

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 402 176**

51 Int. Cl.:

C12N 7/00 (2006.01)

A01N 63/00 (2006.01)

A61K 35/76 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.08.2008 E 08786965 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.02.2013 EP 2179035**

54 Título: **Bacteriófago modificado que incluye un gen de pequeña proteína de esporas soluble en ácido (SASP) alfa/beta**

30 Prioridad:

07.08.2007 GB 0715416

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

29.04.2013

73 Titular/es:

**PHICO THERAPEUTICS LTD (100.0%)
BABRAHAM HALL BABRAHAM
CAMBRIDGE, CAMBRIDGESHIRE CB2 4AT , GB**

72 Inventor/es:

**FAIRHEAD, HEATHER;
WILKINSON, ADAM;
HOLME, SARAH;
PITTS, KATY y
JACKSON, ALISON**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 402 176 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 modificado que incluye un gen de pequeña proteína de esporas soluble en ácido (SASP) alfa/beta

- 5 La presente invención se relaciona con un bacteriófago modificado y con un procedimiento para la producción de un bacteriófago modificado.

Antecedentes de la invención

- 10 *Staphylococcus aureus* es la causa más común de infecciones hospitalarias (infecciones nosocomiales) (Noskin *et al.*, 2005). Con frecuencia, causa infecciones en los pulmones, en heridas, en la piel y en la sangre y, dado el número de toxinas que la bacteria puede producir, estas infecciones pueden ser letales.

- 15 Casi todas las cepas de *S. aureus* son ahora resistentes a la penicilina debido a su capacidad para producir una enzima (penicilinas) que degrada el fármaco, y 45 años después de la introducción de la meticilina en 1959, una penicilina resistente a penicilinas, las cepas de *S. aureus* resistentes a meticilina (MRSA) son endémicas en muchos hospitales. Más recientemente, las cepas de MRSA se han convertido también en un problema en la comunidad. Muchas cepas de MRSA son ahora resistentes a múltiples antibióticos.

- 20 Los niveles de MRSA han ascendido dramáticamente en hospitales tanto en los EE.UU. como en el RU y, además, nuevas cepas de MRSA adquiridas en la comunidad (CA-MRSA) se han propagado rápidamente por todo el globo desde que fueron descritas por primera vez en los últimos años de la década de 1990. Estas cepas de CA-MRSA han demostrado ser altamente transmisibles y con frecuencia son portadoras de un grupo de genes codificantes de la Leucocidina de Panton Valentine, que es una toxina que puede hacer que estas cepas sean altamente virulentas.
25 Existen preocupaciones en cuanto a que estas cepas de CA-MRSA puedan aún sumarse a las dificultades de control de las infecciones por MRSA en los hospitales (Donegan, 2006).

- Ciertamente, el MRSA es actualmente un problema tan serio (y letal) en los hospitales que se está haciendo un esfuerzo significativo en la implementación de medidas de control de la infección como forma de minimización de la propagación de MRSA en los hospitales y de reducción así del número de infecciones. En relación con MRSA en particular, las medidas de control de la infección incluyen, de manera diversa, el uso de desinfectantes para manos por los trabajadores sanitarios; cribado, aislamiento y mantenimiento bajo barrera de pacientes infectados y portadores; y descontaminación de pacientes y de trabajadores sanitarios portadores de MRSA. Ser portador de bacterias se define como la presencia de bacterias, normalmente a un bajo nivel, sin ninguna patología asociada, tal como inflamación. Sin embargo, los portadores de MRSA sí constituyen un riesgo significativo para la propagación de MRSA a la comunidad hospitalaria más amplia, y la eliminación de MRSA de los portadores, particularmente en el momento de la admisión o con anterioridad a ésta, es una parte muy importante del proceso de control de la infección.

- 40 La carga portadora de *S. aureus* (y por lo tanto de MRSA) se produce en y alrededor de la nariz, las axilas, la ingle y el perineo, así como en las lesiones cutáneas superficiales. Una serie de estudios dicen que *S. aureus* es portado en la nariz por un 25 a un 30% de la población general, siendo portado MRSA por alrededor de un 1%. Entre los pacientes hospitalarios, la tasa portadora es significativamente mayor. En los EE.UU., se ha calculado que 89 millones de personas son portadoras de *S. aureus* en la nariz, y de ellos 2,3 millones son portadores de MRSA (Mainous *et al.*, 2006). La eliminación intranasal de MRSA es, por lo tanto, fundamental para controlar la propagación de este organismo potencialmente letal en hospitales.

- Como alternativa a los antibióticos convencionales, una familia de proteínas que demuestran tener actividad antibacteriana de amplio espectro dentro de las bacterias comprende las pequeñas proteínas de esporas solubles en ácido de tipo α/β (conocidas de aquí en adelante como SASP). Dentro de las bacterias, las SASP se unen al ADN bacteriano: la visualización de este proceso, utilizando microscopía crioelectrónica, ha mostrado que SspC, la SASP más estudiada, reviste el ADN y forma dominios prominentes y modifica la estructura del ADN (Francesconi *et al.*, 1988; Frenkiel-Krispin *et al.*, 2004) de tipo B (inclinación 3,4 nm) a tipo A (3,18 nm; el ADN de tipo A tiene una inclinación de 2,8 nm). Las unidades prominentes de SspC interaccionan con filamentos de ADN-SspC adyacentes, empaquetando los filamentos en un ensamblaje apretado de hélices de nucleoproteínas. De este modo, se detiene la replicación del ADN y, donde se unen, las SASP evitan la transcripción del ADN. Las SASP se unen al ADN de una manera no específica de secuencia (Nicholson *et al.*, 1990), de tal forma que las mutaciones en el ADN bacteriano no afectan a la unión de las SASP.

- 60 WO02/40678 describe el uso como agente antimicrobiano de un bacteriófago modificado para incorporar un gen SASP. Con objeto de obtener una producción efectiva del bacteriófago modificado en un huésped bacteriano, el objetivo de WO02/40678 es evitar la expresión del gen SASP durante la proliferación del huésped de producción. Con este fin, se insertó preferiblemente el gen SASP en los genes de lisis del bacteriófago para poner el gen SASP bajo el control de un promotor de gen de lisis que es activo sólo al final del ciclo vital del bacteriófago. Se pensó que se evitaría de otro modo la proliferación del huésped de producción bacteriano debido a la presencia del producto génico SASP, particularmente si el gen SASP estaba bajo el control de un promotor constitutivo. En una disposición

menos preferida, el gen SASP podría localizarse en cualquier otro lugar del cromosoma del bacteriófago y ponerse bajo el control de un promotor de bacteriófago o bacteriano, mediante lo cual se podría dejar que el ciclo lítico siguiera su curso. En esta disposición, el promotor bacteriano sería no constitutivo y podría ser regulado a más por estímulos ambientales.

5 WO2004/13375 describe una combinación de dicho agente antimicrobiano con un antibiótico para tratar la infección bacteriana.

Resumen de la invención

10 Se ha visto ahora sorprendentemente que se puede conseguir una producción efectiva de bacteriófago cuando se ha modificado el bacteriófago para llevar un gen codificante de una SASP bajo el control de un promotor que es controlado independientemente del bacteriófago y que es constitutivo, sin que sea necesaria o se proporcione una regulación exógena o *in trans*. Cuando está presente en múltiples copias, por ejemplo después de infección de las
15 células diana, el promotor impulsa niveles tóxicos de expresión de SASP.

