucleótidos de profago, y llevándose a cabo la PCR para identificar la presencia del profago.

20

La parte amplificada por la PCR para el ADN del profago, puede posteriormente ser secuenciada usando técnicas de secuenciación convencionales.

Preferiblemente, los cebadores son específicos para una secuencia profago- específica tal como la integrasa.

25

La alta severidad incluye, por ejemplo $MgCl_2$ 2 mM y temperatura de hibridación de 48°C.

30

Otro aspecto de la invención proporciona un medio de almacenamiento de datos legibles con una máquina, que comprende un material de almacenamiento de datos codificados con los datos legibles con una máquina, en donde los datos definen una o más características de cada bacteriófago en un panel o biblioteca de bacteriófagos como se ha definido en la invención. El almacenamiento de datos puede ser mediante una unidad de disco, un CD-ROM, una memoria de ordenador, o algún otro medio legible con una máquina. Los datos preferiblemente permiten la selección de uno o más bacteriófagos convenientes para permitir el tratamiento de una infección bacteriana o la desinfección de contaminación bacteriana.

35

La invención también proporciona, dentro de su alcance, un método de producción de un panel de bacteriófagos, de acuerdo con el primer aspecto de la invención, que comprende el aislamiento de una primera bacteria donante, identificando uno o más bacteriófagos atemperados, mutando los bacteriófagos atemperados y aislando uno o más mutantes *vir* de los bacteriófagos.

40

Preferiblemente, el método de producción del panel comprende las etapas de:

(i) aislamiento de la primera, bacteria, donante;

(ii) co-cultivo de la primera bacteria con una segunda, cultivando, una cepa de bacteria capaz de ser infectada con el bacteriófago;

45

(iii) identificación de los bacteriófagos atemperados obtenidos de la primera bacteria donante;

(iv) mutación de los bacteriófagos atemperados identificados en la etapa (iii) con un mutágeno; y

50

(v) cultivo de la primera bacteria donante con el bacteriófago mutado de la etapa (iv) en la segunda, para identificar mutantes *vir* capaces de lisar la primera, bacteria donante.

55

Como alternativa, en lugar de la etapa (ii), la inducción y el aislamiento de los bacteriófagos se pueden producir por vía química o agentes físicos.

El cambio en el rango de huéspedes de los mutantes se pueden producir por el panel de bacteriófago mediante:

(i) aislamiento de una primera, bacteria donante de interés;

60

(ii) co-cultivo de la primera bacteria con una segunda, cultivando una cepa de bacteria capaz de ser infectada con bacteriófago;

(iii) identificando uno o más bacteriófagos atemperados obtenidos de la primera, bacteria donante;

65

(iv) mutando los bacteriófagos atemperados identificados en la etapa (iii) con un mutágeno; y

(v) cultivando los bacteriófagos atemperados obtenidos en la etapa (iv), una tercera cepa de bacteria previamente sin infectar con el bacteriófago, para identificar uno o más cambios en el rango de huéspedes de los bacteriófagos.

ES 2 292 996 T3

El mutágeno usado es preferiblemente hidroxilamina. Otros mutágenos, tales como la luz ultravioleta y otros mutágenos conocidos del ADN, también pueden ser utilizados.

5 Como alternativa, en lugar de la etapa (ii), la inducción y el aislamiento de los bacteriófagos se puede llevar a cabo mediante vía química o con agentes físicos.

Otro problema frecuentemente encontrado es cuando una planta o un animal, tal como un paciente humano, se encuentra padeciendo de una infección resistente a un antibiótico. Los inventores se han dado cuenta que es posible aislar esta bacteria patógena, identificar cualquier bacteriófago lisogénico dentro de esta bacteria, y mutar el bacteriófago lisogénico a partir del patógeno bacteriano para producir un mutante *vir* del bacteriófago lisogénico. Este mutante *vir* luego puede ser mezclado con uno o más apropiados excipientes farmacéuticamente aceptables, y estos pueden ser utilizados para tratar la infección bacteriana. Por consiguiente, un profago propio del patógeno bacteriano dentro de sus propias células, se puede utilizar para matarlo.

15 Los mutante *vir* identificados mediante tal método pueden a su vez ser adicionados al panel según lo definido en el primer aspecto de la invención.

La invención será descrita ahora por medio de un único ejemplo.

