

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 986 675**

51 Int. Cl.:

A61K 35/76	(2015.01)
A61K 35/768	(2015.01)
A61K 45/06	(2006.01)
A61P 31/04	(2006.01)
C12N 1/06	(2006.01)
C12N 7/01	(2006.01)
C12N 7/02	(2006.01)
C12R 1/92	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.02.2019 PCT/US2019/017129**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **15.08.2019 WO19157231**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.02.2019 E 19751368 (2)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.07.2024 EP 3749342**

54 Título: **Bacteriófago para el tratamiento y la prevención de cánceres asociados a bacterias**

30 Prioridad:

07.02.2018 US 201862627725 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.11.2024

73 Titular/es:

**ARMATA PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)
4503 Glencoe Avenue
Marina del Rey, CA 90292, US**

72 Inventor/es:

**MORALES, SANDRA, P. y
BILINSKY, IGOR, P.**

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

ES 2 986 675 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

Bacteriófago para el tratamiento y la prevención de cánceres asociados a bacterias

Referencia cruzada a solicitudes

5 La presente solicitud reivindica la prioridad de la solicitud de EE. UU. n.º 62/627 725, presentada el 7 de febrero de 2018.

Lista de secuencias

La presente divulgación contiene un listado de secuencias que ha sido presentado por vía electrónica en formato ASCII. La copia de ASCII, creada el 30 de enero de 2019, se denomina 054249-503001 WO_Sequence_Listing_ST25 y tiene un tamaño de 1,24 megabytes.

10 **Campo**

La presente divulgación se refiere a composiciones de bacteriófagos y al uso de las mismas para aplicaciones médicas.

Antecedentes

15 Los patógenos bacterianos pueden estar asociados con la carcinogénesis/tumorigénesis en algunos tumores y/o tejidos. Se necesitan procedimientos para tratar o prevenir el cáncer. Dabrowska K. *et al.*, ACTA VIROLOGICA, vol. 48, 1 de enero de 2004, páginas 241-248, divulgan la actividad antitumoral de determinados bacteriófagos en determinados modelos experimentales murinos de cáncer. Dabrowska K. *et al.*, DATABASE BIOSIS, BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PA, EE. UU., julio de 2014, divulgan determinados bacteriófagos modificados que presentan péptidos contra el cáncer en determinados tratamientos combinados antibacterianos y contra el cáncer (n.º de registro de la base de datos PREV201400683621). Budynek P. *et al.*, ARCHIVES OF MICROBIOLOGY, vol. 192, n.º 5, 16 de marzo de 2010, páginas 315-320, ofrecen una visión general del uso de bacteriófagos en tratamientos contra el cáncer. El documento EP2893933A1 describe bacteriófagos específicos contra *E. coli* y su uso en terapia con fagos.

20

Sumario de la invención

25 La invención se define en el conjunto de reivindicaciones adjunto. La descripción puede contener información técnica adicional, que aunque no forma parte de la invención reivindicada, se proporciona para situar la invención en un contexto técnico más amplio y para ilustrar posibles desarrollos técnicos relacionados.

30 La presente invención proporciona una composición de bacteriófagos que comprende uno o más bacteriófagos líticos obligatorios que infectan y lisan una bacteria cancerígena, en la que cada bacteriófago individual no porta genes de resistencia a antibióticos, y en la que la composición está sustancialmente exenta de componentes bacterianos, en la que:

35 a) el bacteriófago se selecciona entre Ec20 (SEQ ID NO: 1), Ec34 (SEQ ID NO: 2), Ec35 (SEQ ID NO: 3), Ec45 (SEQ ID NO: 4), Ec56 (SEQ ID NO: 5) y Ec57 (SEQ ID NO: 6) y en la que la bacteria diana es *Escherichia coli*, opcionalmente en la que el bacteriófago es Ec34 (SEQ ID NO: 2), Ec35 (SEQ ID NO: 3), Ec45 (SEQ ID NO: 4) y Ec57 (SEQ ID NO: 6) o en la que el bacteriófago es Ec34 (SEQ ID NO: 2), Ec35 (SEQ ID NO: 3) y Ec57 (SEQ ID NO: 6), comprendiendo opcionalmente una proporción de aproximadamente 1:1 de al menos dos de las cepas de bacteriófagos; o

40 b) se selecciona de Bf1 (n.º de registro 040219-02), Bf2 (n.º de registro 040219-03), Bf3 (n.º de registro 040219-04) y Bf4 (n.º de registro 040219-05), y en la que la bacteria diana es *Bacteroides fragilis*, comprendiendo opcionalmente una proporción de aproximadamente 1:1 de al menos dos de las cepas de bacteriófagos.

La presente invención también proporciona una composición de bacteriófagos según la invención para su uso como medicamento.

45 La presente invención también proporciona una composición de bacteriófagos según la invención para su uso en un procedimiento de tratamiento de un cáncer causado por una infección por una bacteria, en la que el cáncer es un cáncer colorrectal causado por una infección por la bacteria *E. coli* y/o la bacteria *B. fragilis*.

La presente invención también proporciona una composición que comprende al menos dos bacteriófagos, para su uso en un procedimiento de tratamiento o prevención de un cáncer, en el que el cáncer es un cáncer colorrectal causado por una infección por la bacteria *E. coli* y/o la bacteria *B. fragilis*, y además en la que los bacteriófagos se dirigen a las bacterias, en la que:

50 a) el bacteriófago se selecciona entre Ec20 (SEQ ID NO: 1), Ec34 (SEQ ID NO: 2), Ec35 (SEQ ID NO: 3), Ec45 (SEQ ID NO: 4), Ec56 (SEQ ID NO: 5) y Ec57 (SEQ ID NO: 6) y en la que la bacteria diana

es *Escherichia coli*, opcionalmente en la que el bacteriófago es Ec34 (SEQ ID NO: 2), Ec35 (SEQ ID NO: 3), Ec45 (SEQ ID NO: 4) y Ec57 (SEQ ID NO: 6) o en la que el bacteriófago es Ec34 (SEQ ID NO: 2), Ec35 (SEQ ID NO: 3) y Ec57 (SEQ ID NO: 6), comprendiendo opcionalmente una proporción de aproximadamente 1:1 de al menos dos de las cepas de bacteriófagos; o

5 b) se selecciona de Bf1 (n.º de registro 040219-02), Bf2 (n.º de registro 040219-03), Bf3 (n.º de registro 040219-04) y Bf4 (n.º de registro 040219-05), y en la que la bacteria diana es *Bacteroides fragilis*, comprendiendo opcionalmente una proporción de aproximadamente 1:1 de al menos dos de las cepas de bacteriófagos. La presente invención también proporciona un kit que comprende:

a. un bacteriófago o composición según la invención; y

10 b. instrucciones de uso de los mismos (por ejemplo, en medicina).

Las referencias a procedimientos de tratamiento por medio de terapia o cirugía que figuran en la presente memoria descriptiva deben interpretarse como referencias a compuestos, composiciones farmacéuticas y medicamentos de la presente invención para su uso en dichos procedimientos.

15 La presente divulgación se refiere a composiciones y a procedimientos para tratar o prevenir un cáncer asociado a bacterias en un paciente mediante la administración de una composición de bacteriófagos. Preferentemente, la composición comprende al menos un bacteriófago dirigido a la bacteria. El bacteriófago o bacteriófagos pueden ser específicos de la bacteria o de una cepa (por ejemplo, una cepa patógena o cancerígena) de la bacteria. Preferentemente, la composición minimiza el desarrollo de resistencia bacteriana, por ejemplo, por complementación. En algunas realizaciones, los bacteriófagos son líticos.

20 En un aspecto de la divulgación, en el presente documento se proporcionan procedimientos para tratar o prevenir un cáncer asociado a bacterias en un paciente que lo necesite. Los procedimientos incluyen la administración al paciente de una composición que incluye uno o más bacteriófagos. En algunas realizaciones, los procedimientos incluyen la selección de un paciente con un cáncer asociado a bacterias confirmado. En algunas realizaciones, los bacteriófagos se dirigen y lisan al menos una especie bacteriana asociada al cáncer. En algunas realizaciones, cada bacteriófago individual no es propenso a la transducción generalizada y/o no porta genes de resistencia a antibióticos. En algunas realizaciones, uno o más de los bacteriófagos no son naturales. Las composiciones descritas en el presente documento han demostrado ser eficaces para lisar bacterias asociadas al cáncer (por ejemplo, *E. coli*, *B. fragilis*). La composición de bacteriófagos puede ser una alternativa a los agentes antibacterianos convencionales y/o a los oncofármacos, y supera uno o más problemas asociados a los mismos. En algunas realizaciones, la composición de bacteriófagos puede utilizarse como cotratamiento o junto con agentes antibacterianos convencionales y/u oncofármacos.

35 En un aspecto de la divulgación, en el presente documento se proporcionan procedimientos para tratar o prevenir el cáncer colorrectal en un paciente que lo necesite. En algunas realizaciones, los procedimientos incluyen la administración al paciente de una composición que incluye uno o más bacteriófagos. En algunas realizaciones, los bacteriófagos se dirigen al menos a una especie bacteriana asociada al cáncer colorrectal. En algunas realizaciones, cada bacteriófago individual no es propenso a la transducción generalizada y/o no porta genes de resistencia a antibióticos. En algunas realizaciones, uno o más de los bacteriófagos no son naturales. Las composiciones descritas en el presente documento han demostrado ser eficaces para lisar bacterias asociadas al cáncer colorrectales (por ejemplo, *E. coli*, *B. fragilis*). La composición de bacteriófagos puede ser una alternativa a los agentes antibacterianos convencionales y/o a los oncofármacos, y supera uno o más problemas asociados a los mismos. En algunas realizaciones, la composición de bacteriófagos puede utilizarse como cotratamiento o junto con agentes antibacterianos convencionales y/u oncofármacos.

45 En un aspecto de la divulgación, en el presente documento se proporcionan procedimientos para modificar la flora microbiana de un ser humano que incluyen la administración a dicho ser humano de una composición que incluye uno o más bacteriófagos distintos con actividad lítica contra bacterias cancerígenas. Dichos uno o más bacteriófagos distintos se seleccionan entre bacteriófagos que infectan a *Escherichia coli*, *Bacteroides fragilis*, *Helicobacter pylori*, *Salmonella typhi*, *Streptococcus bovis*, *Chlamydia pneumonia*, micoplasmas, *Helicobacter hepaticus* y/o *Schistosoma haematobium*. En algunas realizaciones, uno o más de los bacteriófagos no son naturales. En algunas realizaciones, las *E. coli* son portadoras positivas de la isla *pks* (*E. coli pks+*). En algunas realizaciones, los *B. fragilis* son *Bacteroides fragilis* enterotoxigénicos (ETBF). La composición de bacteriófagos puede ser una alternativa a los agentes antibacterianos convencionales y/o a los oncofármacos, y supera uno o más problemas asociados a los mismos. En algunas realizaciones, la composición de bacteriófagos puede utilizarse como cotratamiento o junto con agentes antibacterianos convencionales y/u oncofármacos.

50 En un aspecto, en el presente documento se proporcionan composiciones de bacteriófagos que incluyen uno o más bacteriófagos líticos obligatorios que infectan y lisan bacterias cancerígenas. El bacteriófago se selecciona entre Ec20 (SEQ ID NO: 1), Ec34 (SEQ ID NO: 2), Ec35 (SEQ ID NO: 3), Ec45 (SEQ ID NO: 4), Ec56 (SEQ ID NO: 5) y Ec57 (SEQ ID NO: 6) y la bacteria diana es *Escherichia coli*, opcionalmente en el que el bacteriófago es Ec34 (SEQ ID NO: 2), Ec35 (SEQ ID NO: 3), Ec45 (SEQ ID NO: 4) y Ec57 (SEQ ID NO: 6) o en el que el bacteriófago es Ec34 (SEQ ID

NO: 2), Ec35 (SEQ ID NO: 3) y Ec57 (SEQ ID NO: 6); o se seleccionan de Bf1 (nº de acceso 040219-02), Bf2 (nº de acceso 040219-03), Bf3 (nº de acceso 040219-04) y Bf4 (nº de acceso 040219-05) y la bacteria diana es *Bacteroides fragilis*. En algunas realizaciones, los bacteriófagos tienen un espectro de actividad estrecho contra la bacteria diana. En algunas realizaciones de la invención, la composición está sustancialmente exenta de componentes bacterianos.

5 En algunas realizaciones, cada bacteriófago individual no es propenso a la transducción generalizada. En algunas realizaciones de la invención, el bacteriófago no porta genes de resistencia a antibióticos. En algunas realizaciones, uno o más de los bacteriófagos no son naturales. Las composiciones descritas en el presente documento han demostrado ser eficaces para lisar bacterias asociadas al cáncer. En algunas realizaciones, la especie o cepa bacteriana a la que se dirigen los bacteriófagos segrega una toxina que interfiere en el ciclo celular eucariota. En algunas realizaciones, la toxina es una ciclomodulina. En algunas realizaciones, la ciclomodulina es colibactina, una ciclomodulina sintetizada por la isla genómica pks en *E. coli*. En algunas realizaciones de la divulgación, las bacterias incluyen especies de *Escherichia*, *Bacteroides*, *Salmonella*, *Streptococcus*, *Chlamydia*, micoplasmas, *Helicobacter* y/o *Campylobacter*. En algunas realizaciones de la divulgación, la especie bacteriana es *Escherichia coli*, *Bacteroides fragilis*, *Salmonella typhi*, *Streptococcus bovis*, *Chlamydia pneumonia*, *Helicobacter pylori*, *Helicobacter hepaticus* y/o *Campylobacter jejuni*. En algunas realizaciones de la invención, las bacterias incluyen *E. coli* y/o *B. fragilis*. En algunas realizaciones, las *E. coli* son *E. coli pks+*. En algunas realizaciones, el *B. fragilis* es *Bacteroides fragilis* enterotoxigénico (ETBF). La composición de bacteriófagos puede ser una alternativa a los agentes antibacterianos convencionales y/o a los oncofármacos, y supera uno o más problemas asociados a los mismos. En algunas realizaciones, la composición de bacteriófagos puede utilizarse como cotratamiento o junto con agentes antibacterianos convencionales y/u oncofármacos.

En un aspecto, en el presente documento se proporciona una composición de bacteriófagos que incluye uno o más bacteriófagos dirigidos contra una bacteria cancerígena y un crioprotector. En algunas realizaciones, la composición está sustancialmente exenta de componentes bacterianos. En algunas realizaciones, cada bacteriófago individual no es propenso a la transducción generalizada y/o no porta genes de resistencia a antibióticos. En algunas realizaciones, uno o más de los bacteriófagos no son naturales. Las composiciones descritas en el presente documento han demostrado ser eficaces para lisar bacterias asociadas al cáncer. En algunas realizaciones, la especie o cepa bacteriana a la que se dirigen los bacteriófagos segrega una toxina que interfiere en el ciclo celular eucariota. En algunas realizaciones, la toxina es una ciclomodulina. En algunas realizaciones, la ciclomodulina es colibactina, una ciclomodulina sintetizada por la isla genómica pks en *E. coli*. En algunas realizaciones, las bacterias incluyen especies de *Escherichia*, *Bacteroides*, *Salmonella*, *Streptococcus*, *Chlamydia*, micoplasmas, *Helicobacter* y/o *Campylobacter*. En algunas realizaciones, la especie bacteriana es *Escherichia coli*, *Bacteroides fragilis*, *Salmonella typhi*, *Streptococcus bovis*, *Chlamydia pneumonia*, *Helicobacter pylori*, *Helicobacter hepaticus* y/o *Campylobacter jejuni*. Preferentemente, las bacterias incluyen *E. coli* y/o *B. fragilis*. En algunas realizaciones, las *E. coli* son *E. coli pks+*. En algunas realizaciones, el *B. fragilis* es *Bacteroides fragilis* enterotoxigénico (ETBF). La composición de bacteriófagos puede ser una alternativa a los agentes antibacterianos convencionales y/o a los oncofármacos, y supera uno o más problemas asociados a los mismos. En algunas realizaciones, la composición de bacteriófagos puede utilizarse como cotratamiento o junto con agentes antibacterianos convencionales y/u oncofármacos.

En un aspecto, en el presente documento se proporcionan composiciones de bacteriófagos para su uso en el tratamiento de un cáncer asociado a bacterias en un sujeto. Los procedimientos incluyen la selección de un paciente con un cáncer asociado a bacterias y la administración de una composición de bacteriófagos. En algunas realizaciones, el cáncer puede ser cualquier cáncer causado o asociado a una infección por una bacteria o cepa bacteriana. En algunas realizaciones, el cáncer asociado a bacterias es cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer de vesícula biliar, cáncer de pulmón, carcinoma de células escamosas, cáncer de vejiga, cáncer de estómago o linfoma de tejido linfóide asociado a mucosas ("mucosa-associated lymphoid tissue", MALT). En algunas realizaciones de la invención, el cáncer es un cáncer colorrectal causado por una infección por la bacteria *E. coli* y/o la bacteria *B. fragilis*.

En un aspecto, en el presente documento se proporcionan usos de cualquier composición descrita en el presente documento en el tratamiento de un cáncer asociado a bacterias confirmado. En algunas realizaciones de la invención, el cáncer es un cáncer colorrectal causado por una infección por la bacteria *E. coli* y/o la bacteria *B. fragilis*. Los usos incluyen el tratamiento del cáncer asociado a bacterias que incluye la administración a dicho ser humano de una composición, comprendiendo la composición al menos un bacteriófago que se dirige y lisa una bacteria asociada al cáncer. En algunas realizaciones, la composición está sustancialmente exenta de componentes bacterianos. En algunas realizaciones, cada bacteriófago individual no es propenso a la transducción generalizada y/o no porta genes de resistencia a antibióticos. En algunas realizaciones, uno o más de los bacteriófagos no son naturales. Las composiciones descritas en el presente documento han demostrado ser eficaces para lisar bacterias asociadas al cáncer. En algunas realizaciones, la especie o cepa bacteriana a la que se dirigen los bacteriófagos segrega una toxina que interfiere en el ciclo celular eucariota. En algunas realizaciones, la toxina es una ciclomodulina. En algunas realizaciones, la ciclomodulina es colibactina, una ciclomodulina sintetizada por la isla genómica pks en *E. coli*. En algunas realizaciones, las bacterias incluyen especies de *Escherichia*, *Bacteroides*, *Salmonella*, *Streptococcus*, *Chlamydia*, micoplasmas, *Helicobacter* y/o *Campylobacter*. En algunas realizaciones, la especie bacteriana es *Escherichia coli*, *Bacteroides fragilis*, *Salmonella typhi*, *Streptococcus bovis*, *Chlamydia pneumonia*, *Helicobacter pylori*, *Helicobacter hepaticus* y/o *Campylobacter jejuni*. Preferentemente, las bacterias incluyen *E. coli* y/o *B. fragilis*. En algunas realizaciones, las *E. coli* son *E. coli pks+*. En algunas realizaciones,

el *B. fragilis* es *Bacteroides fragilis* enterotoxigénico (ETBF). La composición de bacteriófagos puede ser una alternativa a los agentes antibacterianos convencionales y/o a los oncofármacos, y supera uno o más problemas asociados a los mismos. En algunas realizaciones, la composición de bacteriófagos puede utilizarse como cotratamiento o junto con agentes antibacterianos convencionales y/u oncofármacos.