Por consiguiente, en un primer aspecto, la presente invención proporciona un bacteriófago modificado capaz de infectar una bacteria diana, cuyo bacteriófago incluye un gen de pequeña proteína de esporas soluble en ácido α/β (SASP) codificante de una SASP que es tóxica para la bacteria diana, donde el gen SASP está bajo el control de un
20 promotor constitutivo que es extraño para el bacteriófago y el gen SASP, cuyo promotor es lo suficientemente potente como para dirigir la producción de niveles tóxicos de SASP cuando el bacteriófago modificado está presente en múltiples copias en la bacteria diana, y donde el bacteriófago es capaz de formar un lisógeno que contiene una única copia del gen SASP en una cepa huésped de producción bacteriana.

25 En un segundo aspecto, se facilita un procedimiento para la producción de un bacteriófago modificado capaz de infectar una bacteria diana, cuyo procedimiento consiste en cultivar un huésped bacteriano que incluye material genético codificante del bacteriófago en un medio de crecimiento, hacer que el bacteriófago se replique en el huésped bacteriano y recoger el bacteriófago.

30 El uso de un bacteriófago modificado en el que el gen SASP está bajo el control de un promotor constitutivo tiene una serie de ventajas. Se elimina el control de la expresión del gen SASP del bacteriófago, mediante lo cual la producción de SASP se hace independiente de la expresión génica del fago. Esto permite producir la SASP incluso cuando el bacteriófago no puede realizar la totalidad de su ciclo vital, lo que puede ocurrir en el caso de una sobreinfección (donde el bacteriófago infecta un huésped bacteriano que ya lleva un profago) y de restricción por el
35 huésped del ADN del bacteriófago. Como se describe más adelante, esta estrategia permite así que un tipo de fago inhiba muchas cepas diferentes de una especie bacteriana.

Aunque el bacteriófago tiende generalmente a tener espectros estrechos de hospedadores, el poner un gen SASP bajo el control de un promotor constitutivo puede ampliar el espectro de hospedadores del bacteriófago modificado.
40 Esto es debido a que una de las formas clave en las que las bacterias limitan su espectro de hospedadores es por degradación del ADN del bacteriófago al entrar en una célula bacteriana. El uso de un bacteriófago para suministrar un gen SASP, cuya producción es independiente del bacteriófago, significa que el destino del ADN del bacteriófago puede no tener un impacto sobre la eficacia de la SASP. De este modo, el bacteriófago actúa como un vector de suministro suministrando el gen codificante de la SASP a una célula bacteriana diana.

45 La producción de un bacteriófago modificado según la invención requiere un huésped bacteriano que pueda ser lisogenizado por el bacteriófago. Este lisógeno debería permitir la proliferación del bacteriófago por inducción, de tal forma que se pueda obtener un título adecuado de bacteriófago para su recogida. Según la invención, las SASP no evitan la producción de títulos adecuados de fago en la escala de tiempo requerida por un procedimiento de
50 fabricación, es decir, antes de la muerte de la célula huésped.

La aproximación según la presente invención es utilizar un promotor constitutivo para controlar el gen SASP, de tal forma que el promotor no promueva la expresión de suficiente SASP como para matar la cepa huésped de producción de la que se ha de recoger el bacteriófago modificado. El promotor puede ser un promotor bacteriano, tal como de *S. aureus*. Como promotores preferidos, se incluyen los promotores de *S. aureus pdhA* para la subunidad alfa del componente de la piruvato deshidrogenasa E1, *rpsB* para la proteína ribosomal 30S S2 y *pgi* para la glucosa-6-fosfato isomerasa. También se pueden usar secuencias que tengan >90% de identidad con estas secuencias sobre promotores según la invención. Un promotor particularmente preferido es el promotor para el gen de la fructosa bisfosfato aldolasa, *fbaA*, de *S. aureus* N315 (nº de acceso BAB43211), o una secuencia que muestre >90% de homología con esta secuencia. Una ventaja de la utilización del promotor *fbaA* para expresar el gen SASP es que este promotor se expresa constitutivamente en las células bacterianas y no parece estar regulado por mecanismo alguno en las células de *S. aureus*. Además, una sola copia del elemento *fbaA::SASP-C* no produce suficiente SASP-C como para ser letal para una célula huésped, permitiendo el mantenimiento y la producción del bacteriófago PTSA 1.2/A, según se describe con mayor detalle más adelante. Al producirse la infección de las bacterias diana, sin embargo, múltiples copias del promotor *fbaA* (por múltiples episodios de infección o por replicación del fago en la célula diana)
65 dirigen una expresión suficiente de SASP-C como para provocar la pérdida de viabilidad de la diana.

Por lo tanto, los promotores adecuados para uso secuencia arriba de SASP en construcciones de bacteriófagos, tales como el promotor *fbxA*, tienen dos propiedades definitorias: no son lo suficientemente potentes como para matar el huésped del bacteriófago durante el crecimiento de la bacteria huésped y no evitan la producción de títulos adecuados de fagos en la escala de tiempo requerida por un procedimiento de fabricación, es decir, antes de la muerte de la célula huésped. Sin embargo, son lo suficientemente potentes como para dirigir la producción de niveles tóxicos de SASP cuando están presentes en múltiples copias, es decir, después del suministro de múltiples copias del gen SASP a una célula diana o debido a replicación del fago en una célula diana. Se puede hacer la selección de promotores con dichas actividades analizando construcciones de bacteriófagos en cuanto a estas características.

El promotor que controla la transcripción y, por lo tanto, la expresión del gen SASP es extraño tanto para el bacteriófago como para el gen SASP, en el sentido de que no se origina del bacteriófago y no es el promotor nativo del gen SASP. De este modo, el control de la expresión del gen SASP está despojado del fago.

El huésped bacteriano puede ser cualquier huésped adecuado para un bacteriófago dado. El huésped debe soportar el bacteriófago a través de la proliferación de partículas de bacteriófago maduras en el huésped, cuando se le induce a hacerlo. WO02/40678 presenta en el apéndice 4 una lista de patógenos comunes y algunos de sus fagos. Este apéndice está reproducido en la presente solicitud como apéndice 1. Los hospedadores *Staphylococcus* y *Clostridium*, preferiblemente *Staphylococcus aureus* y *Clostridium difficile*, son hospedadores particularmente útiles. El bacteriófago Ø11 es capaz de infectar a *Staphylococcus aureus* y se describe con mayor detalle más adelante. Este bacteriófago puede ser modificado según la presente invención.

Se pueden encontrar secuencias de SASP de tipo α/β en el apéndice 1 de WO02/40678, incluyendo la SASP-C de *Bacillus megaterium*, que es la SASP de tipo α/β preferida.

Se ha denominado generalmente a los vectores bacteriófagos modificados para contener un gen SASP vectores SASPject. El vector SASPject PTSA1.2/A está descrito con mayor detalle más adelante para el suministro del gen SASP a *S. aureus*, incluyendo MRSA. Una vez se ha suministrado el gen SASP a una bacteria diana, se produce SASP en el interior de esas bacterias, donde se une al ADN bacteriano y cambia la conformación del ADN de tipo B a tipo A. La producción de suficiente SASP en el interior de las células bacterianas diana provoca una caída en la viabilidad de las células afectadas; por lo tanto, la toxicidad causada por la SASP es dependiente de la dosis, lo que a su vez depende de la actividad del promotor y del número de copias de promotor::SASP presentes.