20 *Co-Cultivo y Aislamiento de Staphylophagos atemperados*

Un cultivo durante la noche anterior que contenía dos *Staphylococcus aureus* aislados (SAI) se incubó a 37°C durante una noche (o/n), luego se filtra en condiciones de esterilidad (0.22 μ m) después se centrifugó en una centrifuga Hettich Zentrifugen EBA12 empleando un rotor 1116 a 5000 rpm. Uno de estos SAI se llama la cepa de cultivo y el segundo, la cepa donante. 100 μ l del filtrado se adicionaron a 100 μ l del cultivo o/n de la cepa de cultivo, luego se incubaron a temperatura ambiente (RT) durante 40 min. se adicionaron 3 ml de la porción superior del agar al co-cultivo. La mezcla luego se vertió sobre una placa que contenía Caldo Luria (LB) (Sambrook, *et al.* 1989, Molecular Cloning, a Laboratory Approach. 2nd Ed. Cold Spring Harbour Press). + Mg²⁺ 10 mM + Ca²⁺ 8 mM y se incubó a 37°C o/n. Las plaquetas se escogieron e incubaron o/n a 4°C en PBS + Mg²⁺ 10 mM, luego se inocularon por estrías sobre placas LB + Mg²⁺ + Ca²⁺. Un césped de la cepa de cultivo (100 μ l de la cepa cultivada o/n + porción superior del agar) se vertió sobre las placas inoculadas por estría. Las plaquetas se escogieron de las placas inoculadas por estría y se almacenaron en cloroformo a 4°C hasta que se necesiten.

35 *Mutagénesis y Aislamiento del Mutante*

Mutación con Hidroxilamina

A 0.2 ml de filtrado de stock del bacteriófago libre de bacteria, se le adicionaron 0.4 ml de solución reguladora de EDTA (KPO₄ 0.5 M (pH 6.0) + 5 mM EDTA) + 0.2 ml de agua estéril (sH₂O) + 0.1 ml de MgSO₄ 0.2 M estéril + 0.8 ml de solución de hidroxilamina. La solución de hidroxilamina (NH₂OH 1 M (pH 6.0)) se preparó fresca por la adición de 0.56 ml de NaOH 4 M a 0.35 g de NH₂OH, llevando a un volumen final de 5 ml con sH₂O (agua estéril). Esta se incubó a 37°C durante 31 horas. Se preparó una mezcla control, en la cual el stock de bacteriófago fue sustituido por 0.2 ml de agua estéril sH₂O. Después de las 31 horas de incubación la mezcla se adicionó a 8 ml de LB + MgSO₄ 10 mM + Ca (NO₃)₂ 8 mM en tubería para diálisis. La tubería se colocó en erlenmeyers cónicos de 500 ml, a los cuales se les adicionaron 300 ml de LB + Mg²⁺ + Ca²⁺. Se mantuvo a 4°C durante 7 horas. El LB + Mg²⁺ + Ca²⁺ se reemplazó una segunda y tercera vez. La tercera vez, después de una segunda incubación por 7 horas a 4°C. El stock de bacteriófago se colocó en una botella estéril universal y se almacenó a 4°C después de una tercera incubación por 7 horas a 4°C en LB + Mg²⁺ Ca²⁺.

50 *Curva de mortalidad*

El 99.9% de mortalidad (31 horas) se determinó a través del tiempo. Las muestras se tomaron en puntos de tiempo apropiados. Las muestras se diluyeron en LB + Mg²⁺ + Ca²⁺ y diluciones seriales. Las diluciones se incubaron con la cepa de cultivo en volúmenes iguales de 100 μ l a RT durante 40 min. A esta mezcla se le adicionó la porción superior de agar y se vertió sobre placas LB + Mg²⁺ + Ca²⁺. Las plaquetas se contaron una vez las placas se incubaron a 37°C o/n. Un caída 10³ veces en unidades formadoras de plaquetas (pfu) se determinó como aquella correspondiente al 99.9% de mortalidad.

60 *Mutantes de Virulencia (vir) Aislados*

Los mutantes de virulencia (*vir*) se aislaron después de las etapas de expresión y enriquecimiento. 1 ml del bacteriófago tratado con hidroxilamina y 1 ml de la cepa de cultivo o/n se adicionaron a 15 ml de LB + Mg²⁺ + Ca²⁺ e incubaron a 37°C. Una hora después 1ml de una fuente de cepa o/n se adicionó. Después de la incubación durante la noche, el cultivo se centrifugó en una centrifuga Hettich Zentrifugen EBA12 usando un rotor 1116 a 5000 rpm durante 3 min. y se filtró bajo condiciones de esterilidad (0.22 μ m). El filtro contiene poros de 0.22 μ m los cuales son también pequeños para que la bacteria pase a través de ellos pero no son barrera para el bacteriófago, de aquí que el filtrado este desprovisto de bacteria pero contiene el bacteriófago. 100 μ l del filtrado se adicionaron a 100 μ l de una fuente de cepa o/n e incubaron a RT durante 40 min. A esta mezcla se le adicionó la porción superior de agar y se vertió sobre