- 5 En un aspecto, en el presente documento se proporciona un kit que incluye una composición de bacteriófagos e instrucciones para el uso de la misma.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es un gráfico de la actividad de cuatro fagos diferentes y una mezcla de fagos contra una cepa de *Bacteroides fragilis* (resistente a la clindamicina).

- 10 La figura 2 es un gráfico de la actividad de cuatro fagos diferentes y una mezcla de fagos contra una cepa de *Bacteroides fragilis* (sensible a la clindamicina).

La figura 3 es un gráfico de la actividad de cuatro fagos diferentes y una mezcla de fagos contra una cepa de *Escherichia coli* (*pks+*).

Descripción detallada

- 15 La invención se basa en el sorprendente hallazgo de los presentes inventores de que una composición de bacteriófagos que comprende uno o más (preferentemente al menos dos) bacteriófagos seleccionados de fagos que infectan y lisan bacterias cancerígenas, o mutantes de las mismas, es especialmente ventajosa para su uso en aplicaciones tanto médicas como no médicas, tales como una prueba diagnóstica acompañante rápida, y especialmente para tratar un cáncer asociado a bacterias en un sujeto.

- 20 Debe entenderse que la presente divulgación no se limita a las realizaciones concretas descritas, ya que éstas pueden, por supuesto, variar. También debe entenderse que la terminología usada en el presente documento tiene el propósito de describir realizaciones concretas únicamente y no pretende ser limitante, ya que el alcance de la presente divulgación estará limitado únicamente por las reivindicaciones adjuntas.

- 25 La descripción detallada de la presente divulgación se divide en diferentes secciones únicamente por comodidad para el lector y la divulgación que se encuentra en cualquier sección puede combinarse con la de otra sección. A menos que se definan de otro modo, todos los términos y expresiones técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que entienden habitualmente las personas con conocimientos normales en la técnica a la que pertenece la presente divulgación.

Definiciones

- 30 Debe observarse que, tal como se usa en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un/una" y "el/la" incluyen los referentes en plural, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Así, por ejemplo, la referencia a "una composición de bacteriófagos" incluye una pluralidad de tales agentes candidatos y la referencia al "bacteriófago" incluye la referencia a uno o más bacteriófagos y equivalentes de los mismos, conocidos por los expertos en la técnica, y así sucesivamente.

- 35 Tal como se utiliza en el presente documento, el término "aproximadamente", cuando se utiliza antes de una indicación numérica, por ejemplo, temperatura, tiempo, cantidad, concentración y otros, incluido un intervalo, indica aproximaciones que pueden variar en (+) o (-) 10 %, 5 % o 1 %.

Cuando en el presente documento se enumera un intervalo (por ejemplo, intervalo de dosis), debe entenderse que el valor puede incluir cualquier valor o intervalo dentro del intervalo o intervalos mencionados, incluidos los puntos finales.

- 40 El término "mutante", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un bacteriófago que difiere genéticamente de un bacteriófago concreto en uno o más nucleótidos, pero que conserva la capacidad de infectar y lisar la bacteria diana. Los mutantes suelen comprender, por ejemplo, mutaciones silenciosas, mutaciones conservadoras, pequeñas deleciones y/o pequeñas replicaciones de material genético, y conservan características fenotípicas del bacteriófago de referencia. En una realización preferida, los mutantes conservan cualquier característica o propiedad observable que dependa del genoma del bacteriófago de la invención, es decir, características fenotípicas de dicho bacteriófago y/o actividad contra las cepas bacterianas. Los mutantes preferidos tienen menos del 5 % de variación de ácido nucleico en comparación con el genoma del bacteriófago de referencia, aún más preferentemente menos del 4 %, más preferentemente menos del 2 %. Como alternativa, o en combinación, los mutantes tienen preferentemente menos del 5 % de variación de aminoácidos en una secuencia polipeptídica codificada en comparación con un polipéptido del bacteriófago de referencia.
- 45
- 50

La expresión "porcentaje de identidad" o "porcentaje de identidad de secuencia" en relación con secuencias de ácidos nucleicos o aminoácidos indica el nivel de identidad u homología entre dichas secuencias y puede determinarse mediante técnicas conocidas *per se* en la técnica. Para determinar el porcentaje de identidad puede utilizarse

cualquiera de los diversos procedimientos de alineación de secuencias, incluidos, entre otros, procedimientos globales, procedimientos locales y procedimientos híbridos, tales como los procedimientos de aproximación por segmentos. Los protocolos para determinar el porcentaje de identidad son procedimientos habituales al alcance de un experto en la materia. Los procedimientos globales alinean las secuencias desde el principio hasta el final de la molécula y determinan la mejor alineación sumando las puntuaciones de los pares de nucleótidos individuales e imponiendo penalizaciones por huecos. Algunos procedimientos no limitantes incluyen, por ejemplo, CLUSTAL W, véase, por ejemplo, Julie D. Thompson *et al.*, CLUSTAL W: Improving the Sensitivity of Progressive Multiple Sequence Alignment Through Sequence Weighting, Position- Specific Gap Penalties and Weight Matrix Choice, 22(22), Nucleic Acids Research, 4673-4680 (1994); y refinamiento iterativo. Algunos procedimientos no limitantes incluyen, por ejemplo, BLAST, Match-box, véase, por ejemplo, Align-M, véase, por ejemplo, Ivo Van Walle *et al.*, Align-M - A New Algorithm for Multiple Alignment of Highly Divergent Sequences, 20(9), Bioinformatics, 1428-1435 (2004).

El término "complementación", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a la capacidad de un bacteriófago con un genoma concreto para compensar a otro bacteriófago distinto con un genoma diferente. Más concretamente, pueden surgir colonias mutantes (de bacterias diana) insensibles a un bacteriófago en concreto, pero pueden seguir siendo sensibles a otro bacteriófago diferente. En otras palabras, las bacterias mutantes resistentes a un bacteriófago siguen siendo sensibles a otro fago.

La expresión "transducción generalizada", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere al proceso por el cual el ADN bacteriano puede transferirse a otra bacteria a través de un bacteriófago. Se trata de un acontecimiento poco frecuente; un porcentaje muy pequeño de partículas de fago transporta el ADN de una bacteria donante, del orden de 1 fago de cada 10 000. En esencia, se trata de la encapsidación del ADN bacteriano en una cápside vírica.

El término "lítico" o la expresión "actividad lítica" indica la propiedad de un bacteriófago de provocar la lisis de una célula bacteriana. La actividad lítica de un bacteriófago puede ensayarse en bacterias (por ejemplo, cepas de *E. coli*) según técnicas conocidas en la técnica. El ciclo lítico se denomina así por el proceso que tiene lugar cuando un fago ha infectado una célula, ha replicado nuevas partículas de fago y rompe la pared y la membrana o membranas de la célula hospedadora para salir al entorno. Algunos fagos presentan un ciclo lisogénico durante el cual el ADN del bacteriófago permanece prácticamente inactivo debido a la represión activa de los procesos del bacteriófago. Cada vez que la bacteria se divide, el ADN del fago también se copia. De este modo, el virus puede seguir existiendo dentro de su hospedador sin lisarlo. En un momento dado, las condiciones pueden cambiar y el fago entra en un ciclo lítico. La expresión "obligatoriamente lítico" hace referencia a los fagos que no pueden someterse a un ciclo lisogénico.

Algunos ejemplos no limitantes de bacteriófagos de *E. coli* incluyen EC200pp (Bolocan *et al.*, FEMS Microbiology Letters, vol. 363, n.º 22, 1 de noviembre de 2016), LM33-P1 (Dufour *et al.*, J. Antimicrobial Chemotherapy, vol. 71, n.º 11, 1 de noviembre de 2016, págs. 3072-3080), 536_P1 (Dufour *et al.*, Clinical Infectious Diseases, vol. 64, n.º 11, junio de 2017, págs. 1589-1590), 536_P7 (Dufour *et al.*, Critical Care Medicine, 43(6):e190-e198, junio de 2015), T4, Lambda Argo2, Lambda Argo 1, T3, P1, PR722, Ox6, Lambda W60, rEDb44, r1589, T6, rA105, r71, UV1, 49B, BG3, 53 alfa, rEDb50, 221, Phi X174, 184, rH23, r638, r187, rJ3, rED220, FCZ, r196, rEDb45, rH88, 547, C204, 24B, 6C, rEDa41, UV47, G178, C33, T2 y T1 (colección ATCC). Algunos ejemplos no limitantes de bacteriófagos de *Bacteroides fragilis* incluyen B40-8 (RefSeq: NC_011222), B124-14 (RefSeq: NC_016770), 51477-B1 (ATCC.org). Algunos ejemplos no limitantes de bacteriófagos de *Salmonella typhi* incluyen phSE-1, phSE-2, phSE-5 (Pereira *et al.*, Virus Res., 15 de julio de 2016, 220:179-92). Algunos ejemplos no limitantes de bacteriófagos de *Streptococcus bovis* incluyen los fagos aislados y caracterizados por Iverson *et al.* (Iverson *et al.*, Canadian Journal of Microbiology, 1976, 22(6):847-852). Algunos ejemplos no limitantes de bacteriófagos de *Chlamydia pneumoniae* incluyen ϕ CPAR39 (Hoestgaard-Jensen *et al.*, FEMS Immunology & Medical Microbiology, vol. 62, n.º 2, 1 de julio de 2011, págs. 148-156). Algunos ejemplos no limitantes de bacteriófagos de *Helicobacter* incluyen KHP30 (Uchiyama *et al.*, Appl. Environ. Microbiol., abril de 2013, 79(10) 3176-3184), HP1 (Heintschel *et al.*, J. Med. Microbiol., 1 de abril de 1993, 38:245-249), 1961P (Luo *et al.*, Journal of Virology, julio de 2012, 86 (16), 8781-8792). Algunos ejemplos no limitantes de bacteriófagos de *Campylobacter jejuni* incluyen CP8 y CP34 (Loc Carrillo *et al.*, Appl. Environ. Microbiol., noviembre de 2005, 71(11), 6554-6563), c/958 (Ritchie *et al.*, J. Med. Microbiol., vol. 16, 1983, 333-340), los fagos 1-14 identificados por Grajewski *et al.* (Grajewski *et al.*, Journal of Clinical Microbiology, julio de 1985, págs. 13-18). En algunas realizaciones, las composiciones y los procedimientos proporcionados en el presente documento excluyen uno o más bacteriófagos descritos en el presente documento.

El término "tratar" o "tratamiento", tal como se utiliza en el presente documento, pretende abarcar tanto el tratamiento profiláctico como el tratamiento correctivo (tratamiento de un sujeto que ya padece una enfermedad). Tratar también puede referirse a tratar uno o más síntomas de una enfermedad o trastorno, así como a ralentizar o detener la progresión de la enfermedad o trastorno.

El término "prevenir" o "prevención", tal como se utiliza en el presente documento, pretende abarcar la prevención de una enfermedad o trastorno (por ejemplo, cáncer) en un paciente o población de pacientes, así como la reducción de la aparición de la enfermedad o trastorno, la ralentización o prolongación de la aparición de la enfermedad o trastorno, y similares.

Las expresiones "cáncer asociado a bacterias", "bacterias cancerígenas" y "bacterias tumorigénicas" se refieren a organismos infecciosos que se sabe o se sospecha que causan cáncer. Aunque se ha considerado que las bacterias

asociadas al cáncer son oportunistas (es decir, infectan tejidos sanos después de que el cáncer ya se ha establecido), existen pruebas de que las bacterias pueden ser directamente cancerígenas. Las infecciones por *Helicobacter pylori* y *Salmonella typhi* demuestran la compleja relación entre las bacterias y el ser humano. Las investigaciones han demostrado que *H. pylori* puede causar cáncer gástrico o linfoma MALT en algunos individuos. La infección por *Salmonella typhi* se ha asociado al desarrollo de cáncer de vesícula biliar. Sin embargo, muchas especies comparten una característica importante: una colonización muy específica del emplazamiento.

Un uso o procedimiento de la invención suele comprender la administración de una composición de bacteriófagos descrita en el presente documento a un sujeto o paciente. Tal como se utiliza en el presente documento, un "sujeto" o "paciente" es un mamífero, tal como un ser humano u otro animal. Preferentemente, el sujeto o paciente es un ser humano. Preferentemente, el sujeto o paciente necesita tratamiento con la composición descrita en el presente documento, por ejemplo, tiene una infección bacteriana susceptible de tratamiento con la composición.

El término "aislado", tal como se utiliza en el presente documento, indica que el bacteriófago se retira del entorno en el que se produce de forma natural. En concreto, un bacteriófago aislado, por ejemplo, se cultiva separado del entorno en el que se encuentra de forma natural. Algunos aspectos del presente documento se refieren a bacteriófagos aislados (individual y/o colectivamente), composiciones de los mismos y procedimientos de uso de los mismos para tratar cánceres asociados a bacterias. Los bacteriófagos aislados incluyen, entre otros, los descritos y enumerados específicamente en el presente documento.

El término "purificado", tal como se utiliza en el presente documento, indica que los bacteriófagos se separan de las bacterias hospedadoras que los producen. En concreto, a un bacteriófago purificado se le han retirado las impurezas de la producción, tales como componentes bacterianos, de su entorno de fabricación o producción. Los componentes bacterianos incluyen, entre otros, proteínas del hospedador bacteriano, lípidos y/o endotoxinas bacterianas. El término "purificado" también puede referirse a la purificación genética, en la que la cepa de bacteriófago es genéticamente homogénea. Algunos aspectos del presente documento se refieren a bacteriófagos purificados (individual y/o colectivamente), composiciones de los mismos y procedimientos de uso de los mismos para tratar cánceres asociados a bacterias. Los bacteriófagos purificados incluyen, entre otros, los descritos y enumerados específicamente en el presente documento.

Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "sustancialmente purificada" se refiere a una composición que contiene menos del 1 %, menos del 0,1 %, menos del 0,001 % o ninguna cantidad detectable de contaminantes, tales como proteínas o endotoxinas de hospedador bacteriano. Además, tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "sustancialmente pura", cuando se utiliza para describir una cepa de bacteriófago, se refiere a la pureza genética de la composición, de tal manera que la secuencia consenso de cada fago dentro de la composición tiene una identidad superior al 99 %, superior al 99,9 %, superior al 99,999 % o es un 100 % idéntica a la secuencia de ácido nucleico esperada para ese fago. Algunos aspectos del presente documento se refieren a bacteriófagos sustancialmente purificados (individual y/o colectivamente), composiciones de los mismos y procedimientos de uso de los mismos para tratar cánceres asociados a bacterias. Los bacteriófagos sustancialmente purificados incluyen, entre otros, los descritos y enumerados específicamente en el presente documento.

Generalmente, una composición es sustancialmente pura cuando al menos el 80 %, más preferentemente al menos el 85 %, más preferentemente al menos el 90 %, más preferentemente al menos el 95 %, más preferentemente al menos el 98 % y lo más preferentemente al menos el 99 % del material total (por volumen, por peso húmedo o seco, o por porcentaje molar o fracción molar) en una muestra está exenta de impurezas y/o variantes genéticas.

La expresión "sustancialmente exento", tal como se utiliza en el presente documento, puede referirse a una entidad que tiene menos del 10 % de la sustancia de la que debe estar exenta, por ejemplo, del 0,01 % al 10 % exento, incluido cualquier subvalor y subintervalo de los mismos, incluidos los puntos finales, por ejemplo, 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9 o 10 %.

Una "cantidad sinérgica", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a la suma de una primera cantidad (por ejemplo, un bacteriófago) y una segunda cantidad (por ejemplo, un bacteriófago diferente) que da lugar a un efecto sinérgico (es decir, un efecto mayor que un efecto aditivo). Por lo tanto, los términos "sinergia", "sinergismo" y "sinérgico" y las expresiones "cantidad sinérgica combinada" y "efecto terapéutico sinérgico", que se utilizan indistintamente en el presente documento, se refieren a un efecto medido del compuesto administrado en combinación, en el que el efecto medido es mayor que la suma de los efectos individuales de cada uno de los compuestos proporcionados en el presente documento administrados solos como agente único.

La expresión "consiste fundamentalmente en", tal como se utiliza en el presente documento, significa que sólo el bacteriófago o los bacteriófagos indicados explícitamente están presentes en la composición de bacteriófagos, pero que dicha composición también puede contener otro componente no bacteriófago, tal como un portador, diluyente, antibiótico (por ejemplo, antibiótico químico), etc., adecuados.

A continuación, se definen otros términos y expresiones.