En general, el gen SASP y su promotor pueden situarse en cualquier sitio del genoma del bacteriófago. Sin embargo, se prefiere, para dirigirse a bacterias patógenas, que el bacteriófago modificado sea no lítico, y se puede conseguir esto por eliminación o inactivación de uno o más genes requeridos por el fago para lisar bacterias infectadas, más preferiblemente por inactivación de al menos uno de los genes de lisis. En una realización preferida, se inserta el gen SASP en uno de los genes de lisis, o se reemplaza el gen de lisis con el gen de toxina. Los genes para lisar bacterias infectadas incluyen el gen de holina del bacteriófago y/o un gen de amidasa. Uno o más de estos genes pueden estar interrumpidos o reemplazados por el gen SASP. Evitar que el bacteriófago modificado lise su huésped bacteriano diana permite la expresión continua y la acumulación de la SASP, posiblemente más allá del tiempo en el cual el bacteriófago causaría normalmente la lisis del huésped bacteriano.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición para inhibir o prevenir el crecimiento de células bacterianas, que consiste en un bacteriófago modificado como se define aquí y un soporte para el mismo. Dicha composición puede tener un amplio rango de usos y debe ser, por lo tanto, formulada según el uso pretendido. La composición puede ser formulada como un medicamento, especialmente para tratamiento de humanos, y puede tratar diversas afecciones, incluyendo infecciones bacterianas. Entre aquellas infecciones tratables según la presente invención, se encuentran las infecciones tóxicas, la caries dental, las infecciones respiratorias, las infecciones oculares y las infecciones de tejidos y órganos localizados. El soporte puede ser un recipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable. La naturaleza y las cantidades exactas de los componentes de dichas composiciones pueden ser determinadas empíricamente y dependerán en parte de las vías de administración de la composición.

Las vías de administración a los receptores incluyen la oral, la bucal, la sublingual, la intranasal, la inhalación, la tópica (incluyendo la oftálmica), la intravenosa, la intraarterial, la intramuscular, la subcutánea y la intraarticular. Por razones de conveniencia de uso, las dosificaciones según la invención dependerán del sitio y del tipo de la infección que se ha de tratar o prevenir. Las infecciones respiratorias pueden ser tratadas mediante administración por inhalación y las infecciones oculares pueden ser tratadas usando colirios. También se proporcionan productos para la higiene oral que contienen el bacteriófago modificado; se puede usar un colutorio o una pasta dentífrica que contenga el bacteriófago modificado según la invención formulado para eliminar las bacterias asociadas a la formación de la placa dental.

Se puede usar un bacteriófago modificado según la invención como descontaminante bacteriano, por ejemplo en el tratamiento de la contaminación bacteriana superficial, así como en la recuperación de suelos o en el

tratamiento del agua. Se puede usar el bacteriófago en el tratamiento del personal médico y/o de los pacientes como agente descontaminante, por ejemplo en un lavado de manos. También se proporciona el tratamiento de las superficies de trabajo y del equipo, especialmente el utilizado en los procedimientos hospitalarios o en la preparación de alimentos. Una realización particular comprende una composición formulada para uso tópico para la prevención, eliminación o reducción del transporte de bacterias y de la contaminación de un individuo a otro. Esto es importante para limitar la transmisión de infecciones microbianas, particularmente en un ambiente hospitalario, donde son prevalentes las bacterias resistentes a los antibióticos convencionales. Para dicho uso, el bacteriófago modificado puede estar contenido en solución salina tamponada con Tris que contenga CaCl_2 (10 mM) y MgCl_2 (1 mM), o puede ser formulado en un gel o una crema. Para uso múltiple, se puede añadir un conservante. Alternativamente, se puede liofilizar el producto y se pueden añadir excipientes, por ejemplo un azúcar, tal como la sacarosa.

Descripción detallada de la invención

Se describirá ahora la presente invención con mayor detalle, por medio únicamente de ejemplos, haciendo referencia a los dibujos adjuntos y al ejemplo siguiente.

Breve descripción de los dibujos:

Figura 1. Región del fago $\phi 11$ de *S. aureus*, que muestra los genes de holina y amidasa y los sitios de cebado para la amplificación de los genes y del ADN flanqueante.

Figura 2. Diagrama de pSA1, que muestra la región clonada y la localización de los sitios de cebado para la PCR inversa de pSA1.

Figura 3. Diagrama de pSA4, que muestra la región promotor-saspC clonada con el gen de resistencia al cadmio (Cd^R) y el ADN $\phi 11$ flanqueante, junto con la localización de sitios de cebado relevantes.

Figura 4. Disposición del ADN en el genoma de PTL1003, que muestra el reemplazo del gen de holina con genes extraños. Se muestra como comparación la disposición de genes en el genoma de $\phi 11$ de tipo salvaje.

Figura 5. Un ejemplo de una curva de muerte que muestra la eficacia de PTSA1.2/A frente a una cepa de *S. aureus*.

Figura 6. Una curva de muerte que compara la capacidad para matar de PTSA1.2/A con el mismo fago menos el gen SASP.

Figura 7. Una curva de muerte de PTSA1.2/A que infecta a una cepa de *S. aureus*.

Resumen de la construcción de un bacteriófago genéticamente alterado portador de SASP-C bajo el control de un promotor homólogo de fructosa bisfosfato aldolasa (*fbaA*)

Se pueden eliminar y añadir genes al genoma del fago usando recombinación homóloga. Existen varias formas en las que se pueden construir fagos portadores de genes y promotores extraños, y el siguiente es un ejemplo de dichos métodos.

Para la construcción de un derivado $\phi 11$, se muestra cómo, utilizando un vector lanzadera de *E. coli/S. aureus*, únicamente como ejemplo, se ha reemplazado el gen de holina del fago con el gen para SASP-C, bajo el control de un homólogo de promotor de fructosa bisfosfato de *S. aureus* (se usa *fbaA* desde este punto en adelante para indicar el promotor de fructosa bisfosfato aldolasa). Se usan genes de resistencia al metal pesado cadmio (a los que se hace de aquí en adelante referencia como Cd^R) como marcador de resistencia a no antibióticos.

Se clonaron las regiones *fbaA*-SASP-C y Cd^R entre dos regiones de ADN de $\phi 11$ que flanquean al gen de holina de $\phi 11$. A continuación, se introdujo este plásmido en células y se hizo una selección de dobles recombinantes, donde se reemplazó la holina con la región *fbaA*-SASP-C y Cd^R .

Procedimientos experimentales

Todas las reacciones PCR fueron realizadas usando el sistema de PCR Expand High Fidelity y condiciones estrictas, dependiendo de las temperaturas de fusión (T_f) de los cebadores, según las instrucciones de los fabricantes. A menos que se indique algo diferente, las técnicas generales de biología molecular, tales como la digestión con enzimas de restricción, la electroforesis en gel de agarosa, las ligaciones dependientes de ADN ligasa T4 y la preparación y transformación de células competentes, se basaban en los métodos descritos en Sambrook *et al.* (1989). Se purificó el ADN a partir de reacciones enzimáticas y se preparó a partir de células utilizando los kits de purificación de ADN Qiagen. Se transformaron células de *S. aureus* con ADN plasmídico por electroporación, utilizando métodos tales como los descritos por Schenck y Ladagga (1992).

Se obtuvieron los cebadores de Sigma Genosys. Cuando los cebadores incluyen secuencias de reconocimiento para enzimas de restricción, se añadió un extra de 2-6 nucleótidos en el extremo 5' para asegurar la digestión del ADN de la PCR amplificado.