ES 2 292 996 T3

las placas LB + Mg²⁺ + Ca²⁺. Después de la incubación o/n, una pipeta de vidrio fue empleada para escoger una única plaqueta. El conector luego se adicionó a un Eppendorf que contenía 100 µl de PBS + Mg²⁺ + Ca²⁺, se agitó e incubó o/n a 4°C. Usando un asa estéril el stock se inoculó por estría sobre dos placas LB + Mg²⁺ + Ca²⁺. Sobre un, césped de la cepa fuente (3 ml de porción superior de agar + 100 µl de cepa fuente se vertió y se adicionó sobre el segundo césped de cepa de cultivo (3 ml de porción superior de agar + 100 µl de cepa fuente). Estos se incubaron a 37°C o/n. El bacteriófago se determinó un supuesto mutante *vir* sí es capaz de infectar tanto la fuente como la cepa de cultivo. Para asegurar la pureza, se empleó una pipeta de vidrio para escoger una única plaqueta de la placa fuente SAI. El conector luego se adicionó a un Eppendorf que contenía 100 µl de PBS + Mg²⁺ + Ca²⁺, se agitó e incubó o/n a 4°C. Como antes se inoculó por estría, se incubó, re-escogió, agitó y almacenó a 4°C.

Controles *vir*

Para asegurar que el bacteriófago aislado como un mutante *vir* no fuera un profago activado de la cadena de cultivo se implementaron los controles. Una alícuota de 15 ml de LB + Mg²⁺ + Ca²⁺ se sembró con la fuente y la cepa de cultivo. Después de la incubación o/n a 37°C el cultivo se centrifugó en una centrifuga Hettich Zentrifugen EBA12 usando un rotor 1116 a 5000 rpm durante 3 min. y se filtró bajo condiciones de esterilidad (0.22 µm). 100 µl del filtrado se adicionaron a 100 µl de la cepa fuente o/n y se incubó a RT durante 40 min. A esta mezcla se le adicionó la porción superior de agar y se vertió sobre las placas LB + Mg²⁺ + Ca²⁺. Sí las plaquetas se observan después de la incubación o/n a 37°C la mutagénesis *vir* no fue intentada.

Mutantes Aislados *hrc* (cambio de rango de huéspedes)

Los mutantes *hrc* se aislaron después de las etapas de expresión y enriquecimiento descritas anteriormente. Algunas cadenas no fueron sensibles al bacteriófago mutante *vir*: huésped *vir*-resistente (VRH). 1 ml del bacteriófago tratado con hidroxilamina y 1 ml del cultivo de la cepa o/n se adicionaron a 15 ml de LB + Mg²⁺ + Ca²⁺ y se incubó a 37°C. Una hora más tarde, 1 ml del cultivo o/n de una cepa de VRH se adicionó. Después de una noche de incubación el cultivo se centrifugó en una centrifuga Hettich Zentrifugen EBA12 usando un rotor 1116 a 5000 rpm durante 3 min. y se filtró bajo condiciones de esterilidad (0.22 µm). 100 µl del filtrado se adicionaron a 100 µl de la cepa VRH o/n y se incubó a RT durante 40 min. A esta mezcla se le adicionó la porción superior de agar y se vertió sobre placas LB + Mg²⁺ + Ca²⁺. Una pipeta de vidrio se utilizó para escoger una única plaqueta. El conector se adicionó a un tubo Eppendorf que contenía 100 µl de PBS + Mg²⁺ + Ca²⁺, se agitó e incubó o/n a 4°C. Usando un asa estéril el stock fue inoculado por estría sobre tres placas LB + Mg²⁺ + Ca²⁺. Sobre una, un césped de la cepa fuente (3 ml de porción superior de agar + 100 µl de la cepa fuente) se vertió y a la segunda un césped de la cepa de cultivo (3 ml de porción superior de agar + 100 µl de la cepa fuente) se adicionó. A la tercera un césped de la cepa VRH se adicionó a la cepa (3 ml porción superior de agar + 100 µl de cepa VRH). Estas se incubaron a 37°C o/n. El bacteriófago se determinó un supuesto mutante *hrc* sí fue capaz de infectar la cepa VRH. No se esperaba que este infectara la fuente o la cepa de cultivo. Para asegurar la pureza una pipeta de vidrio fue empleada para escoger una única plaqueta de la placa de la fuente de cepa. El plug luego se adicionó a un Eppendorf que contenía 100 µl de PBS + Mg²⁺ + Ca²⁺, se agitó e incubó o/n a 4°C. Como antes se inoculó por estría, se incubó, re-escogió, agitó y almacenó a 4°C.