Composiciones de bacteriófagos

En el presente documento se proporcionan composiciones de bacteriófagos, incluidas composiciones que están sustancialmente exentas de componentes bacterianos tales como, por ejemplo, endotoxinas bacterianas, proteínas del hospedador bacteriana y similares. Las composiciones incluyen uno o más bacteriófagos obligatoriamente líticos y, opcionalmente, un crioprotector. En algunas realizaciones de la invención, el bacteriófago se selecciona entre Ec20 (SEQ ID NO: 1), Ec34 (SEQ ID NO: 2), Ec35 (SEQ ID NO: 3), Ec45 (SEQ ID NO: 4), Ec56 (SEQ ID NO: 5) y Ec57 (SEQ ID NO: 6) y la bacteria diana es *Escherichia coli*, opcionalmente en el que el bacteriófago es Ec34 (SEQ ID NO: 2), Ec35 (SEQ ID NO: 3), Ec45 (SEQ ID NO: 4) y Ec57 (SEQ ID NO: 6) o en el que el bacteriófago es Ec34 (SEQ ID NO: 2), Ec35 (SEQ ID NO: 3) y Ec57 (SEQ ID NO: 6), y comprende opcionalmente una proporción de aproximadamente 1:1 de al menos dos de las cepas de bacteriófagos; o se seleccionan de Bf1 (n.º de registro 040219-02), Bf2 (n.º de registro 040219-03), Bf3 (n.º de registro 040219-04) y Bf4 (n.º de registro 040219-05) y la bacteria diana es *Bacteroides fragilis*, y comprende opcionalmente una proporción de aproximadamente 1:1 de al menos dos de las cepas de bacteriófagos. En algunas realizaciones de la divulgación, el bacteriófago puede ser cualquier fago descrito en el presente documento, y puede incluir al menos un fago con una secuencia de ácido nucleico o un genoma que incluya una secuencia de nucleótidos que tenga al menos un 90 % de identidad con una cualquiera de las SEQ ID NO: 1-6. En las realizaciones de la divulgación, el bacteriófago puede ser cualquier fago descrito en el presente documento, y puede incluir al menos un fago con una secuencia de ácido nucleico o un genoma que incluya una secuencia de nucleótidos que tenga al menos un 90 % de identidad con la secuencia genómica de la cepa depositada Bf1 (n.º de registro 040219-02), Bf2 (n.º de registro 040219-03), Bf3 (n.º de registro 040219-04) y/o Bf4 (n.º de registro 040219-05) depositada en el Centro Científico Canadiense para la Salud Humana y Animal. En algunos aspectos de la divulgación, al menos uno de los bacteriófagos no tiene un 100 % de identidad con una o más de las SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6. En algunos aspectos de la divulgación, al menos uno de los bacteriófagos no tiene una identidad del 100 % con una o más de las secuencias genómicas de las cepas depositadas Bf1 (n.º de registro 040219-02), Bf2 (n.º de registro 040219-03), Bf3 (n.º de registro 040219-04) y/o Bf4 (n.º de registro 040219-05) depositadas en el Centro Científico Canadiense para la Salud Humana y Animal (Depósito Internacional de Canadá). En algunos aspectos, uno o más de los bacteriófagos son de origen no natural. En algunos aspectos, un bacteriófago individual no es propenso a la transducción generalizada. En algunas realizaciones de la invención, el bacteriófago no porta genes de resistencia a antibióticos. En algunas realizaciones, las composiciones y los procedimientos proporcionados en el presente documento excluyen uno o más bacteriófagos descritos en el presente documento.

Se proporcionan composiciones de bacteriófagos que incluyen uno o más bacteriófagos que infectan y lisan bacterias cancerígenas. En algunas realizaciones, el bacteriófago tiene un espectro de acción estrecho contra la bacteria diana. En algunas realizaciones, uno o más de los bacteriófagos no son naturales. En algunas realizaciones, la composición está sustancialmente exenta de componentes bacterianos. En algunas realizaciones, cada bacteriófago individual no es propenso a la transducción generalizada y/o no porta genes de resistencia a antibióticos.

En algunas realizaciones de la divulgación, el bacteriófago difiere en secuencia nucleotídica o genómica hasta aproximadamente un 15 %, hasta aproximadamente un 14 %, hasta aproximadamente un 13 %, hasta aproximadamente un 12 %, hasta aproximadamente un 11 %, hasta aproximadamente un 10 %, hasta aproximadamente un 9 %, hasta aproximadamente un 8 %, hasta aproximadamente un 7 %, hasta aproximadamente un 6 %, hasta aproximadamente un 5 %, hasta aproximadamente un 4 %, hasta aproximadamente un 3 %, hasta aproximadamente un 2 % o hasta aproximadamente un 1 % en comparación con la secuencia genómica del fago Ec20 de *E. coli* (SEQ ID NO: 1), Ec34 (SEQ ID NO: 2), Ec35 (SEQ ID NO: 3), Ec45 (SEQ ID NO: 4), Ec56 (SEQ ID NO: 5) y/o Ec57 (SEQ ID NO: 6). En algunas realizaciones, el bacteriófago difiere en la secuencia nucleotídica o genómica en hasta aproximadamente un 15 %, hasta aproximadamente un 14 %, hasta aproximadamente un 13 %, hasta aproximadamente un 12 %, hasta aproximadamente un 11 %, hasta aproximadamente un 10 %, hasta aproximadamente un 9 %, hasta aproximadamente un 8 %, hasta aproximadamente un 7 %, hasta aproximadamente un 6 %, hasta aproximadamente un 5 %, hasta aproximadamente un 4 %, hasta aproximadamente un 3 %, hasta aproximadamente un 2 %, o hasta aproximadamente un 1 % en comparación con la secuencia genómica del fago Bf1 (n.º de registro 040219-02), Bf2 (n.º de registro 040219-03), Bf3 (n.º de registro 040219-04), y/o Bf4 (n.º de registro 040219-05) de *B. fragilis*, depositados en el Centro Científico Canadiense para la Salud Humana y Animal (Depósito Internacional de Canadá).

Las composiciones descritas en el presente documento han demostrado ser especialmente útiles en el tratamiento de infecciones bacterianas, en concreto bacterias asociadas al cáncer. En el presente documento, las expresiones "bacterias oncogénicas", "bacterias tumorigénicas" y "bacterias asociadas al cáncer" son intercambiables. En algunas realizaciones, los bacteriófagos se dirigen con precisión a las bacterias tumorigénicas sin destruir ampliamente la microbiota (por ejemplo, otras bacterias y/o microbios) presentes en el paciente. En algunas realizaciones, los bacteriófagos son específicos para bacterias tumorigénicas y no se dirigen a otros microorganismos.

En algunas realizaciones de la divulgación, las bacterias incluyen *Escherichia coli*, especies de *Bacteroides* (por ejemplo, *Bacteroides fragilis*), *Salmonella typhi*, *Streptococcus bovis*, *Chlamydia pneumonia*, micoplasmas, especies de *Helicobacter* (por ejemplo, *Helicobacter pylori*, *Helicobacter hepaticus*) y/o *Campylobacter jejuni*. En algunas realizaciones de la invención, las bacterias incluyen *E. coli* y/o *B. fragilis*. En algunas realizaciones, las *E. coli* son *E. coli pks+*. En algunas realizaciones, los *B. fragilis* son *Bacteroides fragilis* enterotoxigénicos (ETBF). En una realización, el *B. fragilis* es una cepa resistente a la clindamicina. En una realización, el *B. fragilis* es una cepa sensible

a la clindamicina. En algunas realizaciones, la especie o cepa bacteriana a la que se dirigen los bacteriófagos segrega una toxina que interfiere en el ciclo celular eucariota. En algunas realizaciones, la toxina es una ciclomodulina. En algunas realizaciones, la ciclomodulina es la colibactina, una ciclomodulina sintetizada por la isla genómica pks en *E. coli*.

5 En algunas realizaciones, la composición de bacteriófagos incluye al menos uno, al menos dos, al menos tres o al menos cuatro bacteriófagos, de tal manera que la composición sea eficaz contra al menos aproximadamente el 60 % de las cepas bacterianas diana. Por ejemplo, la composición de bacteriófagos es eficaz (por ejemplo, mata o lisa) contra al menos el 60 % de las cepas de *E. coli* y/o *B. fragilis* en un panel dado. En una realización, la composición de bacteriófagos incluye al menos uno, al menos dos, al menos tres o al menos cuatro bacteriófagos, de modo que la composición sea eficaz contra al menos aproximadamente el 70 % de las cepas bacterianas diana. En una realización, la composición de bacteriófagos incluye al menos uno, al menos dos, al menos tres o al menos cuatro bacteriófagos, de modo que la composición sea eficaz contra al menos aproximadamente el 75 % de las cepas bacterianas diana. En una realización, la composición de bacteriófagos incluye al menos uno, al menos dos, al menos tres o al menos cuatro bacteriófagos, de modo que la composición sea eficaz contra al menos aproximadamente el 76 % de las cepas bacterianas diana. En una realización, la composición de bacteriófagos incluye al menos uno, al menos dos, al menos tres o al menos cuatro bacteriófagos, de modo que la composición sea eficaz contra al menos aproximadamente el 77 % de las cepas bacterianas diana. En una realización, la composición de bacteriófagos comprende al menos uno, al menos dos, al menos tres o al menos cuatro bacteriófagos, de modo que la composición sea eficaz contra al menos aproximadamente el 78 % de las cepas bacterianas diana. En una realización, la composición de bacteriófagos incluye al menos uno, al menos dos, al menos tres o al menos cuatro bacteriófagos, de modo que la composición sea eficaz contra al menos aproximadamente el 79 % de las cepas bacterianas diana. En una realización, la composición de bacteriófagos incluye al menos uno, al menos dos, al menos tres o al menos cuatro bacteriófagos, de modo que la composición sea eficaz contra al menos aproximadamente el 80 % de las cepas bacterianas diana. En una realización, la composición de bacteriófagos incluye al menos uno, al menos dos, al menos tres o al menos cuatro bacteriófagos, de modo que la composición sea eficaz contra al menos aproximadamente el 81 % de las cepas bacterianas diana. En una realización, la composición de bacteriófagos incluye al menos uno, al menos dos, al menos tres o al menos cuatro bacteriófagos, de modo que la composición sea eficaz contra al menos aproximadamente el 82 % de las cepas bacterianas diana. En una realización, la composición de bacteriófagos incluye al menos uno, al menos dos, al menos tres o al menos cuatro bacteriófagos, de modo que la composición sea eficaz contra al menos aproximadamente el 83 % de las cepas bacterianas diana. En una realización, la composición de bacteriófagos incluye al menos uno, al menos dos, al menos tres o al menos cuatro bacteriófagos, de modo que la composición sea eficaz contra al menos aproximadamente el 84 % de las cepas bacterianas diana. En una realización, la composición de bacteriófagos incluye al menos uno, al menos dos, al menos tres o al menos cuatro bacteriófagos, de modo que la composición sea eficaz contra al menos aproximadamente el 85 % de las cepas bacterianas diana. En una realización, la composición de bacteriófagos incluye al menos uno, al menos dos, al menos tres o al menos cuatro bacteriófagos, de modo que la composición sea eficaz contra al menos aproximadamente el 90 % de las cepas bacterianas diana. En otra realización, la composición de bacteriófagos incluye al menos uno, al menos dos, al menos tres, o al menos cuatro bacteriófagos, de modo que la composición sea eficaz contra una o más cepas bacterianas (o aislados) de un sujeto con una infección bacteriana.

40 En algunas realizaciones, las bacterias o cepas de bacterias a las que se dirigen los bacteriófagos están asociadas al cáncer. En algunas realizaciones, la especie o cepa bacteriana a la que se dirigen los bacteriófagos segrega una toxina que interfiere en el ciclo celular eucariota. En algunas realizaciones, la toxina es una ciclomodulina. En algunas realizaciones, la ciclomodulina es colibactina, una ciclomodulina sintetizada por la isla genómica pks en *E. coli*. En algunas realizaciones de la divulgación, las bacterias incluyen *Escherichia coli*, especies de *Bacteroides* (por ejemplo, *Bacteroides fragilis*), *Salmonella typhi*, *Streptococcus bovis*, *Chlamydia pneumonia*, micoplasmas, especies de *Helicobacter* (por ejemplo, *Helicobacter pylori*, *Helicobacter hepaticus*) y/o *Campylobacter jejuni*. En algunas realizaciones de la invención, las bacterias incluyen *E. coli* y/o *B. fragilis*. En algunas realizaciones, las *E. coli* son *E. coli pks+*. En algunas realizaciones, los *B. fragilis* son *Bacteroides fragilis* enterotoxigénicos (ETBF). En una realización, el *B. fragilis* es una cepa resistente a la clindamicina. En una realización, el *B. fragilis* es una cepa sensible a la clindamicina.

50 En algunas realizaciones, las composiciones de bacteriófagos comprenden al menos un bacteriófago dirigido a una bacteria o cepa bacteriana oncogénica, o mutantes de dichos bacteriófagos. En una realización, una composición de bacteriófagos comprende al menos dos bacteriófagos o mutantes de los mismos. En una realización, una composición de bacteriófagos comprende al menos tres bacteriófagos o mutantes de los mismos. En una realización, la composición de bacteriófagos comprende uno o más bacteriófagos adicionales, por ejemplo, uno o más bacteriófagos adicionales dirigidos a una bacteria o cepa bacteriana diferente. En una realización preferida, dichos uno o más bacteriófagos adicionales son adecuados para tratar una infección bacteriana oncogénica.

Los bacteriófagos pueden ser de cualquier tipo que sean capaces de infectar/dirigirse a la cepa o especie bacteriana diana. En algunas realizaciones, los bacteriófagos son capaces de lisar la especie o cepa bacteriana diana.

60 En algunas realizaciones (como alternativa, o además), un bacteriófago "mutante" es capaz de lisar las mismas cepas bacterianas diana que el bacteriófago original, y además capaz de lisar una o más cepas bacterianas adicionales. En

una realización, un mutante puede tener al menos un 75 %, un 80 %, un 85 %, un 86 %, un 87 %, un 88 %, un 89 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 % o un 99 % de identidad de secuencia en todo su genoma en comparación con el bacteriófago original.

5 En algunas realizaciones, la composición de bacteriófagos se dirige a una o más especies de *Escherichia*. En algunas realizaciones, la composición de bacteriófagos se dirige a una o más cepas de *E. coli* (por ejemplo, una o más cepas oncogénicas de *E. coli*). En una realización, la cepa de *E. coli* diana es una cepa productora de colibactina. En una realización, la cepa de *E. coli* diana es una cepa de *E. coli pks+*. Véase, por ejemplo, Dejea *et al.*, *Science*, 359, 592-597 (2018). En algunas realizaciones de la invención, el bacteriófago se selecciona entre Ec20 (SEQ ID NO: 1), Ec34 (SEQ ID NO: 2), Ec35 (SEQ ID NO: 3), Ec45 (SEQ ID NO: 4), Ec56 (SEQ ID NO: 5) y Ec57 (SEQ ID NO: 6) y la bacteria diana es *Escherichia coli*, opcionalmente en el que el bacteriófago es Ec34 (SEQ ID NO: 2), Ec35 (SEQ ID NO: 3), Ec45 (SEQ ID NO: 4) y Ec57 (SEQ ID NO: 6) o en el que el bacteriófago es Ec34 (SEQ ID NO: 2), Ec35 (SEQ ID NO: 3) y Ec57 (SEQ ID NO: 6), y comprende opcionalmente una proporción de aproximadamente 1:1 de al menos dos de las cepas de bacteriófagos. En algunas realizaciones, la composición incluye uno o más bacteriófagos seleccionados entre Ec20, Ec34, Ec35, Ec45, Ec56 y Ec57. En algunas realizaciones, la composición incluye dos bacteriófagos seleccionados entre Ec20, Ec34, Ec35, Ec45, Ec56 y Ec57. En algunas realizaciones, la composición incluye tres bacteriófagos seleccionados entre Ec20, Ec34, Ec35, Ec45, Ec56 y Ec57. En algunas realizaciones, la composición incluye cuatro bacteriófagos seleccionados entre Ec20, Ec34, Ec35, Ec45, Ec56 y Ec57. En algunas realizaciones, la composición incluye cinco bacteriófagos seleccionados entre Ec20, Ec34, Ec35, Ec45, Ec56 y Ec57. En algunas realizaciones, la composición incluye seis bacteriófagos seleccionados entre Ec20, Ec34, Ec35, Ec45, Ec56 y Ec57. En una realización, los bacteriófagos son Ec34 (n.º de registro 040219-07), Ec35 (n.º de registro 040219-08), Ec45 (n.º de registro 040219-09) y Ec57 (n.º de registro 040219-10) depositados en el Centro Científico Canadiense para la Salud Humana y Animal (Depósito Internacional de Canadá). En una realización, los bacteriófagos son Ec34 (n.º de registro 040219-07), Ec35 (n.º de registro 040219-08) y Ec57 (n.º de registro 040219-10) depositados en el Centro Científico Canadiense para la Salud Humana y Animal (Depósito Internacional de Canadá). En algunas realizaciones, las composiciones proporcionadas en el presente documento excluyen uno o más bacteriófagos descritos en el presente documento.

En algunas realizaciones, la composición de bacteriófagos se dirige a una o más especies de *Bacteroides*. En algunas realizaciones, la composición de bacteriófagos se dirige a una o más cepas de *B. fragilis* (por ejemplo, una o más cepas oncogénicas de *B. fragilis*). En una realización, la cepa de *B. fragilis* diana es una cepa de *Bacteroides fragilis* productora de toxina (bft). En una realización, la cepa de *Bacteroides fragilis* diana es una cepa de *Bacteroides fragilis* enterotoxigénica (ETBF). En una realización, el *B. fragilis* es una cepa resistente a la clindamicina. En una realización, el *B. fragilis* es una cepa sensible a la clindamicina. En algunas realizaciones, en el presente documento se proporcionan bacteriófagos que se sabe que se dirigen a *Bacteroides fragilis*, incluidos Bf1 (n.º de registro 040219-02), Bf2 (n.º de registro 040219-03), Bf3 (n.º de registro 040219-04) y/o Bf4 (n.º de registro 040219-05) depositados en el Centro Científico Canadiense para la Salud Humana y Animal (Depósito Internacional de Canadá). En algunas realizaciones de la invención, el bacteriófago se selecciona entre Bf1 (n.º de registro 040219-02), Bf2 (n.º de registro 040219-03), Bf3 (n.º de registro 040219-04) y Bf4 (n.º de registro 040219-05) y en el que la bacteria diana es *Bacteroides fragilis*, y comprende opcionalmente una proporción de aproximadamente 1:1 de al menos dos de las cepas de bacteriófagos. En algunas realizaciones, la composición incluye uno o más bacteriófagos seleccionados entre Bf1, Bf2, Bf3 y Bf4. En algunas realizaciones, la composición incluye dos bacteriófagos seleccionados entre Bf1, Bf2, Bf3 y Bf4. En algunas realizaciones, la composición incluye tres bacteriófagos seleccionados entre Bf1, Bf2, Bf3 y Bf4. En algunas realizaciones, la composición incluye los bacteriófagos Bf1, Bf2, Bf3 y Bf4. En algunas realizaciones, las composiciones proporcionadas en el presente documento excluyen uno o más bacteriófagos descritos en el presente documento.

45 En una realización de la divulgación, la composición de bacteriófagos se dirige a una o más especies de *Salmonella*. En una realización, la composición de bacteriófagos se dirige a una o más cepas de *Salmonella typhi*. En algunas realizaciones, en el presente documento se proporcionan bacteriófagos que se sabe que se dirigen a *Salmonella typhi*, incluidos los bacteriófagos phSE-1, phSE-2 y phSE-5. En algunas realizaciones, las composiciones proporcionadas en el presente documento excluyen uno o más bacteriófagos descritos en el presente documento.

50 En algunas realizaciones de la divulgación, la composición de bacteriófagos se dirige a una o más especies de *Streptococcus*. En algunas realizaciones, la composición de bacteriófagos se dirige a una o más cepas de *Streptococcus bovis*. En algunas realizaciones, en el presente documento se proporcionan bacteriófagos que se sabe que se dirigen a *Streptococcus bovis*, incluidos los fagos aislados y caracterizados por Iverson *et al.* (Iverson *et al.*, *Canadian Journal of Microbiology*, 1976, 22(6):847-852). En algunas realizaciones, las composiciones proporcionadas en el presente documento excluyen uno o más bacteriófagos descritos en el presente documento.