5 Todas las clonaciones, a menos que se indique algo diferente, son conseguidas ligando los ADN durante la noche con ADN ligasa T4 y transformándolos luego en cepas de clonación de *E. coli*, tales como DH5 α o XL1-Blue, con aislamiento en medio selectivo, como se describe en algún otro lugar (Sambrook *et al.*, 1989).

10 Se usó un vector lanzadera de *E. coli/S. aureus*, designado como pSM198, para transferir genes entre *E. coli* y *S. aureus*. Se produjo previamente el plásmido pSM198 combinando el vector de clonación de *E. coli* pUC18 y las regiones de resistencia a tetraciclina y replicación del plásmido pT181 de *S. aureus*. El plásmido lleva marcadores de resistencia que pueden ser seleccionados en *E. coli* y *S. aureus*. Este plásmido conserva el sitio de clonación múltiple (MCS) de pUC18, aunque no todos los sitios permanecen como sitios únicos. Los sitios únicos que permanecen en el MCS de pSM198 son: PstI, SAlI, BamHI, SacI y EcoRI.

15 Construcción de un plásmido para el reemplazo deseado del gen de holina ϕ 11 con *fbA-SASP-C/Cd*^R

20 1. Se construyó el plásmido pSA1, que comprende pBluescript SK+, que contiene un fragmento de 1,8 kb de ϕ 11 que abarca los genes líticos, como sigue. La Figura 1 muestra los sitios cebadores para los oligonucleótidos descritos a continuación para amplificación de las regiones del genoma de ϕ 11.

25 Se realizó la amplificación por PCR del ADN de ϕ 11 utilizando los cebadores B1001 y B1002 y se obtuvo un fragmento de 1,8 kb, que fue limpiado y digerido con XbaI y PstI. Tras la digestión, se limpió el ADN y se clonó en pBluescript SK+ digerido con XbaI y PstI, para obtener pSA1.

30 El cebador B1001 (SEC ID N° 1) comprende un sitio PstI 5' (subrayado) seguido de la secuencia de ϕ 11 (Genbank: AF424781) desde la base 39779 hasta la base 39798 (véase la Figura 1). El cebador B1002 (SEC ID N° 2) comprende un sitio XbaI (subrayado) seguido de la secuencia inversa y complementaria de ϕ 11 desde la base 41537 hasta la base 41556 (véase la Figura 1).

35 B1001 (SEC ID N° 1)
5'-AACTGCAGGTGTATTGCAACAGATTGGCTC-3'

B1002 (SEC ID N° 2)
5'-GCTCTAGACTTTGCTCCCTGCGTCGTTG-3'

40 2. Se realizó la PCR inversa sobre pSA1 como plantilla, utilizando los cebadores B1003 (SEC ID N° 3) y B1004 (SEC ID N° 4) (véase la Figura 2).

El cebador B1003 comprende un sitio BamHI 5' (subrayado) seguido de la secuencia inversa y complementaria de ϕ 11 desde la base 40454 hasta la base 40469 (véase la Figura 1). El cebador B1004 comprende un sitio SpeI 5' (subrayado), seguido de la secuencia de ϕ 11 desde la base 40891 hasta la base 40911 (véase la Figura 2).

45 B1003 (SEC ID N° 3)
5'-CGGGATCCGACTAAAAATTAGTCG-3'
B1004 (SEC ID N° 4)
5'-GGACTAGTGAATGAGTATCATCATGGAGG-3'

50 Esta reacción PCR dio un fragmento de ~4,2 kb que constituía: el brazo izquierdo de ϕ 11, la totalidad del plásmido pBluescript SK+ y el brazo derecho de ϕ 11. Se digirió este fragmento con BamHI y SpeI, se limpió y se usó a continuación como vector para clonación en el siguiente fragmento.

55 3. Se amplificó la región de resistencia al cadmio de pI258 por PCR usando los cebadores B1005 y B1006, para obtener un fragmento de ~2,8 kb. Se limpió el producto de la PCR y se digirió con BamHI y XbaI. Se limpió el producto de la PCR digerido y se clonó en pSA1 (amplificado por PCR y digerido, como se ha indicado anteriormente), para producir pSA2.

60 El cebador B1005 (SEC ID N° 5) es complementario al ADN 308 pb secuencia arriba del ATG para el gen putativo de la proteína reguladora que responde al cadmio *cadC* de pI258 (Genbank: J04551), estando el extremo 3' lo más próximo al ATG (véase la Figura 3). El extremo 5' del cebador lleva una cola no complementaria con un sitio Bam-HI (subrayado) para ayudar a la clonación.

65 El cebador B1006 (SEC ID N° 6) es complementario al ADN en el extremo 3' del gen *cadA* para la proteína de resistencia al cadmio del plásmido pI258, de tal forma que los últimos 3 nucleótidos complementarios son complementarios al codón de parada TAG del gen *cadA* (véase la Figura 3). El extremo 5' lleva un sitio XbaI no

complementario (subrayado) para ayudar a la clonación.

B1005 (SEC ID N° 5)

5'-CGATGGATCCTCTCATTATAAGGTTAAATAATTC-3'

5 B1006 (SEC ID N° 6)

5'-GCAGACCGCGGCTATTTATCCTTCACTCTCATC-3'

10 4. Se cortaron el ADN que contenía los brazos izquierdo y derecho de $\phi 11$ y Cd^R de pSA2 utilizando PstI y SacI y se separaron por purificación por gel del vector. Se clonó este fragmento en el vector lanzadera pSM198, que fue también cortado con PstI y SacI. Se cribaron los clones para el fragmento de restricción y se enviaron los candidatos a secuenciación. Se identificó una construcción de plásmido correcta y se la denominó pSA3. Se utilizó este plásmido para clonación en los siguientes fragmentos.

15 5. La amplificación por PCR del promotor *fbA* usando B1007 y B1008 dio un fragmento de aproximadamente 300 pb, que fue limpiado y a continuación digerido con NcoI y luego limpiado de nuevo.

Se ligó el fragmento de PCR *fbA* a la secuencia codificante de SASP-C de *B. megaterium*. Se describen más adelante la amplificación y la preparación del gen SASP-C.

20 El cebador B1007 (SEC ID N° 7) comprende una cola de secuencia 5' que incluye un sitio BamHI, seguida de la complementaria inversa de bases 2189404 a 2189427 del genoma de *S. aureus* NCTC 8325 (Genbank: CP000253) (véase la Figura 3).

25 El oligonucleótido B1008 (SEC ID N° 8) comprende una cola de secuencia que incluye un sitio NcoI y luego la secuencia de bases 2189214 a 2189232 del genoma de *S. aureus* NCTC 8325 (véase la Figura 3). Cuando se prepara un producto de PCR usando este cebador, el sitio NcoI incorporado al cebador en el ATG del gen da lugar al cambio de las 2 bases de nucleótidos secuencia arriba del ATG de T>C.

B1007 (SEC ID N° 7)

5'-CTACGGATCCTTTATCCTCCAATCTACTTATAAA-3'

30 B 1008 (SEC ID N° 8)

5'-CATGCCATGGAAGTTCCTCCTTGAGTGCT-3'

35 6. Se amplificó el gen SASP-C de la cepa KM de *B. megaterium* (ATCC 13632) por PCR con los cebadores B1009 y B1010 y se obtuvo un fragmento de ~300 pb. Se limpió el producto de la PCR y se digirió con NcoI. Se limpió el producto de la PCR digerido y se utilizó en una ligación con el fragmento de PCR *fbA*, como se describe más adelante.