El PBS se describe por Sambrook, *et al.*

Controles *hrc*

Para asegurar que el bacteriófago aislado como un mutante *hrc* no fuera un profago activado de la cepa cultivo o fuente, se implementaron los controles. Dos inóculos se adicionaron a 15 ml de LB + Mg²⁺ + Ca²⁺ como sigue:

Cepa "A"	Cepa "B"
Fuente	VRH
Cultivo	VRH

Después de la incubación o/n a 37°C el cultivo se centrifugó en una centrifuga Hettich Zentrifugen EBA12 usando un rotor 1116 a 5000 rpm durante 3 min. y se filtró bajo condiciones de esterilidad (0.22 µm). 100 µl del filtrado se adicionaron a 100 µl de VRH o/n y se incubó a RT durante 40 min. A esta mezcla se le adicionaron la porción superior de agar y se vertieron sobre las placas de LB + Mg²⁺ + Ca²⁺. Si las plaquetas se observaron después de la incubación o/n a 37°C la *hrc* mutagénesis no fue intentada.

Purificación del Bacteriófago mediante Gradientes de Cloruro de Cesio

4 ml del cultivo SAI reposado durante la noche se adicionaron a cuatro alícuotas de 400 ml de LB + Mg²⁺ + Ca²⁺ en erlenmeyers de 2 litros acanalados y se agitaron (300 rpm) a 37°C. Después de una hora, 40 µl de bacteriófago (2 x 10⁷ pfu) se adicionaron a los cultivos agitados. Después de 4 horas el cultivo se lisó completamente. Los cultivos se reunieron y se adicionó NaCl sólido a una concentración final de 1M. El cultivo lisado se centrifugó a 11000 g durante 10 min. a 4°C después de 1 hora sobre hielo.

ES 2 292 996 T3

El PEG 6000 al 10% (w/v) disuelto en la mezcla que luego se deja en reposo durante toda la noche en un baño de hielo a 4°C. El pellet formado después de la centrifugación a 11000 g durante 10 min. a 4°C usando un rotor según se define en Sambrook *et al.* (1989) se resuspendió en 4 ml de PBS. Un volumen igual de cloroformo se adicionó. La mezcla luego se agitó durante 30 seg. El cloroformo se retiró después de la centrifugación a 3000 g. El cloruro de Cesio (CsCl) se adicionó a una concentración final de 0.5 g/ml. La suspensión se colocó en la parte superior de un gradiente de CsCl hecho en tubos de propileno que contienen las siguientes densidades de CsCl: 1.4, 1.5 y 1.6 g/ml en PBS. Los tubos se centrifugaron a 22,000 rpm (Beckman SW28) durante 4 horas. Una aguja de calibre 21 luego se insertó cuidadosamente a través de los lados del tubo de polipropileno para extraer la banda de bacteriófago. Diálisis repetidas tres veces en PBS + Mg²⁺ + Ca²⁺ durante 7 horas removidas del CsCl. El bacteriófago stock purificado se almacenó a 4°C hasta que se necesitó.

PCR Específica de la Integrasa

El *Staphylococcus aureus* aislado mostró que casi siempre contenía al menos un bacteriófago atemperado integrado en su ADN. Los bacteriófagos atemperados capaces de insertarse en el ADN del huésped deben poseer un medio para hacerlo, y esto es más frecuentemente facilitado por la enzima, integrasa, la cual cataliza la integración del ADN del bacteriófago en el ADN de la bacteria huésped.

Un número de cebadores PCR han sido diseñados para amplificar e identificar los genes de la integrasa específicamente encontrados dentro de los bacteriófagos capaces de infectar un *Staphylococcus aureus*. Dicha tecnología debería también ser dirigida a los genes importantes de modo similar en otros sistemas bacteria/bacteriófago, tales como los genes de la resolvasa (importante en la integración del bacteriófago de *Listeria*). La presencia de los genes de la integrasa dentro del ADN bacteriano podría sugerir la presencia del profago o de las entidades fago-relacionadas tales como las islas de patogenicidad.

En el momento del diseño de los cebadores PCR habrían aproximadamente 27 genes secuenciados de integrasa del bacteriófago de *Staphylococcus aureus*. Estos genes de integrasa fueron alineados y su relevancia filogenética se determinó, mediante la creación de un árbol filogenético. Este método mostró que parecerían ser ocho "Familias" distintas de genes de integrasa del bacteriófago encontradas en el bacteriófago o en las entidades relacionadas al bacteriófago dentro del *Staphylococcus aureus*. Las reacciones de la PCR utilizan los cebadores anteriormente mencionados, y por lo tanto nos permiten determinar que familias de bacteriófagos o de elementos relacionados al bacteriófago están presentes dentro del ADN del *Staphylococcus aureus*.