60 En algunas realizaciones de la divulgación, la composición de bacteriófagos se dirige a una o más especies de *Chlamydia*. En una realización, la composición de bacteriófagos se dirige a una o más cepas de *Chlamydia pneumonia*. En otras realizaciones, en el presente documento se proporcionan bacteriófagos que se sabe que se dirigen a *Chlamydia pneumonia*, incluido el bacteriófago ϕ CPAR39. En algunas realizaciones, las composiciones proporcionadas en el presente documento excluyen uno o más bacteriófagos descritos en el presente documento.

- En algunas realizaciones de la divulgación, la composición de bacteriófagos se dirige a una o más especies de micoplasmas, por ejemplo, *M. hominis*, *M. genitalium*, *M. fermentans*, *M. pneumoniae* y *M. mycoides*. En algunas realizaciones, la composición de bacteriófagos se dirige a una o más cepas de micoplasmas. En algunas realizaciones, en el presente documento se proporcionan bacteriófagos conocidos por dirigirse a micoplasmas, incluidos los bacteriófagos phiMFV1 y MAV1. En algunas realizaciones, las composiciones proporcionadas en el presente documento excluyen uno o más bacteriófagos descritos en el presente documento.
- En algunas realizaciones de la divulgación, la composición de bacteriófagos se dirige a una o más especies de *Helicobacter* (por ejemplo, *Helicobacter pylori*, *Helicobacter hepaticus*). En algunas realizaciones, la composición de bacteriófagos se dirige a una o más cepas de *Helicobacter pylori*. En algunas realizaciones, la composición de bacteriófagos se dirige a una o más cepas de *Helicobacter hepaticus*. En algunas realizaciones, en el presente documento se proporcionan bacteriófagos conocidos por dirigirse a *Helicobacter*, incluidos los bacteriófagos KHP30, HP1 y 1961P. En algunas realizaciones, las composiciones proporcionadas en el presente documento excluyen uno o más bacteriófagos descritos en el presente documento.
- En algunas realizaciones de la divulgación, la composición de bacteriófagos se dirige a una o más especies de *Campylobacter*. En algunas realizaciones, la composición de bacteriófagos se dirige a una o más cepas de *Campylobacter jejuni*. En algunas realizaciones, en el presente documento se proporcionan bacteriófagos que se sabe que se dirigen a *Campylobacter jejuni*, incluidos los bacteriófagos CP8, CP34 y c/958. En algunas realizaciones, las composiciones proporcionadas en el presente documento excluyen uno o más bacteriófagos descritos en el presente documento.
- Los bacteriófagos Ec34 (n.º de registro 040219-07), Ec35 (n.º de registro 040219-08), Ec45 (n.º de registro 040219-09) y Ec57 (n.º de registro 040219-10) se depositaron en el Centro Científico Canadiense para la Salud Humana y Animal (Depósito Internacional de Canadá). Todos los depósitos se realizaron en virtud de las disposiciones del Tratado de Budapest sobre el reconocimiento internacional del depósito de microorganismos dirigido al procedimiento en materia de patentes.
- Los bacteriófagos Bf1 (n.º de registro 040219-02), Bf2 (n.º de registro 040219-03), Bf3 (n.º de registro 040219-04), y/o Bf4 (n.º de registro 040219-05) se depositaron en el Centro Científico Canadiense para la Salud Humana y Animal (Depósito Internacional de Canadá). Todos los depósitos se realizaron en virtud de las disposiciones del Tratado de Budapest sobre el reconocimiento internacional del depósito de microorganismos dirigido al procedimiento en materia de patentes.
- En algunas realizaciones, las composiciones proporcionadas en el presente documento incluyen uno o más bacteriófagos seleccionados de Ec20, Ec34, Ec35, Ec45, Ec56, Ec57, Bf1, Bf2, Bf3 y Bf4. En algunas realizaciones, la composición incluye dos bacteriófagos seleccionados de Ec20, Ec34, Ec35, Ec45, Ec56, Ec57, Bf1, Bf2, Bf3 y Bf4. En algunas realizaciones, la composición incluye tres bacteriófagos seleccionados de Ec20, Ec34, Ec35, Ec45, Ec56, Ec57, Bf1, Bf2, Bf3 y Bf4. En algunas realizaciones, la composición incluye cuatro bacteriófagos seleccionados de Ec20, Ec34, Ec35, Ec45, Ec56, Ec57, Bf1, Bf2, Bf3 y Bf4. En algunas realizaciones, la composición incluye cinco bacteriófagos seleccionados de Ec20, Ec34, Ec35, Ec45, Ec56, Ec57, Bf1, Bf2, Bf3 y Bf4. En algunas realizaciones, la composición incluye seis bacteriófagos seleccionados de Ec20, Ec34, Ec35, Ec45, Ec56, Ec57, Bf1, Bf2, Bf3 y Bf4. En algunas realizaciones, la composición incluye siete bacteriófagos seleccionados de Ec20, Ec34, Ec35, Ec45, Ec56, Ec57, Bf1, Bf2, Bf3 y Bf4. En algunas realizaciones, la composición incluye ocho bacteriófagos seleccionados de Ec20, Ec34, Ec35, Ec45, Ec56, Ec57, Bf1, Bf2, Bf3 y Bf4. En algunas realizaciones, la composición incluye nueve bacteriófagos seleccionados de Ec20, Ec34, Ec35, Ec45, Ec56, Ec57, Bf1, Bf2, Bf3 y Bf4. En algunas realizaciones, la composición incluye diez bacteriófagos seleccionados de Ec20, Ec34, Ec35, Ec45, Ec56, Ec57, Bf1, Bf2, Bf3 y Bf4. En algunas realizaciones, las composiciones proporcionadas en el presente documento excluyen uno o más bacteriófagos descritos en el presente documento.
- Los bacteriófagos de una composición de la invención pueden proporcionarse en forma de una única composición terapéutica (preferida) o en forma de varias composiciones distintas, cada una de las cuales comprende uno o más miembros de la composición. En las realizaciones en las que los bacteriófagos se suministran en varias composiciones distintas, dichos bacteriófagos pueden administrarse a un sujeto de forma secuencial o simultánea.
- En las realizaciones en las que más de un bacteriófago está presente en la composición de bacteriófagos, la composición se formula de tal manera que cada bacteriófago puede estar presente en una proporción de entre 1:10 y 10:1 (o cualquier subvalor o subintervalo intermedio, incluidos los puntos finales) en comparación con la cantidad (por ejemplo, concentración) de cualquier otro bacteriófago en la composición. En algunas realizaciones, cada bacteriófago está presente en una proporción de aproximadamente 1:1 en comparación con otro u otros bacteriófagos de la composición. En algunas realizaciones, cada bacteriófago está presente en una proporción de aproximadamente 1:2 en comparación con otro u otros bacteriófagos de la composición. En algunas realizaciones, cada bacteriófago está presente en una proporción de aproximadamente 1:3 en comparación con otro u otros bacteriófagos de la composición. En algunas realizaciones, cada bacteriófago está presente en una proporción de aproximadamente 1:4 en comparación con otro u otros bacteriófagos de la composición. En algunas realizaciones, cada bacteriófago está presente en una proporción de aproximadamente 1:5 en comparación con otro u otros bacteriófagos de la composición.

En algunas realizaciones, cada bacteriófago está presente en una proporción de aproximadamente 1:6 en comparación con otro u otros bacteriófagos de la composición. En algunas realizaciones, cada bacteriófago está presente en una proporción de aproximadamente 1:7 en comparación con otro u otros bacteriófagos de la composición. En algunas realizaciones, cada bacteriófago está presente en una proporción de aproximadamente 1:8 en comparación con otro u otros bacteriófagos de la composición. En algunas realizaciones, cada bacteriófago está presente en una proporción de aproximadamente 1:9 en comparación con otro u otros bacteriófagos de la composición. En algunas realizaciones, cada bacteriófago está presente en una proporción de aproximadamente 1:10 en comparación con otro u otros bacteriófagos de la composición. En algunas realizaciones, cada bacteriófago está presente en una proporción de aproximadamente 10:1 en comparación con otro u otros bacteriófagos de la composición. En algunas realizaciones, cada bacteriófago está presente en una proporción de aproximadamente 5:1 en comparación con otro u otros bacteriófagos de la composición. En algunas realizaciones, cada bacteriófago está presente en una proporción de aproximadamente 10:3 en comparación con otro u otros bacteriófagos de la composición. En algunas realizaciones, cada bacteriófago está presente en una proporción de aproximadamente 5:2 en comparación con otro u otros bacteriófagos de la composición. En algunas realizaciones, cada bacteriófago está presente en una proporción de aproximadamente 2:1 en comparación con otro u otros bacteriófagos de la composición. En algunas realizaciones, cada bacteriófago está presente en una proporción de aproximadamente 5:3 en comparación con otro u otros bacteriófagos de la composición. En algunas realizaciones, cada bacteriófago está presente en una proporción de aproximadamente 10:7 en comparación con otro u otros bacteriófagos de la composición. En algunas realizaciones, cada bacteriófago está presente en una proporción de aproximadamente 5:4 en comparación con otro u otros bacteriófagos de la composición.

Un bacteriófago para su inclusión en una composición puede propagarse por cualquier procedimiento adecuado conocido en la técnica. Por ejemplo, uno o más bacteriófagos pueden cultivarse por separado en cepas bacterianas hospedadoras capaces de sostener el crecimiento del bacteriófago. Generalmente, el bacteriófago se cultivará en dicha cepa bacteriana hospedadora a altas concentraciones, se valorará y se combinará para formar la composición. La cantidad de cada bacteriófago empleado (por ejemplo, en una composición de bacteriófagos, procedimiento o uso) dependerá de su virulencia contra la especie bacteriana diana.

La cantidad de cada bacteriófago empleada (por ejemplo, en una composición de bacteriófagos, procedimiento o uso como se describe en el presente documento) puede depender de su virulencia contra el aislado bacteriano diana.

En el desarrollo de una composición pueden utilizarse cepas bacterianas preseleccionadas o de referencia, es decir, cepas bacterianas que son indicadores para los posibles miembros individuales de la composición (por ejemplo, un panel). Una cepa preseleccionada o de referencia puede permitir al menos 1000 veces más formación de placa por un posible miembro de la composición de bacteriófagos que otra. De esta forma, se puede conseguir una composición (por ejemplo, un panel) que sea sistemáticamente eficaz contra una amplia gama de aislados bacterianos.

Normalmente, dichos uno o más bacteriófagos pueden combinarse para formar una composición que incluya al menos aproximadamente 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 , 1×10^9 o 1×10^{10} , o 1×10^{11} unidades formadoras de placa (UFP) de cada fago por ml de composición. La composición puede incluir de 1×10^5 a 1×10^{11} UFP de cada fago por ml de composición. En algunas realizaciones, la composición puede incluir de 1×10^5 a 1×10^6 UFP, de 1×10^5 a 1×10^7 UFP, de 1×10^5 a 1×10^8 UFP, de 1×10^5 a 1×10^9 UFP, o de 1×10^5 a 1×10^{10} UFP de cada fago por ml de composición. En algunas realizaciones, la composición puede incluir de 1×10^6 a 1×10^7 UFP, de 1×10^6 a 1×10^8 UFP, de 1×10^6 a 1×10^9 UFP, de 1×10^6 a 1×10^{10} UFP, o de 1×10^6 a 1×10^{11} UFP de cada fago por ml de composición. En algunas realizaciones, la composición puede incluir de 1×10^7 a 1×10^8 UFP, de 1×10^7 a 1×10^9 UFP, de 1×10^7 a 1×10^{10} UFP, o de 1×10^7 a 1×10^{11} UFP de cada fago por ml de composición. En algunas realizaciones, la composición puede incluir de 1×10^8 a 1×10^9 UFP, de 1×10^8 a 1×10^{10} UFP, o de 1×10^8 a 1×10^{11} UFP de cada fago por ml de composición. En algunas realizaciones, la composición puede incluir de 1×10^9 a 1×10^{10} UFP o de 1×10^9 a 1×10^{11} UFP de cada fago por ml de composición. En algunas realizaciones, la composición puede incluir de 1×10^{10} a 1×10^{11} UFP de cada fago por ml de composición. En algunas realizaciones, uno o más bacteriófagos pueden combinarse para formar una composición que incluya 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 , 1×10^9 o 1×10^{10} , o 1×10^{11} UFP de cada fago por ml de composición. En algunas realizaciones, la composición incluye concentraciones iguales (o sustancialmente iguales) de cada bacteriófago incluido en el presente documento. Las concentraciones adecuadas incluyen cualquier valor o subintervalo dentro de los intervalos indicados, incluidos los puntos finales.

En algunos aspectos, los bacteriófagos de la composición están purificados o sustancialmente purificados.

Al seleccionar bacteriófagos para su inclusión en una composición de la invención, se pueden utilizar los procedimientos indicados en el documento WO 2013/164640 A1. En una realización, el procedimiento comprende: a. proporcionar dos o más bacteriófagos diferentes, en el que cada uno de los bacteriófagos retrasa de forma independiente el crecimiento de una especie o cepa bacteriana diana; b. combinar al menos dos de los bacteriófagos; y c. determinar el crecimiento de la especie o cepa bacteriana diana en presencia de la combinación de dos o más bacteriófagos diferentes, en el que las condiciones de crecimiento de la especie o cepa bacteriana diana son las mismas o equivalentes en las etapas a. y c.; d. en el que, si la combinación retrasa el crecimiento de la especie o cepa bacteriana diana en un grado al menos igual que el mayor retraso del crecimiento conseguido de forma independiente por cualquiera de los bacteriófagos, la combinación se acepta como composición de bacteriófagos; y e. en el que, si

la combinación retrasa el crecimiento de la especie o cepa bacteriana diana en un grado menor que el mayor retraso del crecimiento conseguido de forma independiente por cualquiera de los bacteriófagos, la combinación se rechaza inicialmente como composición de bacteriófagos.

5 En algunas realizaciones, el alcance de las bacterias diana afectadas (es decir, lisadas, muertas) por la composición es más amplio que el alcance de las bacterias diana afectadas por cualquier bacteriófago individual incluido en la composición. Dicha actividad puede considerarse aditiva y/o sinérgica. La actividad puede considerarse sinérgica si el efecto de la composición (alcance de la destrucción diana) es mayor que la suma de los efectos individuales (alcance de la destrucción diana) de cada bacteriófago componente.

10 En una realización (como alternativa, o además) un bacteriófago "mutante" es capaz de lisar algunas o todas las mismas cepas bacterianas diana que uno o más de los fagos de *E. coli* Ec20, Ec34, Ec35, Ec45, Ec56 y Ec57 y/o además es capaz de lisar una o más cepas bacterianas adicionales. En una realización, un mutante puede tener al menos un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 % o un 99 % de identidad de secuencia con una secuencia de ácido nucleico de uno o más de los fagos Ec20, Ec34, Ec35, Ec45, Ec56 y Ec57 de *E. coli*. En algunas realizaciones, un mutante o variante puede tener al menos un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 % o un 99 % de identidad de secuencia en todo su genoma en comparación con otro fago de *E. coli*. En una realización, un mutante puede tener al menos un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 % o un 99 % de identidad de secuencia en todo su genoma cuando se compara con SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 y/o SEQ ID NO: 6.

20 En una realización (como alternativa, o además), un bacteriófago "mutante" es capaz de lisar algunas o todas las mismas cepas bacterianas diana que uno o más de los fagos Bf1, Bf2, Bf3 y Bf4 de *B. fragilis* y/o además es capaz de lisar una o más cepas bacterianas adicionales. En una realización, un mutante puede tener al menos un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 % o un 99 % de identidad de secuencia con una secuencia de ácido nucleico de uno o más de los fagos Bf1, Bf2, Bf3 y Bf4 de *B. fragilis*. En algunas realizaciones, un mutante o variante puede tener al menos un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 % o un 99 % de identidad de secuencia en todo su genoma cuando se compara con uno más de los fagos Bf1, Bf2, Bf3 y Bf4 de *B. fragilis*.

25 En algunas realizaciones, un "mutante" puede ser una progenie de bacteriófago. Una progenie de bacteriófago puede ser un bacteriófago obtenido tras lisar bacterias diana (por ejemplo, bacterias cancerígenas) utilizando un bacteriófago como el descrito en el presente documento (es decir, el "bacteriófago original"). En otras palabras, la progenie de bacteriófago puede ser un bacteriófago de segunda (o ulterior) generación.

30 En algunas realizaciones, se puede obtener una progenie de bacteriófago poniendo en contacto uno o más bacteriófagos descritos en el presente documento, incluidos, por ejemplo, Ec20, Ec34, Ec35, Ec45, Ec56, Ec57, Bf1, Bf2, Bf3 y/o Bf4, con una bacteria diana, de tal manera que dichos uno o más bacteriófagos infecten y lisen la bacteria diana; y obteniendo un bacteriófago liberado tras la lisis de la bacteria diana. La progenie del bacteriófago incluirá normalmente una o más mutaciones de nucleótidos en comparación con el bacteriófago original correspondiente.

35 La expresión "que puede obtenerse", tal como se utiliza en el presente documento, también engloba el término "obtenido". En una realización, la expresión "que puede obtenerse" significa obtenido.

40 La composición de bacteriófagos puede ser una alternativa a los agentes antibacterianos y/u oncofármacos convencionales, y supera uno o más problemas asociados a los mismos. En algunas realizaciones, la composición de bacteriófagos puede utilizarse como cotratamiento o junto con agentes antibacterianos convencionales y/u oncofármacos.

45 En algunas realizaciones, la composición comprende además un antibiótico (por ejemplo, un antibiótico químico). En algunas realizaciones, las bacterias diana son resistentes a uno o más antibióticos. En algunas realizaciones, las bacterias diana se caracterizan por la presencia de una biopelícula bacteriana.

50 En algunas realizaciones, la composición comprende además un oncofármaco. En algunas realizaciones, el oncofármaco comprende además un agente inmunoterapéutico. En una realización, el agente inmunoterapéutico es un inhibidor de puntos de control inmunitario. En una realización, el agente inmunoterapéutico comprende anti-PD-1, anti-PD-L1, anti-CTLA-4, anti-CD27 o anti-IDO-1. En algunas realizaciones, el oncofármaco comprende un agente quimioterapéutico. En una realización, el agente quimioterapéutico es 5-fluorouracilo (5-FU), capecitabina, irinotecán, oxaliplatino, trifluridina y/o tipiracilo.

En algunas realizaciones, la composición comprende además un vehículo, diluyente, excipiente o combinaciones de los mismos farmacéuticamente aceptables. En una realización, el vehículo, diluyente, excipiente o combinaciones de los mismos farmacéuticamente aceptables comprenden sales de magnesio o calcio.