40 El oligonucleótido B1009 (SEC ID N° 9) comprende una cola 5' que contiene un sitio NcoI y es complementario a los primeros 20 nucleótidos de SASP-C (n° de acceso K01833), comenzando en el ATG, de la cepa KM de *B. megaterium* (véase la Figura 3). El sitio NcoI al comienzo del oligonucleótido incorpora el ATG del gen SASP-C.

B1009 (SEC ID N° 9)

5'-CGATCCATGGCAAATTATCAAAAACGC-3'

45 El oligonucleótido B1010 (SEC ID N° 10) comprende un sitio BglII (subrayado) y un sitio EcoRI (doble subrayado), seguidos de la complementaria inversa del ADN comenzando 59 bases secuencia abajo del codón de parada hasta 74 bases secuencia abajo del codón de parada del gen SASP-C (véase la Figura 3).

50 B1010 (SEC ID N° 10)

5'-AGTGAGATCTGAATTCGCTGATTAAGAAAC-3'

55 7. Se ligaron los fragmentos de PCR *fbA* y SASP-C (ambos cortados con NcoI) entre sí utilizando ADN ligasa T4. Se usaron los ADN ligados como plantilla para la PCR, para amplificar los ADN *fbA* y SASP-C unidos. Se realizó la PCR usando los cebadores B1007 y B1010. Se purificó por gel el producto principal de la PCR de ~500 pb. Se digirió el producto de la PCR con BamHI y BglII y se limpió. Se clonó este fragmento en pSA3, que se preparó como sigue. Se cortó el plásmido con BamHI y se desfosforilaron los extremos utilizando fosfatasa alcalina intestinal de ternera (CIAP). Se limpió de nuevo el ADN.

60 Se cribaron los plásmidos de tal forma que el extremo del gen SASP-C fuese adyacente a la región del "brazo izquierdo" de $\phi 11$, y de tal forma que el comienzo del promotor *fbA* fuese adyacente a la región de resistencia al cloruro de cadmio. Se denominó al plásmido resultante, portador de *fbA*-SASP-C, pSA4.

65 Reemplazo del gen de holina del fago $\phi 11$ de *S. aureus* con *fbA*-SASP-C y el marcador Cd^R

1. Se transformó pSA4 en la cepa PTL47 de *S. aureus*. PTL47 es un monolisógeno de $\phi 11$ en RN4220.

- 5 2. Las células que habían sufrido un doble entrecruzamiento, donde el ADN contenido entre los brazos izquierdo y derecho de $\phi 11$ de pSA4 había reemplazado al ADN entre los brazos izquierdo y derecho de $\phi 11$ en el genoma del fago (es decir, el gen de holina), dieron lugar a colonias con el siguiente fenotipo: resistente a CdCl_2 (0,1 mM), sensible a tetraciclina (5 $\mu\text{g/ml}$). La resistencia a tetraciclina es llevada por el vector lanzadera pSM198. La pérdida de resistencia a la tetraciclina es indicativa de pérdida de pSM 198. Se cribaron además las colonias que tenían el fenotipo: CdCl_2^{R} , tetraciclina^S por PCR de colonias.
- 10 3. Se llevaron a cabo reacciones PCR para comprobar que el gen de holina ya no estaba presente y que *fbaA-SASP-C* y el gen CdCl_2^{R} estaban presentes y correctamente situados en el genoma del profago $\phi 11$. Se secuenciaron los fragmentos de PCR para asegurarse de que el aislado llevaba la secuencia esperada, especialmente en las regiones: *fbaA* y *SASP-C*.
- 15 Se identificaron así construcciones de profago verificadas y se seleccionó una representativa y se la denominó PTL1001.
- 20 4. Se indujo el fago a partir de un cultivo de la cepa PTL1001 por choque térmico y se lisaron las células con lisoestafina (0,25 $\mu\text{g/ml}$), y se filtraron después a través de un filtro de 0,2 μm , para obtener un lisado bruto de fago libre de células.
- 25 5. Se usó este lisado para infectar la cepa 8325-4 de *S. aureus*. Se plaqueó la mezcla de infección sobre placas de agar ϕVPB (caldo de peptona vegetal que contenía 10 g/l de cloruro de sodio) + CdCl_2 (0,1 mM) para seleccionar lisógenos tras cultivo durante la noche a 37°C.
- 30 6. Se comprobaron los lisógenos por PCR de colonias como se ha descrito anteriormente. Se identificó un lisógeno verificado y se le denominó PTL1002.
7. Se pasó PTL1002 5 veces sobre agar ϕVPB , cogiendo una sola colonia, y se volvió a extender para obtener colonias simples en cada pase.
- 35 8. Se seleccionó una única colonia y se analizó de nuevo por PCR y secuenciación. Se denominó al aislado verificado PTL1003. El fago llevado por esta cepa lisógena se denomina PTSA1.2/A (véase la Figura 4).
- Se ha estudiado el vector SASPject PTSA1.2/A frente a un panel de cepas y aislados clínicos de *S. aureus*, incluyendo cepas de *S. aureus* sensibles a meticilina (MSSA) y MRSA pertenecientes a cada uno de los 5 tipos *sccmec* reconocidos. Se da un ejemplo de una curva de muerte que muestra la eficacia de PTSA1.2/A frente a una cepa de *S. aureus* en la Figura 5.
- 40 Se da una curva de muerte que compara la capacidad para matar de PTSA1.2/A frente al mismo fago menos el gen *SASP* (fago SA0/A) en la Figura 6, la cual confirma que el índice de muerte se debe a la presencia de la *SASP*.
- Se da una curva de muerte de PTSA1.2/A que infecta a una cepa de *S. aureus* que es un monolisógeno de PTSA1.2/A en la Figura 7, la cual muestra que la inmunidad por sobreinfección al fago no evita que *SASP* inhiba a las células infectadas.

Referencias

Donegan, N. 2006. Annual Meeting of the Soc. for Healthcare Epidemiology of America.

5 Francesconi, S.C., MacAlister, T.J., Setlow, B. y Setlow, P. 1988. Immunoelectron microscopic localization of small, acid-soluble spore proteins in sporulating cells of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 170: 5963-5967.

Frenkiel-Krispin, D., Sack R., Englander, J., E. Shimoni, Eisenstein, M., Bullitt, Horowitz-Scherer, E. R., Hayes, C. S., Setlow, P., Minsky, A. y Wolf, S.G. 2004. Structure of the DNA-SspC Complex: Implications for DNA Packaging, Protection, and Repair in Bacterial Spores. *J. Bacteriol.* 186: 3525-3530.

10 Mainous, A.G. III, Hueston, W.J., Everett, C.J. y Diaz V.A.. 2006. Nasal Carriage of *Staphylococcus aureus* and Methicillin Resistant *S. aureus* in the US 2001-2002. *Annals of Family Medicine* 4: 132-137.

15 Nicholson, W. L., Setlow, B. y Setlow, P. 1990. Binding of DNA in vitro by a small, acid-soluble spore protein from *Bacillus subtilis* and the effect of this binding on DNA topology. *J. Bacteriol.* 172: 6900-6906.