Cebadores de la PCR

Los cebadores usados para amplificar e identificar los genes de la integrasa de las familias específicas se mencionan a continuación:

FAMILIA 1 Adelante: CGT CAA CTC GGA GAT ATG AA

FAMILIA 1 Atrás: GTA TCC GAA TCC TTC CTC GT

FAMILIA 2 Adelante: ATT CGT TGC ACT CAT GAC AG

FAMILIA 2 Atrás: CTC GCA ACT TCT GCT ACT CA

FAMILIA 3 Adelante: CTG TTG GCT ATG CAC GAT CT

FAMILIA 3 Atrás: CTG GGA ATA GGA GTT ACC GA

FAMILIA 4 Adelante: GCA CCG TCC ACA TCT ACA TT

FAMILIA 4 Atrás: CTG CAC GCA TGC CTG TAT AT

FAMILIA 5: Adelante: GCG TGA AGC TAA TTC TGC TG

FAMILIA 5 Atrás: ACT GAC ACG ACA ACC CGT AC

FAMILIA 6 Adelante: GCG AAG CTA TGG CTC TTG TT

FAMILIA 6 Atrás: CAC GTT GAT GTC GTT CAG TT

FAMILIA 7 Adelante: GCG AAT TGG TGA AGC TAC TG

FAMILIA 7 Atrás: AGC ATG AGA ATG CCG TAA CC

FAMILIA 8 Adelante: GGC ACT ATC AAA GAG ACA AC

FAMILIA 8 Atrás: CTA CAT GCT CTT GCA TTG TC

ES 2 292 996 T3

Condiciones de la reacción PCR

La temperatura de hibridación usada para esta reacción es de 48°C. La reacción PCR es en general una reacción con 30 ciclos.

5

Una mezcla maestra de PCR para ocho reacciones se hace a continuación:

1.5 μ l de Taq Polimerasa - disponible de Gibco Life Tech

10 4 μ l de dNTPs (25 μ M) - disponible de Invitrogen

40 μ l de 10x Solución reguladora (200 mM de Tris. HCl, 500 mM KCl, pH 8.4) - disponible de Gibco Life Tech
16 μ l de $MgCl_2$ (50 mM)

15 280 μ l de Agua (estéril, desionizada)

3.2 μ l de la mezcla maestra del cebador (Cebador adelante y atrás en relación 1:1) (el stock es aproximadamente 10 μ M)

20 Luego se adicionan 45 μ l de la mezcla maestra anterior a 5 μ l de la muestra a ser evaluada (5 μ l de 1 colonia suspendida en 100 μ l de agua).

La PCR permite la presencia de profagos y de entidades fago-relacionadas para ser detectadas e identificadas en la bacteria.

25

Resultados de Experimentos Nasales en Voluntarios

30 El siguiente experimento se diseñó para evaluar la eficacia de un bacteriófago mutado *vir* aplicado tópicamente para controlar el transporte-nasal de MRSA.

Método:

35 El *vir* ψ 134/B1, en una concentración de 2×10^8 pfu / ml, se aplicó a los senos nasales anteriores de un voluntario nasalmente sano y portando la cepa fuente, SAI 134. Un segundo voluntario que fue MRSA positivo, pero que no porto el SAI 134 fue usado como control. El voluntario control recibió todo aquello que el voluntario sin control recibió, excepto el bacteriófago. Los voluntarios fueron ambos masculinos, de 25 años de edad, del mismo peso y estatura. Ambos fueron estudiantes de último año de PhD que trabajaban en el mismo campo y vivían en la misma casa en el momento del experimento. Ambos voluntarios recibieron el mismo hisopo y los protocolos de inoculación.

40

La solución de fago con base en PBS se aplicó en la parte anterior de cada fosa nasal vía bastoncillos de algodón. Estos últimos fueron humedecidos en solución de fago con base en PBS y ligeramente escurridos. La solución se aplicó en tres aplicaciones cada una de 20 minutos en duración (a tiempos de: 0 - 20, 60 - 80 y 120 - 140 minutos).
45 Un bastoncillo de algodón separado se introdujo a cada fosa nasal en cada aplicación y la solución se aplicó mediante movimientos circulares, para asegurar una cobertura máxima de la mucosa nasal.