55 En algunas realizaciones, la composición de bacteriófagos incluye un agente conservante para el almacenamiento. En algunas realizaciones, la composición de bacteriófagos incluye un crioprotector. En algunas realizaciones, el agente conservante es glicerol. En algunas realizaciones, el agente conservante y/o crioprotector está presente en la composición en una cantidad suficiente para preservar la composición, por ejemplo, durante el almacenamiento en un

congelador o ultracongelador (por ejemplo, a temperaturas de aproximadamente 0 °C a aproximadamente -80 °C, más preferentemente de aproximadamente -20 °C a aproximadamente -80 °C, lo más preferentemente a aproximadamente -80 °C), o en nitrógeno líquido. En una realización más preferida, el agente conservante está presente en la composición en una cantidad suficiente para conservar la composición durante un almacenamiento a largo plazo, por ejemplo, en un congelador, ultracongelador o nitrógeno líquido. En una realización, el agente conservante es glicerol entre aproximadamente un 5 % y aproximadamente un 50 %; más preferentemente, glicerol entre aproximadamente un 10 % y aproximadamente un 30 %; lo más preferentemente glicerol aproximadamente al 20 %. Las concentraciones adecuadas pueden ser cualquier valor o subvalor dentro de los intervalos mencionados, incluidos los puntos finales.

En algunas realizaciones, la composición es una formulación oral liofilizada, liofilizada por pulverización, en aerosol de la composición. En algunas realizaciones, la composición se administra por vía intravenosa. En algunas realizaciones, la composición se administra por vía oral con y sin sistemas de administración microencapsulados o nano. En algunas realizaciones, la composición se administra en forma de supositorios.

Formulaciones

En el presente documento se proporcionan composiciones de bacteriófagos que incluyen o consisten fundamentalmente en uno más de los bacteriófagos descritos en el presente documento. En algunos aspectos de la invención, las composiciones pueden estar sustancialmente exentas de componentes bacterianos, tales como, por ejemplo, endotoxinas bacterianas, componentes y materiales de la célula hospedadora bacteriana (por ejemplo, proteínas) y similares. En algunas realizaciones de la invención, las composiciones incluyen uno o más bacteriófagos líticos obligatorios. En algunas realizaciones de la invención, el bacteriófago se selecciona entre Ec20 (SEQ ID NO: 1), Ec34 (SEQ ID NO: 2), Ec35 (SEQ ID NO: 3), Ec45 (SEQ ID NO: 4), Ec56 (SEQ ID NO: 5) y Ec57 (SEQ ID NO: 6) y la bacteria diana es *Escherichia coli*, opcionalmente en el que el bacteriófago es Ec34 (SEQ ID NO: 2), Ec35 (SEQ ID NO: 3), Ec45 (SEQ ID NO: 4) y Ec57 (SEQ ID NO: 6) o en el que el bacteriófago es Ec34 (SEQ ID NO: 2), Ec35 (SEQ ID NO: 3) y Ec57 (SEQ ID NO: 6), y opcionalmente comprende una proporción de aproximadamente 1:1 de al menos dos de las cepas de bacteriófagos; o se seleccionada de Bf1 (n.º de registro 040219-02), Bf2 (n.º de registro 040219-03), Bf3 (n.º de registro 040219-04) y Bf4 (n.º de registro 040219-05) y la bacteria diana es *Bacteroides fragilis*, y opcionalmente comprende una proporción de aproximadamente 1:1 de al menos dos de las cepas de bacteriófagos. En algunas realizaciones de la divulgación, dichos uno o más bacteriófagos incluyen un ácido nucleico, por ejemplo, un genoma que incluye una secuencia de nucleótidos que tiene de un 85 % a un 100 % de identidad con una o más de las SEQ ID NO: 1-6. En algunas realizaciones de la divulgación, al menos uno o más fagos tienen al menos un 85 %, pero no un 100 % de identidad de secuencia de ácido nucleico con una cualquiera de las SEQ ID NO: 1-6. Cada bacteriófago individual puede ser un bacteriófago que no sea propenso a la transducción generalizada. En algunas realizaciones de la invención, cada bacteriófago individual no porta genes de resistencia a antibióticos. El fago puede ser natural o no natural. En algunas realizaciones, por ejemplo, en composiciones con más de un bacteriófago, al menos uno puede ser de origen natural, al menos uno puede ser de origen no natural, o ninguno puede ser de origen natural. Las composiciones pueden incluir opcionalmente un crioprotector o un excipiente. El excipiente puede estabilizar la potencia del fago o reducir la pérdida de potencia a lo largo del tiempo, por ejemplo.

En algunas realizaciones, las composiciones de bacteriófagos proporcionadas en el presente documento incluyen además un vehículo, diluyente, excipiente o combinaciones de los mismos farmacéuticamente aceptables. Los vehículos, diluyentes y/o excipientes adecuados pueden incluir soluciones salinas isotónicas, tales como la solución salina tamponada con fosfato. Un "excipiente farmacéuticamente aceptable" y un "vehículo farmacéuticamente aceptable" se refieren a una sustancia que ayuda a la administración de un agente activo y/o a su absorción por un sujeto y que puede incluirse en las composiciones de la presente divulgación sin causar un efecto toxicológico adverso significativo en el paciente. Algunos ejemplos no limitantes de excipientes farmacéuticamente aceptables incluyen agua, NaCl, soluciones salinas normales, solución de Ringer lactato, sacarosa normal, lactosa, leucina, glucosa normal, aglutinantes, cargas, disgregantes, lubricantes, recubrimientos, edulcorantes, aromas, soluciones salinas (como la solución de Ringer), alcoholes, aceites, gelatinas, hidratos de carbono, tales como lactosa, amilosa o almidón, ésteres de ácidos grasos, hidroximetilcelulosa, polivinilpirrolidina y colorantes, y similares. Dichos preparados pueden esterilizarse y, si se desea, mezclarse con agentes auxiliares, tales como lubricantes, conservantes, estabilizantes, humectantes, emulsionantes, sales, por ejemplo, para influir en la presión osmótica, tampones, colorantes y/o sustancias aromáticas y similares que no reaccionen de forma perjudicial con los compuestos de la divulgación. Un experto en la materia reconocerá que otros excipientes farmacéuticos son útiles en la presente divulgación.

Una composición de bacteriófagos como la descrita en el presente documento puede formularse para la administración nasal, oral, parenteral, intramuscular, intravenosa o subcutánea. Dicho preparado de bacteriófago puede utilizarse directamente, refrigerarse, liofilizarse, almacenarse congelado en solución acuosa o de otro tipo, opcionalmente con un crioprotector apropiado (por ejemplo, glicerol al 20 %), liofilizarse y rehidratarse antes de su uso, o conseguir que sea estable en alguna otra formulación, incluidas (entre otras) comprimidos, emulsiones, pomadas o apósitos impregnados para heridas u otros elementos. En algunas realizaciones, el citoprotector es glicerol al 10-30 %. En algunas realizaciones, el crioprotector es glicerol al 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 %, 15 %, 16 %, 17 %, 18 %, 19 %, 20 %, 21 %, 22 %, 23 %, 24 %, 25 %, 26 %, 27 %, 28 %, 29 % o 30 %.

En algunas realizaciones, la composición de bacteriófagos incluye solución salina (por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato, con o sin magnesio). En algunas realizaciones, la composición de bacteriófagos incluye un

tampón. En algunas realizaciones, el tampón incluye sales de calcio o magnesio. En una realización, el tampón incluye solución salina tamponada con fosfato y $MgSO_4$. El tampón puede incluir $MgSO_4$ de 1 mM a 20 mM, $MgSO_4$ de 2 mM a 19 mM, $MgSO_4$ de 3 mM a 17 mM, $MgSO_4$ de 4 mM a 16 mM, $MgSO_4$ de 5 mM a 15 mM, $MgSO_4$ de 6 mM a 14 mM, $MgSO_4$ de 7 mM a 13 mM, $MgSO_4$ de 8 mM a 12 mM, $MgSO_4$ de 9 mM a 11 mM, o $MgSO_4$ aproximadamente 10 mM. La concentración puede ser cualquier valor o subintervalo dentro de los intervalos mencionados, incluidos los puntos finales. Por ejemplo, el tampón puede incluir $MgSO_4$ aproximadamente 1 mM, $MgSO_4$ aproximadamente 2 mM, $MgSO_4$ aproximadamente 3 mM, $MgSO_4$ aproximadamente 4 mM, $MgSO_4$ aproximadamente 5 mM, $MgSO_4$ aproximadamente 6 mM, $MgSO_4$ aproximadamente 7 mM, $MgSO_4$ aproximadamente 8 mM, $MgSO_4$ aproximadamente 9 mM, $MgSO_4$ aproximadamente 10 mM, $MgSO_4$ aproximadamente 11 mM, $MgSO_4$ aproximadamente 12 mM, $MgSO_4$ aproximadamente 13 mM, $MgSO_4$ aproximadamente 14 mM, $MgSO_4$ aproximadamente 15 mM, $MgSO_4$ aproximadamente 16 mM, $MgSO_4$ aproximadamente 17 mM, $MgSO_4$ aproximadamente 18 mM, $MgSO_4$ aproximadamente 19 mM, o $MgSO_4$ aproximadamente 20 mM. En algunas realizaciones, el tampón incluye cloruro de calcio, $CaCl_2$. El tampón puede incluir $CaCl_2$ de 1 mg/l a 20 mg/l, $CaCl_2$ de 2 mg/l a 19 mg/l, $CaCl_2$ de 3 mg/l a 17 mg/l, $CaCl_2$ de 4 mg/l a 16 mg/l, $CaCl_2$ de 5 mg/l a 15 mg/l, $CaCl_2$ de 6 mg/l a 14 mg/l, $CaCl_2$ de 7 mg/l a 13 mg/l, $CaCl_2$ de 8 mg/l a 12 mg/l, $CaCl_2$ de 9 mg/l a 11 mg/l, o $CaCl_2$ aproximadamente 10 mg/l. Por ejemplo, el tampón puede incluir $CaCl_2$ aproximadamente 1 mg/l, $CaCl_2$ aproximadamente 2 mg/l, $CaCl_2$ aproximadamente 3 mg/l, $CaCl_2$ aproximadamente 4 mg/l, $CaCl_2$ aproximadamente 5 mg/l, $CaCl_2$ aproximadamente 6 mg/l, $CaCl_2$ aproximadamente 7 mg/l, $CaCl_2$ aproximadamente 8 mg/l, $CaCl_2$ aproximadamente 9 mg/l, $CaCl_2$ aproximadamente 10 mg/l, $CaCl_2$ aproximadamente 11 mg/l, $CaCl_2$ aproximadamente 12 mg/l, $CaCl_2$ aproximadamente 13 mg/l, $CaCl_2$ aproximadamente 14 mg/l, $CaCl_2$ aproximadamente 15 mg/l, $CaCl_2$ aproximadamente 16 mg/l, $CaCl_2$ aproximadamente 17 mg/l, $CaCl_2$ aproximadamente 18 mg/l, $CaCl_2$ aproximadamente 19 mg/l, o $CaCl_2$ aproximadamente 20 mg/l.

Una composición de bacteriófagos puede formularse para la administración nasal, oral, parenteral, intramuscular, intravenosa o subcutánea. Dicho preparado de bacteriófagos puede utilizarse directamente, almacenarse congelado en solución acuosa o de otro tipo, opcionalmente con un crioprotector adecuado (por ejemplo, sacarosa o glicerol al 10 %), almacenarse a temperaturas de refrigeración, liofilizarse y rehidratarse antes de su uso, o conseguir que sea estable en alguna otra formulación, que incluye (entre otras) comprimidos, emulsiones, pomadas o apósitos impregnados para heridas u otro elemento. En algunas realizaciones, la composición de bacteriófagos puede incluirse en un medio de administración intravenoso.

En algunas realizaciones, la composición de bacteriófagos es estéril. Dicho producto estéril puede ser adecuado para la administración parenteral en un sujeto.

En algunas realizaciones, en el presente documento se proporcionan formulaciones orales que incluyen el bacteriófago y/o composiciones/formulaciones de bacteriófagos como se describe en el presente documento. Algunas realizaciones se refieren a procedimientos y usos de tales formulaciones orales.

35 *Usos/procedimientos de uso*

En el presente documento se proporciona un uso de uno o más bacteriófagos o una composición de bacteriófagos como medicamento (por ejemplo, para tratar o prevenir el cáncer). También se proporcionan procedimientos correspondientes de tratamiento de una enfermedad que comprenden la administración de uno o más bacteriófagos o composiciones de bacteriófagos a un sujeto.

En un aspecto de la divulgación, se proporciona una composición de bacteriófagos para su uso en el tratamiento de una infección bacteriana. En aspectos relacionados, se proporciona el uso de una composición de bacteriófagos en la fabricación de un medicamento para tratar una infección bacteriana, así como un procedimiento para tratar una infección bacteriana que comprende la administración de la composición de bacteriófagos a un sujeto.

En un aspecto de la divulgación, en el presente documento se proporcionan procedimientos para tratar un cáncer asociado a bacterias que incluyen la selección de un sujeto con una infección confirmada de una bacteria asociada al cáncer y la administración de una composición de bacteriófagos como se describe en el presente documento. En una realización, el procedimiento comprende la selección de un sujeto con una infección de una bacteria asociada al cáncer. En algunas realizaciones, el procedimiento incluye la selección de un paciente con cáncer colorrectal. En algunas realizaciones, el procedimiento incluye la selección de un paciente con una infección por *E. coli pks+*. En algunas realizaciones, el procedimiento incluye la selección de un paciente con una infección por *E. coli pks+*. En algunas realizaciones, el procedimiento incluye la selección de un paciente con una infección por una cepa de *E. coli pks+*. En algunas realizaciones, el procedimiento incluye la selección de un paciente con cáncer colorrectal debido a una infección por la bacteria *E. coli*. En algunas realizaciones, el procedimiento incluye la selección de un paciente con una infección por *Bacteroides fragilis*. En algunas realizaciones, el procedimiento incluye la selección de un paciente con una infección por *B. fragilis* resistente a la clindamicina. En algunas realizaciones, el procedimiento incluye la selección de un paciente con una infección por *B. fragilis* sensible a la clindamicina. En algunas realizaciones, el procedimiento incluye la selección de un paciente con cáncer colorrectal debido a una infección por la bacteria *B. fragilis*. Las realizaciones de la invención proporcionan una composición que comprende al menos dos bacteriófagos, para su uso en un procedimiento de tratamiento o prevención de un cáncer, en la que el cáncer es un

cáncer colorrectal causado por una infección por la bacteria *E. coli* y/o la bacteria *B. fragilis*, y además en la que los bacteriófagos se dirigen a las bacterias, en la que:

- 5 a) el bacteriófago se selecciona entre Ec20 (SEQ ID NO: 1), Ec34 (SEQ ID NO: 2), Ec35 (SEQ ID NO: 3), Ec45 (SEQ ID NO: 4), Ec56 (SEQ ID NO: 5) y Ec57 (SEQ ID NO: 6) y en la que la bacteria diana es *Escherichia coli*, opcionalmente en la que el bacteriófago es Ec34 (SEQ ID NO: 2), Ec35 (SEQ ID NO: 3), Ec45 (SEQ ID NO: 4) y Ec57 (SEQ ID NO: 6) o en la que el bacteriófago es Ec34 (SEQ ID NO: 2), Ec35 (SEQ ID NO: 3) y Ec57 (SEQ ID NO: 6), comprendiendo opcionalmente una proporción de aproximadamente 1:1 de al menos dos de las cepas de bacteriófagos; o
- 10 b) se selecciona de Bf1 (n.º de registro 040219-02), Bf2 (n.º de registro 040219-03), Bf3 (n.º de registro 040219-04) y Bf4 (n.º de registro 040219-05), y en la que la bacteria diana es *Bacteroides fragilis*, comprendiendo opcionalmente una proporción de aproximadamente 1:1 de al menos dos de las cepas de bacteriófagos.

15 En algunas realizaciones, el sujeto tiene una predisposición genética a uno o más cánceres adicionales. En algunas realizaciones, el sujeto ha sido examinado para detectar una mutación genética que predispone al paciente al cáncer. En algunas realizaciones, la mutación genética es la poliposis adenomatosa familiar.

20 En algunas realizaciones de la invención, el cáncer es un cáncer colorrectal causado por una infección por la bacteria *E. coli* y/o la bacteria *B. fragilis*. En las realizaciones de la divulgación, el cáncer puede ser cualquier cáncer del que se sepa o se sospeche que se debe a una infección por una especie o cepa bacteriana. Los cánceres o tumores que pueden tratarse con las composiciones y procedimientos descritos en el presente documento incluyen, entre otros: cáncer del tracto biliar; cáncer cerebral, incluidos glioblastomas y meduloblastomas; cáncer de mama; cáncer de cuello uterino; coriocarcinoma; cáncer de colon; cáncer endometrial; cáncer esofágico, cáncer gástrico; neoplasias hematológicas, incluidas leucemia linfocítica aguda y leucemia mielógena; mieloma múltiple; leucemias asociadas al SIDA y linfoma de leucemia de linfocitos T del adulto; neoplasias intraepiteliales, incluidas la enfermedad de Bowen y la enfermedad de Paget; cáncer de hígado (hepatocarcinoma); cáncer de pulmón; linfomas, incluidos la enfermedad de Hodgkin y los linfomas linfocíticos; neuroblastomas; cáncer oral, incluido carcinoma de células escamosas; cáncer de ovario, incluidos los derivados de células epiteliales, estromales, germinales y mesenquimales; cáncer de páncreas; cáncer de próstata; cáncer de recto; sarcomas, incluidos leiomiomas, rabdomiosarcoma, liposarcoma, fibrosarcoma y osteosarcoma; cáncer de piel, incluidos melanoma, sarcoma de Kaposi, cáncer basocelular y cáncer de células escamosas; cáncer de testículo, incluidos tumores germinales (seminoma, no seminoma [teratomas, coriocarcinomas]), tumores estromales y tumores de células germinales; cáncer de tiroides, incluidos adenocarcinoma de tiroides y carcinoma medular; y cáncer renal, incluidos adenocarcinoma y tumor de Wilms. En realizaciones importantes, los cánceres o tumores incluyen el cáncer de mama, el linfoma, el mieloma múltiple y el melanoma. En algunas realizaciones, el cáncer es cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer de vesícula biliar, cáncer de pulmón, carcinoma de células escamosas, cáncer de vejiga, cáncer de estómago o linfoma MALT. En algunas realizaciones, el cáncer es cáncer colorrectal. En algunas realizaciones, el cáncer es cáncer esofágico. En algunas realizaciones, el cáncer es cáncer de la vesícula biliar. En algunas realizaciones, el cáncer es cáncer de pulmón. En algunas realizaciones, el cáncer es un carcinoma de células escamosas. En algunas realizaciones, el cáncer es cáncer de vejiga. En algunas realizaciones, el cáncer es cáncer de estómago. En algunas realizaciones, el cáncer es un linfoma MALT.