Noskin, G.A., Rubin, R. J., Schentag, J. J., Kluytmans, J., Hedblom, E. C., Smulders, M., Lapetina, E. y Gemmen, E. 2005. The Burden of *Staphylococcus aureus* Infections on Hospitals in the United States: An Analysis of the 2000 and 2001 Nationwide Inpatient Sample Database. *Arch. Intern. Med.* 165: 1756-1761.

20 Sambrook, J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T. in *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2ª ed. (Cold Spring Harbor Press, New York, 1989).

25 Schenk, S. y R. A. Laddaga. 1992. Improved method for electroporation of *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 73: 133-138.

Apéndice 1

30 Una lista de patógenos comunes y algunos de sus fagos. (Esta lista es representativa, pero no exhaustiva).

Colifagos:

- Bacteriófago lambda
- Bacteriófago 933W (*Escherichia coli* O157:H7)
- 35 Bacteriófago VT2-Sa (*E. coli* O157:H7)
- Colifago 186
- Colifago P1
- Colifago P2
- Colifago N15
- 40 Bacteriófago T3
- Bacteriófago T4
- Bacteriófago T7
- Bacteriófago KU1
- 45 Bacteriófagos de *Salmonella* spp
- Bacteriófago Felix
- Bacteriófago P22
- Bacteriófago L
- 50 Bacteriófago 102
- Bacteriófago 31
- Bacteriófago F0
- Bacteriófago 14
- Bacteriófago 163
- 55 Bacteriófago 175
- Bacteriófago Vir
- Bacteriófago VIVI
- Bacteriófago 8
- Bacteriófago 23
- 60 Bacteriófago 25
- Bacteriófago 46
- Bacteriófago E15
- Bacteriófago E34
- Bacteriófago 9B

	Bacteriófagos de <i>Shigella dysenteriae</i>
5	Bacteriófago ϕ 80 Bacteriófago P2 Bacteriófago 2 Bacteriófago 37
	Bacteriófagos de <i>Vibrio cholerae</i>
10	Bacteriófago fs-2 Bacteriófago 138 Bacteriófago 145 Bacteriófago 149 Bacteriófago 163
15	Bacteriófagos de <i>Mycoplasma arthritidis</i>
	Bacteriófago MAV1
20	Bacteriófagos de <i>Streptococci</i>
25	Bacteriófago CP-1 Bacteriófago ϕ Xz40 Bacteriófago 1A Bacteriófago 1B Bacteriófago 12/12 Bacteriófago 113 Bacteriófago 120 Bacteriófago 124
30	Bacteriófagos de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
35	Bacteriófago D3 Bacteriófago ϕ CTX Bacteriófago PP7
	Bacteriófagos de <i>Haemophilus influenzae</i>
40	Bacteriófago S2 Bacteriófago HP1 Bacteriófago flu Bacteriófago Mu
45	Bacteriófagos de <i>Staphylococcus aureus</i>
50	Bacteriófago Twort Bacteriófago tIII-29S Bacteriófago ϕ PVL Bacteriófago ϕ PV83 Bacteriófago ϕ 11 Bacteriófago ϕ 12 Bacteriófago ϕ 13 Bacteriófago ϕ 42 Bacteriófago ϕ 812
55	Bacteriófago K Bacteriófago P3 Bacteriófago P14 Bacteriófago UC18 Bacteriófago 15
60	Bacteriófago 17 Bacteriófago 29 Bacteriófago 42d Bacteriófago 47 Bacteriófago 52
65	Bacteriófago 53

	Bacteriófago 79
	Bacteriófago 80
	Bacteriófago 81
	Bacteriófago 83
5	Bacteriófago 85
	Bacteriófago 93
	Bacteriófago 95
	Bacteriófago 187
10	Bacteriófagos de <i>Chlamydia</i>
	Bacteriófago ϕ CPAR39
	Micobacteriófago
15	Bacteriófago L5
	Bacteriófago LG
	Bacteriófago D29
	Bacteriófago Rv1
20	Bacteriófago Rv2
	Bacteriófago DSGA
	Bacteriófagos de <i>Listeria monocytogenes</i>
25	Bacteriófago A118
	Bacteriófago 243
	Bacteriófago A500
	Bacteriófago A511
	Bacteriófago 10
30	Bacteriófago 2685
	Bacteriófago 12029
	Bacteriófago 52
	Bacteriófago 3274
35	Bacteriófagos de <i>Klebsiella pneumoniae</i>
	Bacteriófago 60
	Bacteriófago 92
40	Bacteriófagos de <i>Yersinia pestis</i>
	Bacteriófago R
	Bacteriófago Y
	Bacteriófago P1
45	Lista de secuencias
	<110> Phico Therapeutics Ltd.
50	<120> Bacteriófago modificado
	<130> 313609/JND/CJS
	<150> UK0715416.4
55	<151> 07-08-2007
	<160> 10
	<170> PatentIn versión 3.3
60	<210> 1
	<211> 30
	<212> ADN
	<213> Secuencia artificial
65	<220>

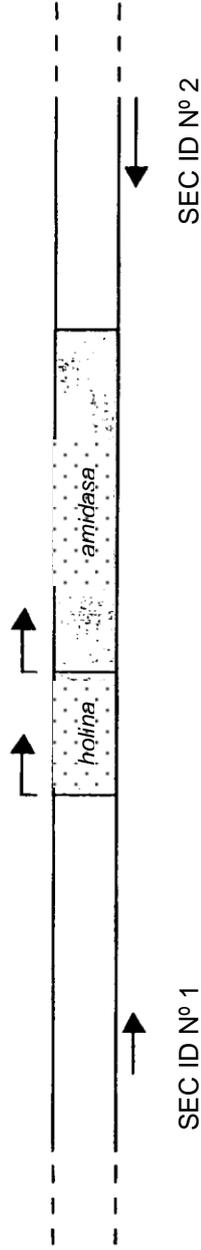
<223> Cebador B1001
<400> 1
aactgcaggt gtattgcaac agattggctc 30
5
<210> 2
<211> 28
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
10
<220>
<223> Cebador B1002
<400> 2
15 gctctagact ttgctccctg cgtcgttg 28
<210> 3
<211> 24
<212> ADN
20 <213> Secuencia artificial
<220>
<223> Cebador B1003
25 <400> 3
cgggatccga ctaaaaatta gtcg 24
<210> 4
<211> 29
30 <212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Cebador B1004
35 <400> 4
ggactagtga atgagtatca tcatggagg 29
<210> 5
40 <211> 35
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
45 <223> Cebador B1005
<400> 5
cgatgatcc tctcattat aaggtaaata aattc 35
50 <210> 6
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
55 <220>
<223> Cebador B1006
<400> 6
60 gcagaccgcg gctattatc cttcacttc atc 33
<210> 7
<211> 34
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
65 <220>

<223> Cebador B1007
<400> 7
ctacggatcc ttatcctcc aatctactta taaa 34
5
<210> 8
<211> 29
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
10
<220>
<223> Cebador B1008
<400> 8
15 catgccatgg aagtcctcc ttgagtct 29
<210> 9
<211> 26
<212> ADN
20 <213> Secuencia artificial
<220>
<223> Cebador B1009
25 <400> 9
cgatccatgg caaattatca aaacgc 26
<210> 10
<211> 32
30 <212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Cebador B1010
35 <400> 10
agtgatct gaattcgctg attaaaagaa ac 32