45

Las muestras se tomaron por triplicado y se colocaron en placas Baird Parker, (las cuales son selectivas para *S. aureus*) en puntos de tiempo designados (0, 20, 60, 80, 120, 140 min., 8, 18, 24 horas, 2, 3, 4, 5 días). Después de la incubación o/n las placas se observaron y el número de colonias presentes se graduó sobre una escala arbitraria:

50

0: Sin colonias

55

1: <10 colonias

2: 10-100 colonias

3: > 100 colonias

60

65

ES 2 292 996 T3

Resultados

Sin Fago

Tiempo (h)	SW AB:			Promedio
	1	2	3	
0.0	3	3	3	3.0
0.3	2	3	3	2.7
1.0	1	2	3	2.0
1.3	3	3	2	2.7
2.0	3	3	2	2.7
2.3	3	3	1	2.3
5.0	1	1	2	1.3
8.8	3	2	1	2.0
18.0	3	3	3	3.0
48.0	3	2	3	2.7
96.0	3	2	3	2.7
120.0	3	3	3	3

Fago

Tiempo (h)	SW AB:			Promedio
	1	2	3	
0.0	3	3	3	3.0
0.3	3	3	3	3.0
1.0	2	2	2	2.0
1.3	1	1	1	1.0
2.0	2	2	2	2.0
2.3	1	2	1	1.3
5.0	1	1	1	1.0
8.8	1	1	1	1.0
18.0	1	1	1	1.0
48.0	1	2	1	1.3
96.0	2	2	2	2.0
120.0	3	2	3	2.7

Se puede observar que el número promedio de bacterias se redujo rápidamente en el voluntario que recibió el bacteriófago. El número de bacterias permaneció inferior por un gran período en este voluntario. En el quinto día la población de *S. aureus* se ha reestablecido en ambos voluntarios.

Conclusión

Este experimento preliminar sugiere que la adición del bacteriófago de la manera descrita reduce el número de *S. aureus* en la cavidad nasal del voluntario. El nivel de reducción está por encima al observado cuando solo el adyuvante se utiliza. El tratamiento continuado debería ser necesario para asegurar la eliminación de la bacteriana.

Modelo en Herida de Animal

Cuando se adicionó ψ 134/B1 *vir* a un modelo de herida quirúrgica murina infectada con SAI 134, la recuperación de la bacteria se redujo significativamente y los animales se protegieron de las manifestaciones clínicas de la infección. Los experimentos en animales utilizaron 2×10^8 pfu/ml de bacteriófagos.

Producción de un Panel de Bacteriófagos

El panel de bacteriófagos sería activo contra aproximadamente 100 bacterias aisladas de la colección de la Warwick University SAI, que incluye las 17 cepas conocidas de EMRSA (*S. aureus* epidémicas resistentes a la meticilina) y otras *S. aureus* aisladas a través de Europa y fuentes públicamente disponibles de bacterias, tales como la NCIMB o la ATCC. Eventualmente, se espera que las cepas de la bacteria sean colectadas a partir de pacientes en hospitales alrededor del país y así obtener una gran colección de cepas de bacterias.

ES 2 292 996 T3

Una vez el bacteriófago atemperado, moderado se obtiene, un mutante (*vir*) virulento se aísla. Los mutantes de tipo salvaje y *vir* se evaluaron contra las diferentes cepas de bacteria. Cuando al menos, por ejemplo, el 70%, 80%, 90%, 95%, preferiblemente 100% de las cepas bacterianas se pueden controlar por los mutantes *vir*, los bacteriófagos dentro del panel se pueden purificar y combinar para producir un producto terapéutico o un producto profiláctico.

5

El producto se puede combinar con cremas acuosas estándares de grado farmacéutico, que permiten la aplicación tópica del producto. Como alternativa, otros excipientes farmacéuticamente aceptables se pueden mezclar con el panel de bacteriófagos.

10

El panel o los bacteriófagos pueden ser actualizados periódicamente para tratar con nuevas cepas de bacterias resistentes que puedan surgir.

15

Si una cepa de la bacteria se percibe que el panel de los bacteriófagos es ineficaz, entonces la bacteria se puede aislar y obtener su profago. Los bacteriófagos atemperados pueden ser aislados y los mutantes *vir* producidos contra la nueva cepa de bacteria, y así incorporar en el panel de bacteriófagos los mutantes *vir*.

20

En la extraña situación que ninguno de los bacteriófagos del panel de bacteriófagos sea capaz de infectar una bacteria asociada con una infección, entonces la bacteria puede ser aislada y un bacteriófago mutado individual producir un mutante *vir* para tratar esta infección.

Referencias citadas en la descripción

25

Esta lista de referencias citadas por el aspirante es solamente para conveniencia del lector. No forma parte del documento de patente Europea. Aún cuando se ha tenido gran cuidado en recopilar las referencias, los errores u omisiones no se pueden excluir y la EPO desconoce toda responsabilidad a este respecto.