40 En algunas realizaciones, la infección se caracteriza por la presencia de una biopelícula bacteriana. En algunas realizaciones, la infección bacteriana es crónica. En algunas realizaciones, la infección bacteriana es aguda.

En algunas realizaciones, el sujeto tiene una infección bacteriana que no responde a uno o más antibióticos. En algunas realizaciones, el sujeto tiene una infección bacteriana que no responde a los antibióticos habituales.

45 En algunas realizaciones, uno o más aislados bacterianos del sujeto se someten a pruebas de susceptibilidad a la composición bacteriana antes de la administración.

Tal como se utiliza en el presente documento, una "cantidad terapéuticamente eficaz" es cualquier cantidad de la composición, que cuando se administra sola o combinada a un sujeto para tratar una infección bacteriana (o un síntoma de la misma), es suficiente para efectuar dicho tratamiento de la infección, o síntoma de la misma.

50 Tal como se utiliza en el presente documento, una "cantidad profilácticamente eficaz" es cualquier cantidad de la composición que, cuando se administra sola o combinada a un sujeto, inhibe o retrasa la aparición o reaparición de una infección bacteriana (o un síntoma de la misma). En algunas realizaciones, la cantidad profilácticamente eficaz previene por completo la aparición o reaparición de una infección bacteriana. "Inhibir" la aparición significa disminuir la probabilidad de aparición de una infección bacteriana (o un síntoma de la misma) o evitarla por completo.

55 Un intervalo de dosis adecuado es aquel que produce el efecto terapéutico deseado (por ejemplo, la composición se administra en una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz).

En una realización, el sujeto es un sujeto humano con un cáncer asociado a bacterias (por ejemplo, cáncer colorrectal). En algunas realizaciones, la composición incluye de 1×10^5 a 1×10^{11} UPF de cada fago por ml de composición. En

5 algunas realizaciones, la composición incluye de 1×10^5 a 1×10^6 UFP, de 1×10^5 a 1×10^7 UFP, de 1×10^5 a 1×10^8 UFP, de 1×10^5 a 1×10^9 UFP, o de 1×10^5 a 1×10^{10} UFP de cada fago por ml de composición. En algunas realizaciones, la composición incluye de 1×10^6 a 1×10^7 UFP, de 1×10^6 a 1×10^8 UFP, de 1×10^6 a 1×10^9 UFP, de 1×10^6 a 1×10^{10} UFP, o de 1×10^6 a 1×10^{11} UFP de cada fago por ml de composición. En algunas realizaciones, la composición incluye de 1×10^7 a 1×10^8 UFP, de 1×10^7 a 1×10^9 UFP, de 1×10^7 a 1×10^{10} UFP, o de 1×10^7 a 1×10^{11} UFP de cada fago por ml de composición. En algunas realizaciones, la composición incluye de 1×10^8 a 1×10^9 UFP, de 1×10^8 a 1×10^{10} UFP, o de 1×10^8 a 1×10^{11} UFP de cada fago por ml de composición. En algunas realizaciones, la composición incluye de 1×10^9 a 1×10^{10} UFP o de 1×10^9 a 1×10^{11} UFP de cada fago por ml de composición. En algunas realizaciones, la composición puede incluir de 1×10^{10} a 1×10^{11} UFP de cada fago por ml de composición.

10 En realizaciones, una composición de bacteriófagos se administra a un sujeto a una dosis de al menos aproximadamente 1×10^5 UFP de cada fago, al menos aproximadamente 1×10^6 UFP de cada fago, al menos aproximadamente 1×10^7 UFP de cada fago, al menos aproximadamente 1×10^8 UFP de cada fago, al menos aproximadamente 1×10^9 UFP de cada fago, al menos aproximadamente 1×10^{10} UFP de cada fago, o al menos aproximadamente 1×10^{11} UFP de cada fago por ml de composición. En algunas realizaciones, uno o más bacteriófagos pueden combinarse para formar una composición que incluya 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 , 1×10^9 , 1×10^{10} o 1×10^{11} UFP de cada fago por ml de composición. Las dosis incluyen cualquier valor o intervalo dentro de los intervalos indicados, incluidos los puntos finales.

15 En algunas realizaciones, las composiciones de bacteriófagos proporcionadas en el presente documento se administran a un sujeto en una dosis de al menos aproximadamente 1×10^5 UFP de fago total, al menos aproximadamente 1×10^6 UFP de fago total, al menos aproximadamente 1×10^7 UFP de fago total, al menos aproximadamente 1×10^8 UFP de fago total, al menos aproximadamente 1×10^9 UFP de fago total, al menos aproximadamente 1×10^{10} UFP de fago total, o al menos aproximadamente 1×10^{11} UFP de fago total. La composición de bacteriófagos se administra a una dosis de entre aproximadamente 1×10^5 y aproximadamente 1×10^{11} UFP de fago total por ml de composición. En algunas realizaciones, la composición de bacteriófagos se administra a una dosis de entre aproximadamente 1×10^5 y aproximadamente 1×10^6 UFP, entre aproximadamente 1×10^5 y aproximadamente 1×10^7 UFP, entre aproximadamente 1×10^5 y aproximadamente 1×10^8 UFP, entre aproximadamente 1×10^5 y aproximadamente 1×10^9 UFP, o entre aproximadamente 1×10^5 y aproximadamente 1×10^{10} UFP de fago total por ml de composición. En algunas realizaciones, la composición de bacteriófagos se administra a una dosis de entre aproximadamente 1×10^6 y aproximadamente 1×10^7 UFP, entre aproximadamente 1×10^6 y aproximadamente 1×10^8 UFP, entre aproximadamente 1×10^6 y aproximadamente 1×10^9 UFP, entre aproximadamente 1×10^6 y aproximadamente 1×10^{10} UFP, o entre aproximadamente 1×10^6 y aproximadamente 1×10^{11} UFP de fago total por ml de composición. En algunas realizaciones, la composición de bacteriófagos se administra a una dosis de entre aproximadamente 1×10^7 y aproximadamente 1×10^8 UFP, entre aproximadamente 1×10^7 y aproximadamente 1×10^9 UFP, entre aproximadamente 1×10^7 y aproximadamente 1×10^{10} UFP, o entre aproximadamente 1×10^7 y aproximadamente 1×10^{11} UFP de cada fago por ml de composición. En algunas realizaciones, la composición de bacteriófagos se administra a una dosis de entre aproximadamente 1×10^8 y aproximadamente 1×10^9 UFP, entre aproximadamente 1×10^8 y aproximadamente 1×10^{10} UFP, o entre aproximadamente 1×10^8 y aproximadamente 1×10^{11} UFP de fago total por ml de composición. En algunas realizaciones, la composición de bacteriófagos se administra a una dosis de entre aproximadamente 1×10^9 y aproximadamente 1×10^{10} UFP, o entre aproximadamente 1×10^9 y aproximadamente 1×10^{11} UFP de fago total por ml de composición. En algunas realizaciones, la composición de bacteriófagos se administra a una dosis de entre aproximadamente 1×10^{10} y aproximadamente 1×10^{11} UFP de fago total por ml de composición. Una dosis puede ser de 3×10^9 UFP por mililitro de composición. Las dosis incluyen cualquier valor o intervalo dentro de los intervalos indicados, incluidos los puntos finales.

20 En algunas realizaciones, la composición de bacteriófagos se administra al menos una, dos, tres o cuatro veces al día. La composición de bacteriófagos puede administrarse dos veces al día. En una realización, por lo tanto, se administra una dosis de al menos aproximadamente 1×10^5 UFP de cada fago al menos una vez, dos veces, tres veces o cuatro veces al día. En una realización, por lo tanto, se administra una dosis de al menos aproximadamente 1×10^6 UFP de cada fago al menos una vez, dos veces, tres veces o cuatro veces al día. En otra realización, se administran al menos 1×10^7 UFP de cada fago al menos una, dos, tres o cuatro veces al día. En otra realización, se administran al menos 1×10^8 UFP de cada fago al menos una, dos, tres o cuatro veces al día. En otra realización, se administran al menos 1×10^9 UFP de cada fago al menos una, dos, tres o cuatro veces al día. En otra realización, se administran al menos 1×10^{10} UFP de cada fago al menos una, dos, tres o cuatro veces al día. En otra realización, se administran al menos 1×10^{11} UFP de cada fago al menos una, dos, tres o cuatro veces al día. Puede administrarse un intervalo de dosis entre aproximadamente 1×10^5 UFP de cada fago y aproximadamente 1×10^{11} UFP de cada fago al menos una, dos, tres o cuatro veces al día. Preferentemente, puede administrarse un intervalo de dosis entre aproximadamente 1×10^7 UFP de cada fago y aproximadamente 1×10^9 UFP de cada fago al menos una vez, dos veces, tres veces o cuatro veces al día.

25 En algunas realizaciones, la composición de bacteriófagos se administra cada 2 horas, cada 4 horas, cada 6 horas, cada 8 horas, cada 12 horas, cada 24 horas, cada 48 horas o cada 72 horas. En algunas realizaciones, la composición de bacteriófagos se administra cada 2 horas. En algunas realizaciones, la composición de bacteriófagos se administra

- 5 cada 4 horas. En algunas realizaciones, la composición de bacteriófagos se administra cada 6 horas. En algunas realizaciones, la composición de bacteriófagos se administra cada 8 horas. En algunas realizaciones, la composición de bacteriófagos se administra cada 12 horas. En algunas realizaciones, la composición de bacteriófagos se administra cada 24 horas. En algunas realizaciones, la composición de bacteriófagos se administra cada 48 horas. En algunas realizaciones, la composición de bacteriófagos se administra cada 72 horas. La frecuencia de administración incluye cualquier valor o intervalo dentro de los intervalos indicados, incluidos los puntos finales.
- 10 En algunas realizaciones, la composición de bacteriófagos se administra durante al menos un día, al menos 2 días, al menos 3 días, al menos 4 días, al menos 5 días, al menos 6 días, una semana, al menos dos semanas, al menos tres semanas, al menos cuatro semanas, al menos 5 semanas, al menos 6 semanas, al menos 7 semanas, al menos 8 semanas, al menos 9 semanas, al menos 10 semanas, o más de 10 semanas. En algunas realizaciones, la composición de bacteriófagos se administra durante al menos un día. En algunas realizaciones, la composición de bacteriófagos se administra durante al menos una semana. En algunas realizaciones, la composición de bacteriófagos se administra durante al menos dos semanas. En algunas realizaciones, la composición de bacteriófagos se administra durante al menos tres semanas. En algunas realizaciones, la composición de bacteriófagos se administra durante al menos cuatro semanas. En algunas realizaciones, la composición de bacteriófagos se administra durante al menos cinco semanas. En algunas realizaciones, la composición de bacteriófagos se administra durante al menos seis semanas. En algunas realizaciones, la composición de bacteriófagos se administra durante un periodo comprendido entre aproximadamente 3 días y aproximadamente 100 días. En una realización, la composición de bacteriófagos se administra durante un periodo comprendido entre aproximadamente 7 días y aproximadamente 60 días. En una realización, la composición de bacteriófagos se administra durante un periodo comprendido entre aproximadamente 14 días y aproximadamente 30 días. En una realización, la composición de bacteriófagos se administra durante un periodo comprendido entre aproximadamente 3 días y aproximadamente 28 días. En una realización, la composición de bacteriófagos se administra durante al menos 14 días. En una realización, la composición de bacteriófagos se administra durante más de 14 días. La duración de la administración incluye cualquier valor o intervalo dentro de los intervalos indicados, incluidos los puntos finales. En algunas realizaciones, el tratamiento puede administrarse de forma profiláctica (es decir, si se detecta la bacteria, hay predisposición genética al cáncer, pero aún no se ha detectado cáncer) para descontaminar el intestino. En esos casos, los periodos de descolonización podrían ser tan largos como los de tratamiento descritos anteriormente.
- 15
- 20
- 25
- 30 Una composición de bacteriófagos para su uso como medicamento puede administrarse por cualquier vía seleccionada en función de la afección a tratar. En una realización, la vía de administración es nasal, oral, pulmonar, parenteral, intramuscular, intravenosa, subcutánea, transdérmica, ocular, auricular o combinaciones de las mismas. En algunas realizaciones, la vía de administración es oral. La composición puede administrarse al paciente por más de una vía, por ejemplo, oral e intravenosa.
- 35 En una realización, puede administrarse un antibiótico (de modo adecuado un antibiótico químico) en combinación con la composición de bacteriófagos de la invención. La administración combinada de antibióticos y bacteriófagos se divulga en los documentos WO 2008/110840 y WO 2005/009451. El antibiótico puede administrarse simultánea o secuencialmente con la composición de bacteriófagos. Convenientemente, uno o más antibióticos pueden administrarse después de la composición, de modo que la replicación del bacteriófago se haya establecido antes de que comience el tratamiento antibiótico. En este caso, el tratamiento antibiótico puede retrasarse una o más horas o días desde la aplicación de dichos uno o más bacteriófagos, por ejemplo, de 1 a 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 días. Cuando se emplea una composición de bacteriófagos que comprende una pluralidad de bacteriófagos y cada miembro de la composición presenta una especificidad de cepa diferente, bastará con que al menos una proporción (por ejemplo, uno o más bacteriófagos) de la composición sea capaz de dirigirse a la infección bacteriana.
- 40
- 45 Así, en algunas realizaciones una composición de bacteriófagos comprende uno o más antibióticos, tales como uno o más antibióticos químicos. Puede seleccionarse un antibiótico en función de la sensibilidad de la especie o cepa diana a dicho antibiótico. Convenientemente, la especie o cepa puede ser la misma especie o cepa presente en un sujeto a tratar. En una realización, se toma una especie o cepa de un sujeto a tratar y se prueba su sensibilidad a los antibióticos. La sensibilidad se puede determinar por ensayos de sensibilidad *in vitro* conocidos en la técnica.
- 50 Como alternativa, o además, se puede seleccionar un antibiótico porque se sabe que es activo contra una bacteria que se sabe que está presente (o se piensa que es probable que esté presente) junto con una infección bacteriana a tratar (por ejemplo, como parte de una biopelícula bacteriana).
- 55 En una realización y sin limitación, un antibiótico es uno o más seleccionados entre: una penicilina, una lincosamida, una monobactama, una cefalexina, un macrólido, una fluoroquinolona, una sulfonamida, una tetraciclina, una cefalosporina, una cefamicina, un carbapenem, una gliciliciclina, un fenicol, un inhibidor de la vía del folato, una polimixina, un ácido fosfónico, un nitroimidazol o un aminoglucósido.
- 60 En una realización, un uso o procedimiento de la divulgación comprende: a. la administración de una composición de bacteriófagos a un sujeto *in vivo*; b. el seguimiento *in vitro* de la sensibilidad de una muestra de células bacterianas de una infección (por ejemplo, presente en el sujeto) o de otra infección por la misma cepa a uno o más antibióticos; y c. la administración de dicho antibiótico o antibióticos, cuando se ha establecido que se ha inducido dicha sensibilidad a dicho antibiótico o antibióticos.

- 5 En una realización, el antibiótico (por ejemplo, antibiótico químico) se administra en un periodo de tiempo en el que la sensibilidad de las bacterias muestreadas al antibiótico es inducida por la composición. En algunas realizaciones, el periodo de tiempo puede ser de al menos 12, 24 o 48 horas. En otras realizaciones, la composición de bacteriófagos y el antibiótico pueden administrarse a intervalos de un día a dos meses, preferentemente a intervalos de una a cuatro semanas, convenientemente a intervalos de dos semanas.
- 10 En algunas realizaciones, se describen en el presente documento procedimientos para restablecer la sensibilidad a uno o más antibióticos mediante la administración de una composición como se describe en el presente documento. En algunas realizaciones, en el presente documento se proporcionan procedimientos para alterar una biopelícula mediante la administración de una composición como se describe en el presente documento. En algunas realizaciones, en el presente documento se proporcionan procedimientos para destruir una biopelícula mediante la administración de una composición como se describe en el presente documento.
- 15 En algunas realizaciones, la composición de bacteriófagos descrita en el presente documento puede administrarse con al menos un tratamiento adicional contra el cáncer. En una realización, dicho al menos un tratamiento adicional contra el cáncer comprende un agente inmunoterapéutico. Los agentes inmunoterapéuticos incluyen, por ejemplo y sin limitación, inhibidores de puntos de control, anticuerpos antitumorales (anticuerpos terapéuticos), vacunas contra el cáncer y otros tratamientos contra el cáncer que refuerzan el sistema inmunitario. En una realización, el agente de inmunoterapia comprende anti-PD-1, anti-PD-L1, anti-CTLA-4, anti-CD27 o anti-IDO-1. Algunos ejemplos de inhibidores de PD-1 incluyen, entre otros, pembrolizumab, nivolumab, pidilizumab, AMP-224, AMP-514 y PDR001. Algunos ejemplos de inhibidores de PD-L1 incluyen, entre otros, atezolizumab, avelumab, durvalumab y BMS-936559.
- 20 En algunas realizaciones, dichos uno o más agentes adicionales comprenden un agente quimioterapéutico. En una realización, el agente quimioterapéutico es 5-fluorouracilo (5-FU), capecitabina, irinotecán, oxaliplatino, trifluridina y/o tipiracilo. Otros agentes anticancerosos adicionales, incluidos los agentes adicionales de inmunoterapia y quimioterapia, son bien conocidos en la técnica.
- 25 El tipo y la dosis del agente anticanceroso pueden ser determinados por un médico experto. Por ejemplo y sin limitación, los agentes anticancerosos aprobados para cánceres de estómago (gástricos) incluyen Cyramza (ramucirumab), docetaxel, clorhidrato de doxorubicina, 5-FU (inyección de fluorouracilo), fluorouracilo inyectable, Herceptin (trastuzumab), mitomicina C, Mitozytrex (mitomicina C), Mutamycin (mitomicina C), ramucirumab, Taxotere (docetaxel), trastuzumab, FU-LV, TPF, XELIRI. Los agentes anticancerosos aprobados para el cáncer de colon y/o recto incluyen, por ejemplo y sin limitación, Avastin (bevacizumab), Camptosar (clorhidrato de irinotecán), capecitabina, cetuximab, Cyramza (ramucirumab), Eloxatin (oxaliplatina), Erbitux (cetuximab), 5-FU (inyección de fluorouracilo), fluorouracilo inyectable, clorhidrato de irinotecán, leucovorina calcio, Lonsurf (trifluridina y clorhidrato de tipiracilo), nivolumab, Opdivo (nivolumab), oxaliplatino, panitumumab, ramucirumab, regorafenib, Stivarga (regorafenib), trifluridina clorhidrato de tipiracilo, Vectibix (panitumumab), Wellcovorin (leucovorina calcio), Xeloda (capecitabina), Zaltrap (Ziv-aflibercept), Ziv-aflibercept, CAPOX, FOLFIRI, FOLFIRI-BEVACIZUMAB, FOLFIRI-CETUXIMAB, FOLFOX, FU-LV, XELIRI y XELOX.
- 30 La presente invención también proporciona un kit que comprende: una composición de bacteriófagos según la invención; e instrucciones para el uso de la misma (por ejemplo, en medicina). El kit puede comprender además un agente adicional, tal como un antibiótico (por ejemplo, un antibiótico químico), un agente inmunoterapéutico o un agente quimioterapéutico, y opcionalmente instrucciones para su uso junto con la composición de bacteriófagos.
- 35 En una realización, las instrucciones proporcionan detalles para administrar una composición de bacteriófagos de la invención como se describe en el presente documento.
- 40 A menos que se definan de otro modo, todos los términos y expresiones técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende habitualmente un experto en la técnica a la que pertenece la divulgación. Singleton, *et al.*, DICTIONARY OF MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY, 20^a ed., John Wiley and Sons, Nueva York (1994), y Hale y Marham, THE HARPER COLLINS DICTIONARY OF BIOLOGY, Harper Perennial, NY (1991) proporcionan al experto un diccionario general de muchos de los términos y expresiones utilizados en la presente divulgación.
- 45 La presente divulgación no está limitada por los procedimientos y materiales de ejemplo divulgados en el presente documento, y cualquier procedimiento y material similar o equivalente a los descritos en el presente documento puede ser utilizado en la práctica o ensayo de las realizaciones de la presente divulgación. Los intervalos numéricos incluyen los números que definen el intervalo. Los epígrafes proporcionados en el presente documento no constituyen limitaciones de los diversos aspectos o realizaciones de la presente divulgación que pueden considerarse como referencia a la memoria descriptiva en su conjunto.
- 50 Antes de que los ejemplos de realizaciones se describan con mayor detalle, debe comprenderse que la presente divulgación no se limita a las realizaciones concretas descritas, ya que éstas pueden, por supuesto, variar. También debe entenderse que la terminología usada en el presente documento tiene el propósito de describir realizaciones concretas únicamente y no pretende ser limitante, ya que el alcance de la presente divulgación estará limitado únicamente por las reivindicaciones adjuntas.
- 55