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un bacteriófago modificado capaz de infectar a una bacteria diana, cuyo bacteriófago incluye un gen de pequeña proteína de esporas soluble en ácido (SASP) α/β codificante de una SASP que es tóxica para la bacteria diana, donde el gen SASP está bajo el control de un promotor constitutivo que es extraño para el bacteriófago y el gen SASP, cuyo promotor es lo suficientemente potente como para dirigir la producción de niveles tóxicos de SASP cuando el bacteriófago modificado está presente en múltiples copias en la bacteria diana y donde el bacteriófago es capaz de formar un lisógeno que contiene una sola copia del gen SASP en una cepa de producción huésped bacteriana.
- 10 2. Un bacteriófago modificado según la reivindicación 2, donde la SASP consiste en la SASP-C de *B. megaterium*.
- 15 3. Un bacteriófago modificado según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, que consiste en un bacteriófago de *S. aureus* modificado.
- 20 4. Un bacteriófago modificado según la reivindicación 3, donde el bacteriófago de *S. aureus* es un bacteriófago Ø11.
5. Un bacteriófago modificado según cualquier reivindicación precedente, donde el promotor es seleccionado entre *pdhA*, *rpsB*, *pgi*, *fbaA* y secuencias que tienen más de un 90% de identidad con los mismos.
- 25 6. Un bacteriófago modificado según la reivindicación 5, donde el promotor *fbaA* bacteriano procede de *S. aureus*.
7. Un bacteriófago modificado según cualquier reivindicación precedente, que es no lítico, y eventualmente donde el gen SASP es insertado en un gen de lisis del mismo.
- 30 8. Un bacteriófago modificado según la reivindicación 7, que es holina.
9. Un bacteriófago modificado según cualquier reivindicación precedente, que además incluye un marcador de resistencia a no antibióticos, tal como un marcador de resistencia al cadmio.
- 35 10. Una composición para inhibir o evitar el crecimiento de células bacterianas, que incluye un bacteriófago modificado según cualquier reivindicación precedente y un soporte para el mismo.
11. Una composición según la reivindicación 10 que está formulada para uso tópico.
- 40 12. Un bacteriófago modificado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para uso como medicamento.
13. Uso de un bacteriófago modificado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 como descontaminante bacteriano no terapéutico.
- 45 14. Un bacteriófago modificado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para uso en la inhibición o la prevención de la infección bacteriana.
15. Un procedimiento para la producción de un bacteriófago modificado capaz de infectar a una bacteria diana, cuyo procedimiento consiste en cultivar un huésped bacteriano que contiene material genético codificante del bacteriófago de cualquier reivindicación precedente en un medio de crecimiento, hacer que el bacteriófago se replique en el huésped bacteriano y recoger el bacteriófago.

Figura 1



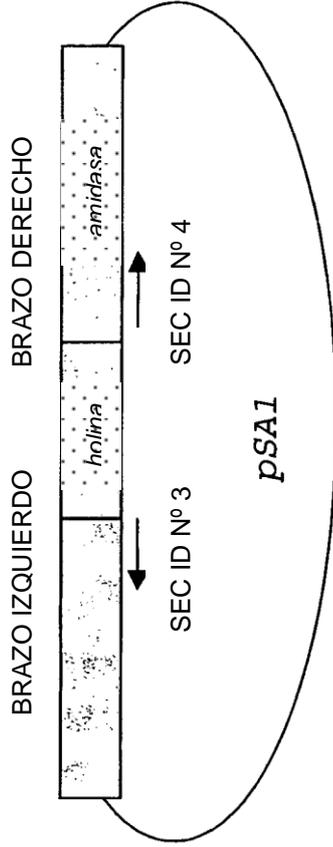
B1001 (SEC ID N° 1)

5' - AACTGCAGGTGTATTGCAACACAGATTGGCTC - 3'

B1002 (SEC ID N° 2)

5' - GCTCTAGACTTTGCTCCCTGCGTCGTTG - 3'

Figura 2



B1003 (SEC ID N° 3)

5' - CGGATCCGACTAAAAATTAGTCG - 3'

B1004 (SEC ID N° 4)

5' - GGACTAGTGAAATGAGTATCATCATGGAGG - 3'

Figura 3

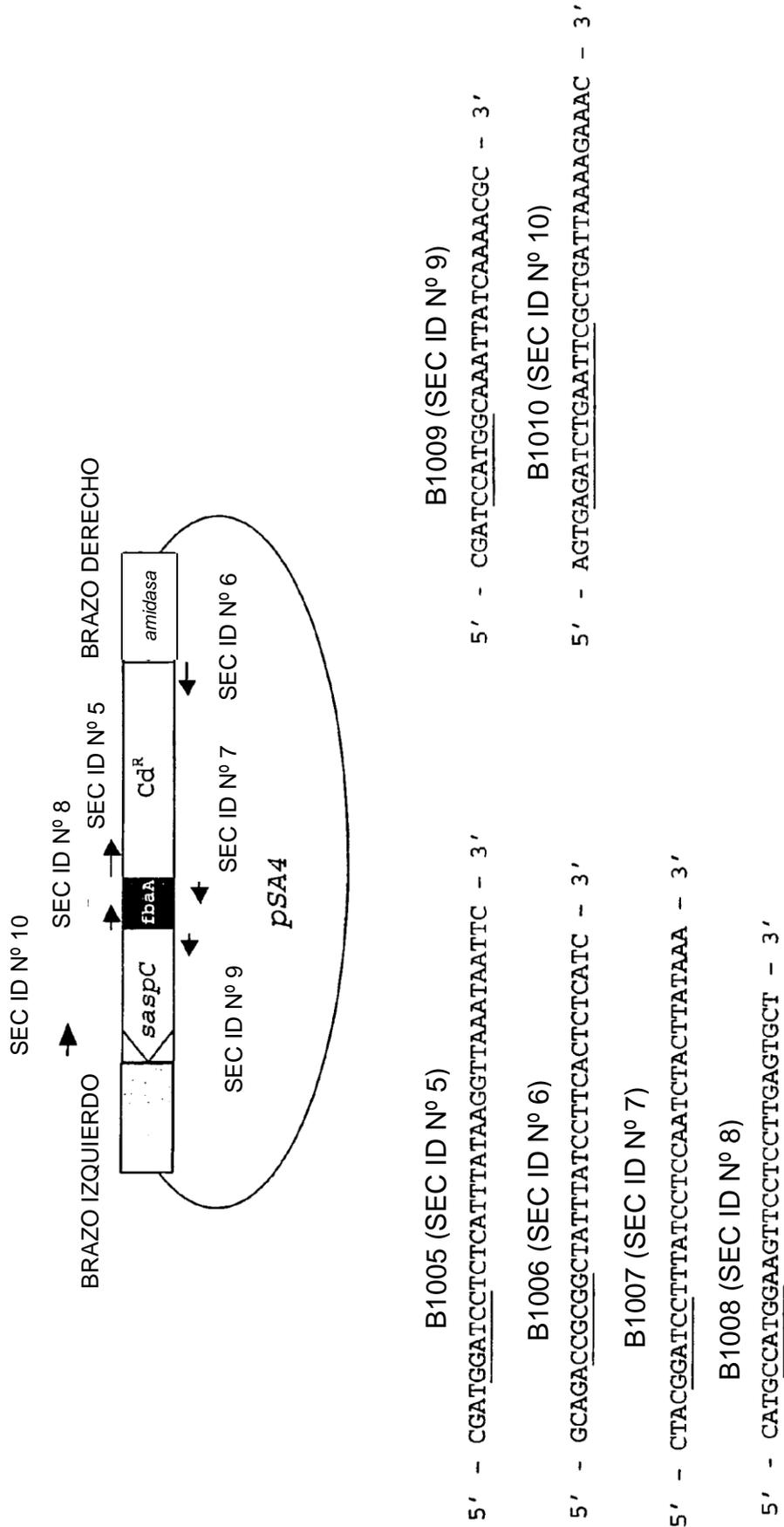
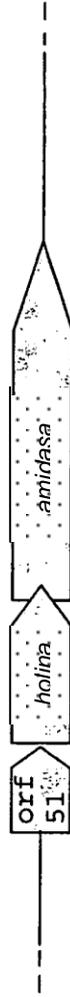