Documentos de Patente citados en la descripción

30

• WO 0151066 A [0008]

• US 4957686 A [0008]

35

• US 5660812 A [0009]

• US 5688501 A [0009]

• US 5766892 A [0009]

40

• US 5811093 A [0009]

• GB 0207021 A [0081]

45

• US 10215056 B [0081]

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición farmacéutica que consta de un panel de bacteriófagos que comprende un primer bacteriófago mutante *vir* capaz de infectar y lisar una primera cepa de bacteria, y un segundo bacteriófago mutante *vir* capaz de infectar y lisar una segunda cepa de bacteria de la misma especie de bacteria y en donde el primer y segundo mutantes *vir* presentan una mutación en la región operadora que previene la unión de una proteína represora a un operador, en combinación con un excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 10 2. Una composición anti-bacteriana que consta de un panel de bacteriófagos que comprende un primer bacteriófago mutante *vir* capaz de infectar y lisar una primera cepa de bacteria, y un segundo bacteriófago mutante *vir* capaz de infectar y lisar una segunda cepa de bacteria de la misma especie de bacteria y en donde el primer y segundo mutantes *vir* presentan una mutación en la región operadora que previene la unión de una proteína represora a un operador, en combinación con un excipiente.
- 15 3. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde cada citada cepa de bacteria es un patógeno de humano o animal o vegetal.
- 20 4. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2 que comprende diferentes bacteriófagos efectivos contra diferentes bacterias.
- 25 5. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2 que comprende al menos un cambio en el rango de huéspedes del bacteriófago mutante, que en el aislamiento de una bacteria huésped original no es capaz de infectar una segunda cepa de la bacteria, pero que en la una mutación con un agente mutagénico pasa a ser capaz de infectar la segunda cepa de la bacteria.
- 30 6. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde al menos una de las citadas cepas de bacterias es resistente a uno o más antibióticos.
- 35 7. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1, adaptada para aplicación tópica.
- 40 8. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1 para usar como un medicamento.
- 45 9. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1 para la profilaxis de una infección bacteriana.
- 50 10. El uso de una composición antibacteriana de acuerdo con la reivindicación 2 como un desinfectante, con la condición que la composición antibacteriana no se utilice para el tratamiento en el cuerpo humano o animal mediante cirugía o terapia.
- 55 11. El uso de una composición antibacteriana de acuerdo con la reivindicación 2 como un antiséptico, con la condición que la composición anti-bacteriana no se utilice para el tratamiento en el cuerpo humano o animal mediante cirugía o terapia.
- 60 12. El uso de una composición antibacteriana de acuerdo con la reivindicación 2 como un constituyente de un dispositivo, mecanismo quirúrgico o médico.
- 65 13. Un método de identificación de un apropiado bacteriófago para matar una bacteria, que comprende las etapas de:
- (i) identificación de uno o más fagos de características sensibles de una bacteria en una muestra obtenida de un paciente,
 - (ii) comparación de las características de la etapa (ii) con las conocidas para el rango de huésped de cada bacteriófago de una biblioteca de bacteriófagos, dicha biblioteca de bacteriófagos consta de un primer bacteriófago mutante *vir* capaz de infectar y lisar una primera cepa de bacteria y un segundo mutante *vir* capaz de infectar y lisar una segunda cepa de bacteria de la misma especie de bacteria; e
 - (iii) identificación de uno o más bacteriófagos del apropiado panel para matar dicha bacteria.
14. Un método de acuerdo con la reivindicación 13, en donde la presencia o ausencia de uno o más profagos en dicha bacteria se determina mediante PCR usando un par de cebadores para amplificar el ADN del profago de dicha bacteria.
15. Un medio de datos de almacenamiento legible por una máquina, que comprende un material de almacenamiento de datos codificado con datos legibles por una máquina, en donde los datos definen una o más características de cada bacteriófago en un panel de bacteriófagos en una composición farmacéutica o antibacteriana como se define en las reivindicaciones 1 o 2.

ES 2 292 996 T3

16. Un medio de datos de almacenamiento legible por una máquina, que comprende un material de almacenamiento de datos codificado con datos legibles por una máquina, en donde los datos definen una o más características de cada bacteriófago en una biblioteca como se define en la reivindicación 13.

5 17. Un método de producción de una composición farmacéutica o una composición antibacteriana de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, que comprende:

(i) cultivo de una primera bacteria donante;

10 (ii) identificación de uno o más bacteriófagos atemperados, de la citada bacteria donante;

(iii) mutación de los bacteriófagos atemperados;

15 (iv) aislamiento de uno o más mutantes *vir* primeros de dichos bacteriófagos, el citado primer mutante *vir* comprende una mutación en una región operadora la cual previene la unión de un represor al operador; y

20 (v) repetición de las etapas (i) a (iv) usando una segunda bacteria donante la cual es una segunda cepa de bacteria de la misma especie como la primera bacteria donante, para identificar un segundo mutante *vir* que comprende una mutación en una región operadora la cual previene la unión de un represor al operador.