- 5 Cuando se proporciona un intervalo de valores, se entiende que cada valor intermedio, hasta la décima parte de la unidad del límite inferior a menos que el contexto indique claramente lo contrario, entre los límites superior e inferior de ese intervalo también se divulga específicamente. Cada intervalo más pequeño entre cualquier valor indicado o valor intermedio en un intervalo indicado y cualquier otro valor indicado o intermedio en ese intervalo indicado está incluido en la presente divulgación. Los límites superiores e inferiores de estos intervalos más pequeños pueden incluirse o excluirse independientemente en el intervalo, y cada intervalo en que se incluyen cualquiera, ninguno o ambos límites en los intervalos más pequeños también está incluido en la presente divulgación, sometido a cualquier límite excluido específicamente en el intervalo indicado. Cuando el intervalo declarado incluye uno o ambos límites, los intervalos que excluyen uno o ambos límites incluidos también se incluyen en la presente divulgación.
- 10 Las publicaciones analizadas en el presente documento se proporcionan únicamente para su divulgación antes de la fecha de presentación de la presente solicitud. Nada de lo expuesto en el presente documento debe interpretarse como una admisión de que dichas publicaciones pertenezcan a la técnica anterior de las reivindicaciones adjuntas.

A continuación, la invención se describirá, únicamente a modo de ejemplo, en referencia a los siguientes ejemplos y figuras.

15 Ejemplos

Ejemplo 1: Ensamblaje del cóctel de bacteriófagos

- En estudios con animales, se utiliza un cóctel de dos a cuatro bacteriófagos, que juntos tienen una amplia actividad contra un panel de aislados clínicos diversos recientes de *E. coli*. En un procedimiento de ejemplo, los lisados de fagos se preparan utilizando uno o más hospedadores de fabricación (por ejemplo, cepas de *E. coli* números SPS69, SPS759, SPS765, SPS932), preferentemente que no liberan profagos endógenos durante el ciclo de producción. Los cultivos se cultivan en biorreactores hasta una DO₆₀₀ de 0,2 antes de añadir los fagos. Se continúa la incubación a 37 °C y se lee la absorbancia al menos cada 60 minutos. Los cultivos se recogen tras la lisis bacteriana, y las impurezas se separan de los fagos con varias etapas de filtración, seguidas de etapas cromatográficas que permiten la reducción de restos, tales como proteínas de la célula hospedadora y ADN de la célula hospedadora, de forma que las valoraciones finales de fagos sean $\geq 1 \times 10^{11}$ UFP/ml. Al final del proceso, se cambia el tampón y todo el material se esteriliza por filtración (filtro de 0,22 µm) y se conserva a 2-8 °C. Pueden utilizarse ensayos de placa para valorar las soluciones madre de fagos (Carlson, K., en E. Kutter y A. Sulakvelidze (ed.), *Bacteriophages: Biology and Application*, (2005), 437-494, CRC Press, Boca Ratón, FL., Hyman, P., *et al.*, *Meth. Mol. Biol.* (2009), 501:175-202). Las muestras de fagos purificados se diluyen 1:10, 1:100 o 1:1000 para obtener las soluciones de administración y posteriormente se combinan de forma que cada fago esté presente en el cóctel final en la concentración deseada (por ejemplo, aproximadamente 2×10^{10} o 2×10^9 o 2×10^8 UFP/ml) por fago. Se determinan los niveles finales de endotoxinas.

Ejemplo 2: Aislamiento y caracterización de fagos

- Los siguientes experimentos se llevaron a cabo en un esfuerzo por evaluar en modelos preclínicos el potencial de los bacteriófagos como sustancias terapéuticas dirigidas para los cánceres provocados por *E. coli* y *B. fragilis*.
- 35 Las cepas bacterianas pertinentes fueron proporcionadas por la Universidad Johns Hopkins. Se recibieron tres cepas de bacterias: 1. *Bacteroides fragilis* 086 (resistente a la clindamicina) - AmpliPhi n.º ID 2849; 2. *Bacteroides fragilis* NCTC 9343 (sensible a la clindamicina) - AmpliPhi n.º ID 2850; 3. *E. coli* PL1 (*pks+* *E. coli*) - AmpliPhi n.º ID 2851.

Aislamiento y caracterización de fagos de *Bacteroides*

- 40 Las cepas de *Bacteroides fragilis* se cultivaron anaeróticamente en placas de agar BHI/extracto de levadura/L-cisteína suplementadas con hemina y vitamina K1 según lo solicitado por la JHU y se prepararon soluciones madres sobre esferas y en caldo de glicerol al 30 %/BHI. Las soluciones madre se conservaron almacenaron congeladas a -80 °C.

- Se procedió al aislamiento de los fagos de los aislados de *Bacteroides fragilis*. Utilizando muestras de aguas residuales de la zona de Sídney (Australia), se aislaron con éxito fagos contra *B. fragilis* n.º ID 2849. Se llevó a cabo la purificación en placa de cuatro fagos seleccionados (elegidos de forma preliminar en función de su diferente morfología de placa y del origen de las muestras de aguas residuales) y se prepararon soluciones maestras en tampón de fagos. Las soluciones maestras de investigación de los fagos de *Bacteroides fragilis* Bf1, Bf2, Bf3 y Bf4, dirigidos contra *Bacteroides fragilis* 086 (n.º ID 2849), se propagaron por el procedimiento de la placa y se caracterizaron posteriormente como se describe en la tabla 1.

- 50 Procedimiento de la placa: Para propagar los fagos se utilizaron placas de agar BHI/extracto de levadura/L-cisteína suplementadas con hemina y vitamina K1. Se preparó una dilución de bacteriófago que probablemente produjera placas con "lisis confluyente" y se mezcló con una parte alícuota de un cultivo en caldo BHI/extracto de levadura/L-cisteína suplementado con hemina y vitamina K1 de *Bacteroides fragilis* 086 (n.º ID 2849). Se aplicaron 3 ml de agar semisólido BHI/extracto de levadura/L-cisteína suplementado con hemina y vitamina K1 templado a 47,5 °C (+/-2,5) en un baño de agua a la superficie de las placas de agar BHI/extracto de levadura/L-cisteína. Las placas se incubaron en condiciones anaerobias a 37 °C durante toda la noche. Se añadió tampón sal-magnesio (SM) a las placas a 4 °C

durante la noche para eluir los bacteriófagos. A continuación, los fagos eluidos se filtraron a través de un filtro PES de 0,22 µm y se conservaron a 4 °C.

Tabla 1. Características de los fagos de *Bacteroides fragilis*

AmpliPhi Fago n.º ID	AmpliPhi Cepa hospedara n.º ID	Diámetro y descripción de la placa	Peso molecular estimado del genoma (kb)	Valoración de la solución maestra
				(UFP/ml)
Bf1	2849	1,5 mm, transparente	43	1,1×10 ¹⁰
Bf2	2849	2 mm, transparente, halo pequeño	45	1,3×10 ¹¹
Bf3	2849	<1 mm, transparente	46	6,0×10 ¹⁰
Bf4	2849	1 mm, transparente	46,5	3,0×10 ¹⁰

5 La actividad de los fagos Bf1, Bf2, Bf3 y Bf4 contra el *Bacteroides fragilis* sensible a la clindamicina (n.º ID 2850) se realizó por el procedimiento de prueba de manchas.

Procedimiento: La actividad de los fagos se evaluó mediante el procedimiento de la prueba de manchas (una modificación del procedimiento de superposición de pequeñas gotas sobre agar (Mazzocco, 2009)). Brevemente, el cultivo bacteriano planctónico se mezcló con agar diluido fundido y se vertió uniformemente sobre una placa de agar. Una vez fraguada la capa superior de agar, se aplicaron en forma de mancha diluciones seriadas de soluciones de fagos normalizadas y las placas se incubaron toda la noche a 37 °C. La actividad de los fagos se indica por el aclaramiento del césped bacteriano en el lugar de aplicación de los fagos y por el desarrollo de placas individuales a medida que se diluye la muestra de fagos. Las cepas sólo se consideraron sensibles si podían observarse placas discretas a medida que se diluía la muestra, lo que indicaba la replicación del fago además de la muerte celular.

10 Los resultados se presentan en la tabla 2. Dos de los fagos, Bf1 y Bf3, que se habían aislado contra *B. fragilis* n.º ID 2849 también eran activos contra *B. fragilis* n.º ID 2850

Tabla 2. Alcance de la actividad en hospedadores de 8 fagos contra *B. fragilis*

	Bf1	Bf2	Bf3	Bf4
Cepa bacteriana n.º ID 2849	1,10E+10	1,30E+11	6,00E+10	300E+10
Resistente a la clindamicina				
Cepa bacteriana n.º ID 2850	1,00E+05	0	1,35E+08	0
Sensible a la clindamicina				

Confirmación de la actividad *in vitro* en cultivo con caldo

20 La actividad de los cuatro fagos de *B. fragilis* también se evaluó *in vitro* en cultivo líquido en un intento de comprender el proceso de infección por los fagos a lo largo del tiempo.

Procedimiento: Se prepararon placas de cultivo de 96 pocillos, conteniendo cada pocillo de prueba 200 µl de un cultivo nocturno 1/100 de *B. fragilis* n.º ID 2849 o *B. fragilis* n.º ID 2850 en caldo BHI/extracto de levadura/L-cisteína suplementado con hemina y vitamina K1. Se añadieron 20 µl de los fagos Bf1 a Bf4 y 20 µl de la mezcla de fagos (los 4 fagos) a los pocillos correspondientes y se incluyeron pocillos de control que sólo contenían bacterias. Las placas se incubaron anaerómicamente durante 21 horas. Se tomaron lecturas de DO a 500-700 nm (programa de crecimiento celular) en el lector de placas Spectrostar a Tiempo = 0 y de nuevo a T = 6 horas y T = 21 horas.

25 Los resultados obtenidos en el cultivo con caldo para *B. fragilis* n.º ID 2849 reflejan los observados en la prueba de manchas, y cada fago y la mezcla inhibían el crecimiento de la bacteria (figura 1).

En la prueba de manchas, sólo Bf1 y Bf3 mostraron un crecimiento activo contra *B. fragilis* n.º ID 2850. Los resultados en el cultivo con caldo demostraron que Bf1, Bf3 y la mezcla de fagos impiden el crecimiento de las bacterias, lo que refleja los resultados observados en medios sólidos en la prueba de manchas (figura 2).

Pruebas de estabilidad del pH de los fagos de *B. fragilis*

- 5 Se probó la estabilidad a pH bajo de los cuatro fagos para determinar su idoneidad para la administración por sonda en el modelo de ratón y la posible administración oral en la clínica.

Procedimiento: Cada uno de los cuatro fagos se diluyó en tampón SM de pH 7,5 para obtener una concentración inicial de aproximadamente 10^9 UFP/ml. A continuación, los fagos se diluyeron 1/10 a partir de este material de partida en tampón SM de pH 7,5 (neutro) y tampón SM de pH 3,0 (bajo). Tras la incubación a 37 °C durante 1 hora, las muestras se diluyeron en serie en tampón SB (pH 7,5) para evaluar la valoración mediante la prueba de manchas, tal como se ha descrito anteriormente. Los resultados se muestran en la tabla 3.

10

Tabla 3. Resultados de la estabilidad de pH

	Valoración (UFP/ml)	Valoración (UFP/ml)
	pH 7,5	
		pH 3,0
Bf1	$1,1 \times 10^7$	$8,0 \times 10^6$
Bf2	$1,2 \times 10^8$	$8,0 \times 10^7$
Bf3	$6,0 \times 10^7$	$4,4 \times 10^7$
Bf4	$1,8 \times 10^7$	$9,0 \times 10^6$

15

Los fagos de *Bacteroides* Bf1, Bf2, Bf3 y Bf4 son resistentes a un pH bajo de 3,0 a 37 °C durante 1 hora, lo que los convierte en buenos candidatos para la administración oral.

Ejemplo 3. Aislamiento y caracterización de fagos de *E. coli*

Se cultivó una cepa *pks+* de *E. coli* en agar nutriente y se prepararon soluciones madre sobre esfera y en caldo de glicerol al 30 %/nutriente. Las soluciones madre se conservaron almacenaron congeladas a -80 °C.

20

La cepa diana de *E. coli* (*pks+* *E. coli*) AmpliPhi n.º ID 2851 se sometió a pruebas de manchas (como se ha descrito anteriormente) con cuatro fagos de *E. coli* (Ec34, Ec35, Ec45 y Ec57) que habían sido preseleccionados e identificados como componentes terapéuticos potenciales en un producto de investigación de *E. coli*.

Se predice que todos estos fagos son obligatoriamente líticos con poco potencial de transducción, y no se identificaron genes de resistencia a fármacos ni de virulencia bacteriana en sus genomas.

Tabla 4. Características de algunos fagos de *E. coli*

Fago	Tamaño (Kb)	Morfología prevista	n.º de genes codificantes de proteínas
Ec34	167,9	miovirus	271
Ec35	167,2	miovirus	271
Ec45	167,5	miovirus	267
Ec57	167,0	miovirus	270

25

Tabla 5. Alcance de la actividad en hospedadores de fagos de *E. coli* seleccionados

	Ec34	Ec35	Ec45	Ec57
<i>E. coli</i> n.º ID 2851	2,00E+07	2,00E+08	2,00E+06	4,00E+07

Confirmación de la actividad *in vitro* en cultivo con caldo

5 Procedimiento: Se prepararon placas de cultivo de 96 pocillos, conteniendo cada pocillo de prueba 200 µl de un cultivo nocturno 1/100 de *E. coli* PL1 (*pks+* *E. coli*) AmpliPhi n.º ID 2851 en caldo nutritivo. Se añadieron veinte (20) µl de los fagos Ec34, Ec35, Ec45 y Ec57 y de la mezcla de fagos D (combinación de Ec34, Ec45 y Ec57) a los pocillos correspondientes. Se incluyeron pocillos de control que sólo contenían bacterias. Las placas se situaron en el lector de placas Spectrostar y se incubaron a 37 °C con agitación. Las lecturas de DO a 600 nm se realizaron cada 15 minutos durante 16 horas.

10 El crecimiento de la *E. coli* (*pks+* *E. coli*) - AmpliPhi n.º ID 2851 fue parcialmente reducido por los fagos individuales Ec34, Ec35, y Ec57. Ec45 no mostró ningún efecto sobre el crecimiento de las bacterias.

La mezcla D (Ec34, Ec35 y Ec57) impidió totalmente el crecimiento. Esto indica que el efecto bactericida colectivo de la combinación de 3 fagos fue mayor que los simples efectos aditivos de los fagos individuales.

Ejemplo 4. Demostración de la eficacia en un modelo de ratón

15 Se pueden realizar pruebas de fagos dirigidos a *E. coli* y/o fagos dirigidos a *B. fragilis* en un modelo preclínico (modelo de ratón AOM de cáncer colorrectal) para demostrar la eficacia (impacto en la supervivencia).

20 Ratones C57BL/6J sin patógenos específicos ("specific pathogen free", SPF) son tratados con AOM (azoximetano) (10 mg/kg semanales durante 6 semanas). El AOM induce cáncer colorrectal en ratones y ratas. El AOM se administra semanalmente hasta el momento de obtener los resultados de los ratones. Antes de la inoculación de las cepas bacterianas, se administra a ratones de 6 semanas agua con cefoxitina 500 mg/l durante 48 horas. El tratamiento con cefoxitina da lugar a una ausencia de bacterias detectables mediante cultivo o qPCR de ARNr 16S a las 24 horas (C. E. DeStefano Shields, S. W. Van Meerbeke, F. Housseau, H. Wang, D. L. Huso, R. A. Casero Jr., H. M. O'Hagan, C. L. Sears, Reduction of murine colon tumorigenesis driven by enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* using cefoxitin treatment, J. Infect. Dis., 214, 122-129 (2016)). Tras retirar el agua con antibiótico durante 24 horas, los ratones se inoculan por sonda oral con 10⁹ unidades formadoras de colonias (ufc) de ETBF o 10⁸ ufc de *pks+* *E. coli* o una mezcla que contenía 25 10⁸ ufc de cada cepa. La colonización se confirma y cuantifica mediante la recogida y el cultivo de heces en medios selectivos.

El tratamiento con bacteriófagos con las composiciones proporcionadas en el presente documento puede proporcionarse en un subconjunto de ratones experimentales. Se podría analizar la supervivencia de los ratones tratados y no tratados con bacteriófagos.