Figura 4

Lisógeno $\phi 11/\phi 11$



PTL1003 / PTSA1.2/A



Figura 5

Reducción de la viabilidad de células de *S. aureus* infectadas con SASPject PTSA1.2/A

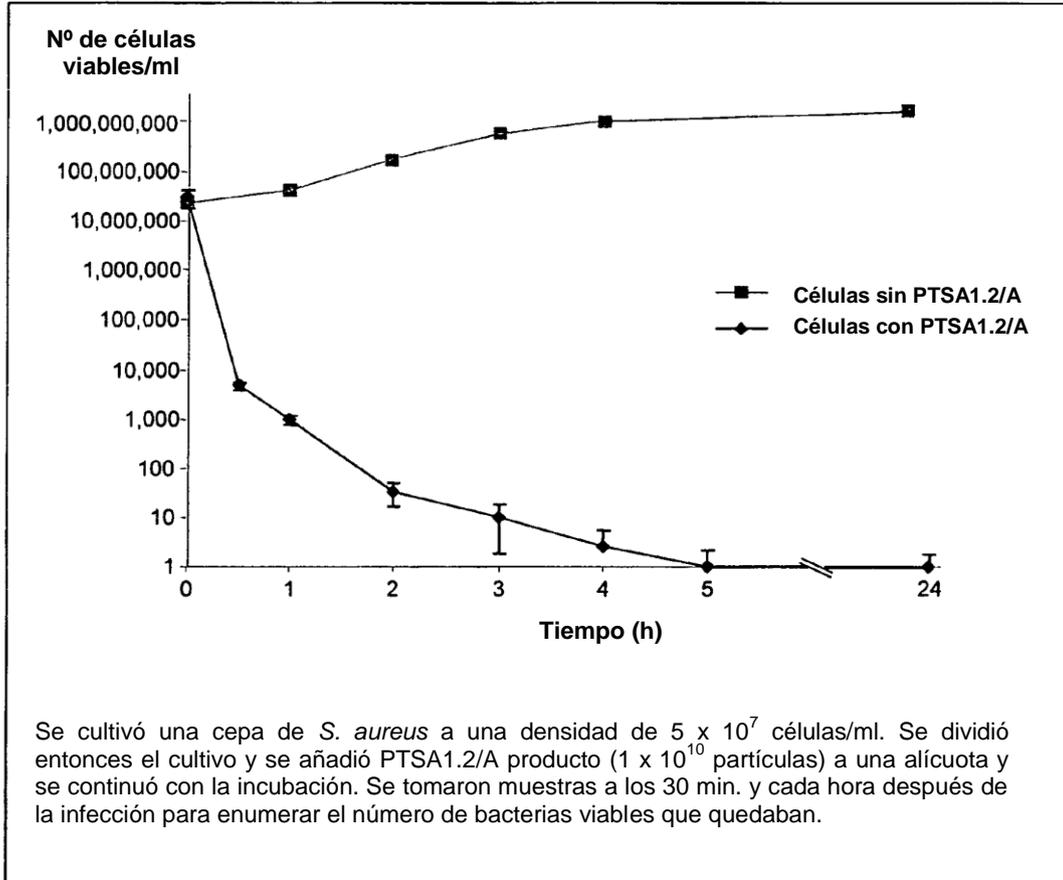


Figura 6

Comparación de células de *S. aureus* infectadas con SASPject PTSA1.2/A (ϕ 11:holina⁻::SASP-C⁺) vs SA0/A (ϕ 11:holina⁻::SASP-C⁻)

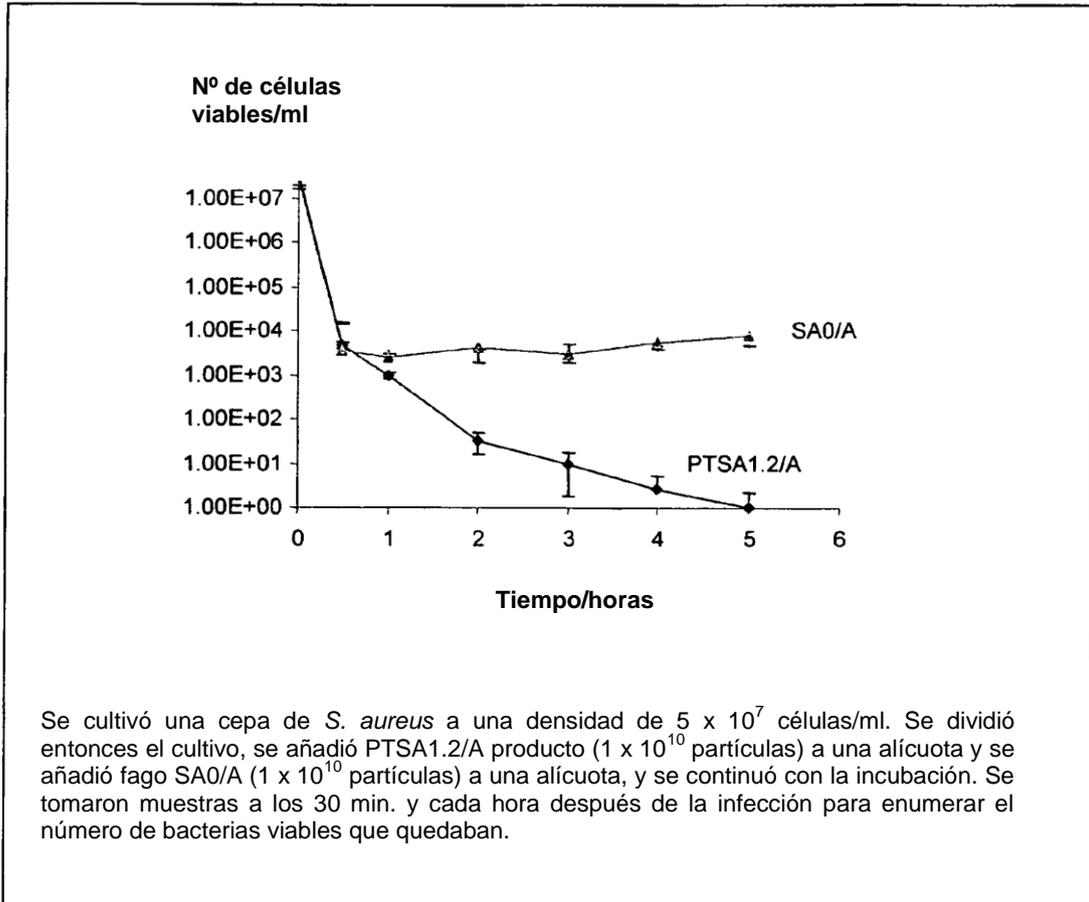


Figura 7

Gráfico que muestra el efecto de SASPject PTSA1.2/A sobre un monolisógeno PTSA1.2/A de *S. aureus*