18. Un método de producción de una composición de acuerdo con la reivindicación 17, en donde:

25 (i) la primera bacteria donante es co-cultivada con una segunda, cultivando la cepa de la bacteria infectada con el bacteriófago; y

(ii) uno o más bacteriófagos atemperados citados se identifican.

19. Un método de producción de una composición de acuerdo con la reivindicación 17 en donde:

30 (i) la bacteria donante se induce para producir bacteriófagos atemperados, con un agente físico o químico; y

(ii) uno o más bacteriófagos atemperados citados se identifican.

35 20. Un método de producción de una composición farmacéutica o una composición antibacteriana de acuerdo con la reivindicación 5 que comprende:

(i) aislamiento de una primera bacteria donante de interés:

40 (ii) ya sea (a) co-cultivo de la primera bacteria con una segunda, cultivando la cepa de la bacteria infectada con el bacteriófago o (b) inducción de dicha bacteria donante para producir el bacteriófago atemperado, con un agente físico o químico;

(iii) identificación de uno o más bacteriófagos atemperados obtenidos a partir de la mencionada, primera bacteria donante;

45 (iv) mutación de los dichos bacteriófagos atemperados identificados en la etapa (iii) con un mutágeno; y

50 (v) cultivo de los bacteriófagos atemperados obtenidos en la etapa (iv), con una tercera cepa de la bacteria, sin infectar previamente con el bacteriófago, para identificar uno o más bacteriófagos para cambiar el rango de huéspedes.

55

60

65

ES 2 292 996 T3

LISTA DE SECUENCIAS

5 <110> Universidad de Warwick
<120> Agentes Anti-Bacterianos
<130> P706370US
10 <150> GB 0207021.7
<151> 2002-03-25
15 <150> US 10/215,056
<151> 2002-07-08
20 <160> 16
<170> Patente En versión 3.2
25 <210> 1
<211> 20
30 <212> ADN
<213> Artificial
35 <220>
<223> Cebador PCR: FAMILIA 1 Adelante
40 <400> 1
45 cgccaactcg gagatatgaa 20
<210> 2
50 <211> 20
<212> ADN
55 <213> Artificial
<220>
60 <223> Cebador PCR: FAMILIA 1 Atrás
<400> 2
65 gtatccgaat ccttcctcgt 20

ES 2 292 996 T3

<210> 3

<211> 20

5 <212> ADN

<213> Artificial

10 <220>

<223> Cebador PCR: FAMILIA 2 Adelante

15 <400> 3

20 atcgttgca ctcacgacag

20

<210> 4

25 <211> 20

<212> ADN

30 <213> Artificial

<220>

35 <223> Cebador PCR: FAMILIA 2 Atrás

40

45

50

55

60

65

ES 2 292 996 T3

gcaccgtcca catctacatt

20

5 <210> 8

<211> 20

10 <212> ADN

<213> Artificial

15 <220>

<223> Cebador PCR: FAMILIA 4 Atrás

20 <400> 8

ctgcacgcat gcctgtatat

20

25

<210> 9

<211> 20

30

<212> ADN

<213> Artificial

35

<220>

<223> Cebador PCR: FAMILIA 5 Adelante

40

<400> 9

45

gcgtgaagct aattctgctg

20

<210> 10

50

<211> 20

<212> ADN

55

<213> Artificial

<220>

60

<223> Cebador PCR: FAMILIA 5 Atrás

65

<400> 10

actgacacga caaccctac

20

ES 2 292 996 T3

<210> 11

<211> 20

5 <212> ADN

<213> Artificial

10 <220>

<223> Cebador PCR: FAMILIA 6 Adelante

15 <400> 11

20 gcgaagctat ggctcttggt 20

<210> 12

25 <211> 20

<212> ADN

30 <213> Artificial

<220>

35 <223> Cebador PCR: FAMILIA 6 Atrás

<400> 12

40 cacgttgatg tcgttcagt 20

45 <210> 13

<211> 20

50 <212> ADN

<213> Artificial

55 <220>

<223> Cebador PCR: FAMILIA 7 Adelante

60 <400> 13

65 gcgaattggt gaagctactg 20

<210> 14

ES 2 292 996 T3

<211> 20

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

10 <223> Cebador PCR: FAMILIA 7 Atrás

<400> 14

15

agcatgagaa tgccgtaacc

20

20 <210> 15

<211> 20

25 <212> ADN

<213> Artificial

30 <220>

<223> Cebador PCR: FAMILIA 8 Adelante

35

<400> 15

40 ggcactatca aagagacaac

20

<210> 16

45 <211> 20

<212> ADN

50 <213> Artificial

<220>

55 <223> Cebador PCR: FAMILIA 8 Atrás

<400> 16

60

ctacatgctc ttgcattgtc

20

65