30 Ejemplo 5. Evaluación del impacto del tratamiento con bacteriófagos en el microbioma gastrointestinal

Para comprobar si la eliminación de cepas patógenas de *E. coli* y/o *B. fragilis* conduce a la repoblación del microbioma por cepas benignas de la misma especie, se lleva a cabo un análisis del microbioma.

35 Se han descrito protocolos para el análisis del microbioma (por ejemplo, Front Cell Infect Microbiol., 2018, 8: 301). Uno de estos protocolos incluye la recogida de heces, la extracción de ADN y la secuenciación de la región V4 del gen de ARNr 16S. En estos experimentos, se procede a la recogida de heces y la muestra se congela inmediatamente a -20 °C sin conservante. Como alternativa, pueden utilizarse reactivos, tales como OMNIgene GUT, etanol al 95 %, RNAlater y tarjetas de Flinders Technology Associates (FTA). Se incluyen muestras de un paciente antes y después del tratamiento con bacteriófagos con el fin de evaluar el impacto del tratamiento con bacteriófagos en los perfiles del microbioma.

40 Se utilizan procedimientos convencionales de extracción de ADN. Uno de estos procedimientos incluye la extracción de ADN total a partir de muestras de heces con el kit de aislamiento de ADN PowerLyzer PowerSoil (MO BIO laboratories Inc., Carlsbad, CA), siguiendo el protocolo del fabricante. El ADN se aísla mediante purificación en columna y se recoge en 100 µl de tampón de elución (solución C6).

45 Puede realizarse la amplificación por PCR, por ejemplo, de la región hipervariable V4 del gen de ARNr 16S utilizando los cebadores 16SV4_515F y 16SV4_806R (Caporaso J. G., Lauber C. L., Walters W. A., Berg-Lyons D., Huntley J., Fierer N., *et al.* (2012), Ultra-high-throughput microbial community analysis on the illumina HiSeq and MiSeq platforms, ISME J., 6, 1621-1624), cada uno con códigos de barras Golay distintivos de 12 pb, lo que da como resultado códigos de barras duales distintivos para cada par de cebadores directo e inverso. Las reacciones de PCR se realizan con el ADN extraído utilizando las condiciones de termociclado adecuadas, tales como una desnaturalización inicial a 95 °C

durante 5 min; seguida de 15 ciclos a 95 °C durante 1 min, 55 °C durante 1 min y 68 °C durante 1 min; seguido de 15 ciclos a 95 °C durante 1 min, 60 °C durante 1 min y 68 °C durante 1 min; y una extensión final durante 10 min a 68 °C.

5 Los productos de PCR de doble índice se aíslan y combinan y se ensayan 100 µl de los productos combinados en un gel de agarosa al 4 % a 80 V durante 2 h. Las bandas (aproximadamente 450 pb) pueden extraerse del gel de agarosa y purificarse utilizando un kit de extracción en gel QIAquick (QIAGEN, Valencia, CA) y eluirse en 30 µl de tampón de elución.

10 Se puede preparar un banco de secuenciación utilizando, por ejemplo, el kit de preparación de bancos KAPA LTP (Roche Sequencing Solutions, Pleasanton, CA) de acuerdo con el protocolo del fabricante. La secuenciación de amplicones de alto rendimiento se realiza, por ejemplo, en un MiSeq (Illumina, San Diego, CA) utilizando lecturas de fragmentos de extremos apareados 2 × 300.

El análisis bioinformático del microbioma puede realizarse utilizando un programa informático adecuado, tal como, por ejemplo, entre otros, el paquete informático Quantitative Insights Into Microbial Ecology (QIIME), versión 1.9 (Caporaso J. G., Kuczynski J., Stombaugh J., Bittinger K., Bushman F. D., Costello E. K., *et al.* (2010), QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data, *Nat. Methods*, 7, 335-336).

15 Diversas modificaciones y variaciones de los procedimientos y sistemas descritos de la presente invención serán evidentes para los expertos en la materia. Aunque la invención ha sido descrita en relación a realizaciones preferidas específicas, debe entenderse que la invención según las reivindicaciones no debe considerarse indebidamente limitada a dichas realizaciones específicas. En efecto, se pretende que diversas modificaciones de los modos descritos para llevar a cabo la invención, que resultan evidentes para los expertos en el campo de la bioquímica y la biotecnología o campos relacionados, se encuentren comprendidos dentro del alcance según las siguientes reivindicaciones.

20

REIVINDICACIONES

1. Una composición de bacteriófagos que comprende uno o más bacteriófagos obligatoriamente líticos que infectan y lisan una bacteria cancerígena, en la que cada bacteriófago individual no porta genes de resistencia a antibióticos, y en la que la composición está sustancialmente exenta de componentes bacterianos, en la que:
- 5 a) el bacteriófago se selecciona entre Ec20 (SEQ ID NO: 1), Ec34 (SEQ ID NO: 2), Ec35 (SEQ ID NO: 3), Ec45 (SEQ ID NO: 4), Ec56 (SEQ ID NO: 5) y Ec57 (SEQ ID NO: 6) y en la que la bacteria diana es *Escherichia coli*, opcionalmente en la que el bacteriófago es Ec34 (SEQ ID NO: 2), Ec35 (SEQ ID NO: 3), Ec45 (SEQ ID NO: 4) y Ec57 (SEQ ID NO: 6) o en la que el bacteriófago es Ec34 (SEQ ID NO: 2), Ec35 (SEQ ID NO: 3) y Ec57 (SEQ ID NO: 6), comprendiendo opcionalmente una proporción de aproximadamente 1:1 de al menos dos de las cepas de bacteriófagos; o
- 10 b) se selecciona de Bf1 (n.º de registro 040219-02), Bf2 (n.º de registro 040219-03), Bf3 (n.º de registro 040219-04) y Bf4 (n.º de registro 040219-05), y en la que la bacteria diana es *Bacteroides fragilis*, comprendiendo opcionalmente una proporción de aproximadamente 1:1 de al menos dos de las cepas de bacteriófagos.
- 15 2. La composición de bacteriófagos según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además un crioprotector, en la que el crioprotector comprende glicerol, opcionalmente en la que el crioprotector comprende glicerol al 5-50 % o sacarosa al 10 %.
3. La composición de bacteriófagos según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la composición está congelada, liofilizada, es líquida o sólida, en la que la composición comprende además un crioprotector para el almacenamiento a temperaturas de aproximadamente 0 °C a aproximadamente -80 °C, o de aproximadamente 0 °C a aproximadamente -20 °C.
- 20 4. Una composición o bacteriófago según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, para su uso como medicamento.
5. Un bacteriófago o composición según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, para su uso en un procedimiento de tratamiento de un cáncer causado por una infección por una bacteria, en los que el cáncer es un cáncer colorrectal causado por una infección por la bacteria *E. coli* y/o la bacteria *B. fragilis*.
- 25 6. Una composición que comprende al menos dos bacteriófagos, para su uso en un procedimiento de tratamiento o prevención de un cáncer, en la que el cáncer es un cáncer colorrectal causado por una infección por la bacteria *E. coli* y/o la bacteria *B. fragilis*, y además en la que los bacteriófagos se dirigen a las bacterias, en la que:
- 30 a) el bacteriófago se selecciona entre Ec20 (SEQ ID NO: 1), Ec34 (SEQ ID NO: 2), Ec35 (SEQ ID NO: 3), Ec45 (SEQ ID NO: 4), Ec56 (SEQ ID NO: 5) y Ec57 (SEQ ID NO: 6) y en la que la bacteria diana es *Escherichia coli*, opcionalmente en la que el bacteriófago es Ec34 (SEQ ID NO: 2), Ec35 (SEQ ID NO: 3), Ec45 (SEQ ID NO: 4) y Ec57 (SEQ ID NO: 6) o en la que el bacteriófago es Ec34 (SEQ ID NO: 2), Ec35 (SEQ ID NO: 3) y Ec57 (SEQ ID NO: 6), comprendiendo opcionalmente una proporción de aproximadamente 1:1 de al menos dos de las cepas de bacteriófagos; o
- 35 b) se selecciona de Bf1 (n.º de registro 040219-02), Bf2 (n.º de registro 040219-03), Bf3 (n.º de registro 040219-04) y Bf4 (n.º de registro 040219-05), y en la que la bacteria diana es *Bacteroides fragilis*, comprendiendo opcionalmente una proporción de aproximadamente 1:1 de al menos dos de las cepas de bacteriófagos.
- 40 7. La composición o la composición para su uso según cualquier reivindicación anterior, en la que la composición comprende al menos de aproximadamente 1×10^5 y 1×10^{11} UPF de bacteriófagos totales por mililitro de composición de al menos una de las cepas de bacteriófagos, opcionalmente en la que la composición comprende entre 1×10^5 y 1×10^{11} UPF de cada bacteriófago.
8. La composición o la composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que:
- 45 a) la composición comprende además un vehículo, diluyente, excipiente o combinaciones de los mismos farmacéuticamente aceptables, opcionalmente en la que el vehículo, diluyente, excipiente o combinaciones de los mismos farmacéuticamente aceptables comprenden sal de calcio o sal de magnesio; o
- b) la composición comprende además un antibiótico (por ejemplo, un antibiótico químico) o es adecuada para su administración con un antibiótico.
- 50 9. La composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que las bacterias:
- a) se **caracterizan por** la presencia de una biopelícula bacteriana; y/o
- b) son resistentes a antibióticos.

10. La composición o la composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, formulada para la administración oral, nasal, parenteral, intramuscular, intravenosa o subcutánea.
- 5 11. La composición o la composición para su uso según cualquier reivindicación anterior, en la que las especies bacterianas son *E. coli* y/o *B. fragilis*, opcionalmente en la que las *E. coli* son *E. coli pks+* y/o en la que los *B. fragilis* son *Bacteroides fragilis* enterotoxigénicos (ETBF).
12. La composición para su uso según cualquier reivindicación anterior, adecuada para su administración en combinación con un agente inmunoterapéutico, opcionalmente en la que el agente inmunoterapéutico comprende un inhibidor de punto de control inmunitario, opcionalmente en la que el agente inmunoterapéutico comprende anti-PD-1, anti-PD-L1, anti-CTLA-4, anti-CD27 o anti-IDO-1.
- 10 13. La composición para su uso según cualquier reivindicación anterior, que comprende además la administración junto combinación con un agente quimioterapéutico, opcionalmente en la que el agente quimioterapéutico comprende 5-fluorouracilo (5-FU), capecitabina, irinotecán, oxaliplatino, trifluridina y/o tipiracilo.
14. La composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que:
- 15 a) los bacteriófagos de la composición se dirigen a una o más cepas oncogénicas de la bacteria; y/o
- b) la composición minimiza el desarrollo de resistencia bacteriana; y/o
- c) los bacteriófagos son obligatoriamente líticos; y/o
- d) los bacteriófagos son específicos para las bacterias y no se dirigen a otros microorganismos.
15. Un kit que comprende:
- 20 a. Un bacteriófago o composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3; y
- b. Instrucciones para su uso (por ejemplo, en medicina).
16. El kit según la reivindicación 15, que comprende además un antibiótico e instrucciones para el uso del mismo junto con la composición de bacteriófagos, en el que dichas instrucciones son para el uso del mismo en el tratamiento de un cáncer colorrectal causado por una infección por las bacterias *E. coli* y/o *B. fragilis*.
- 25 17. La composición, el uso, el procedimiento o el kit de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en los que los bacteriófagos de la composición infectan y lisan a *E. coli* y/o *B. fragilis*.

FIG. 1

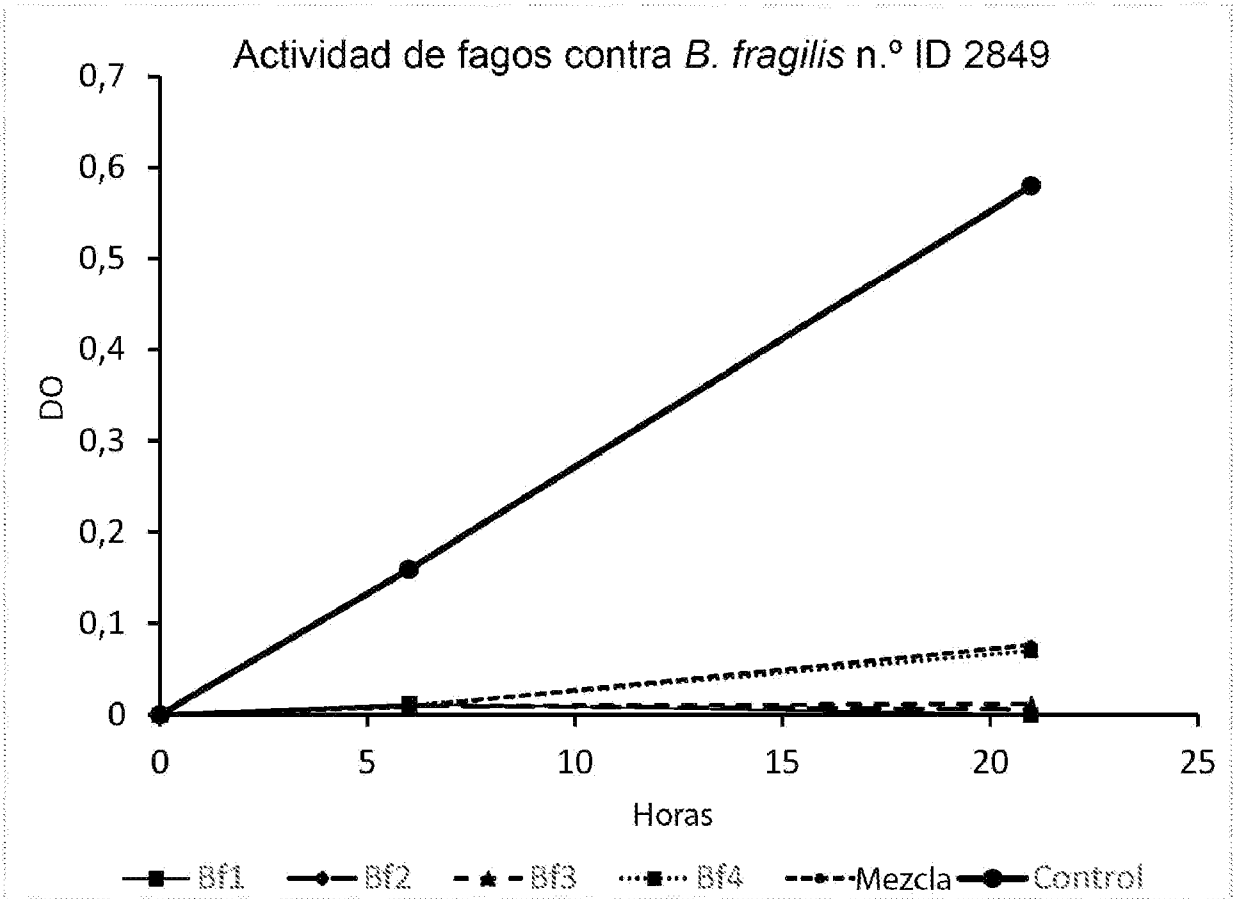


FIG. 2

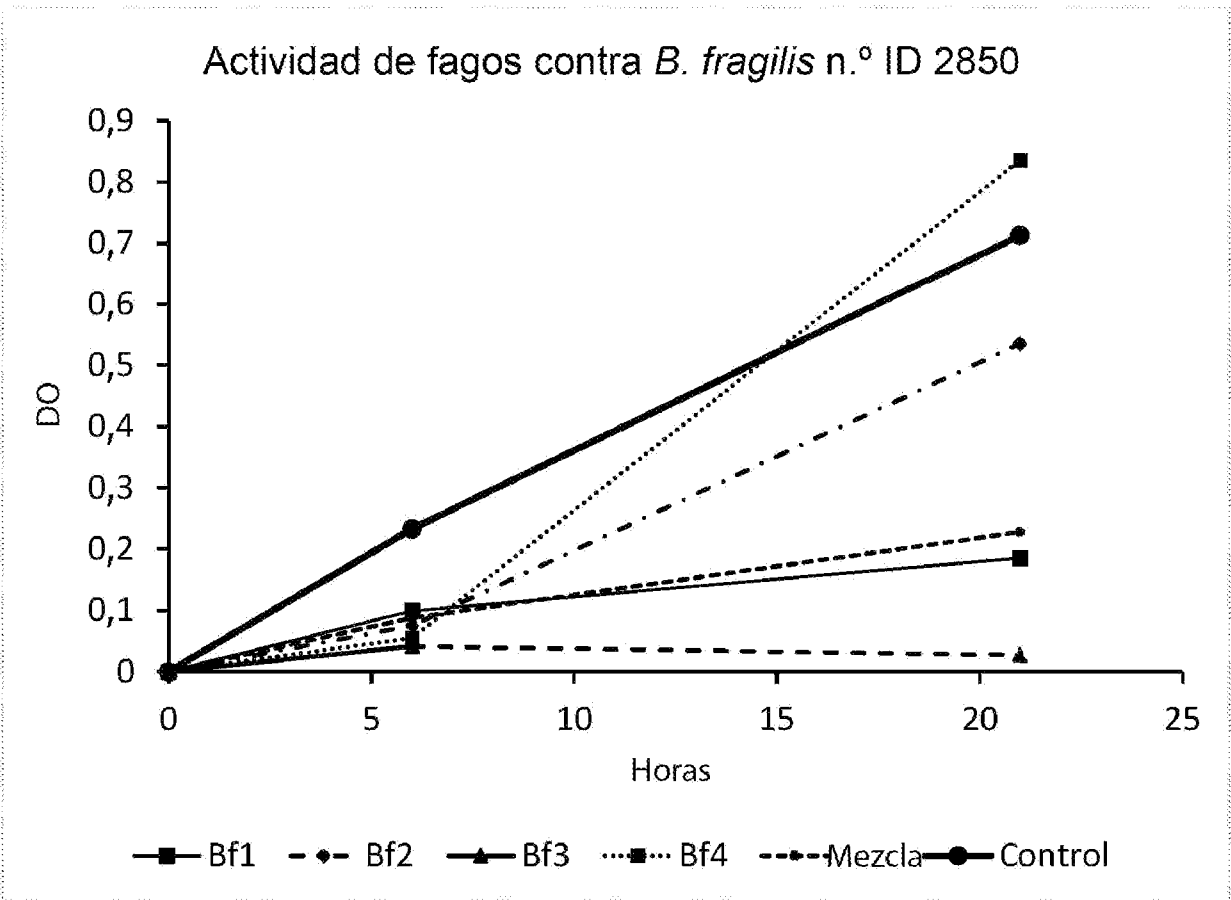


FIG. 3

