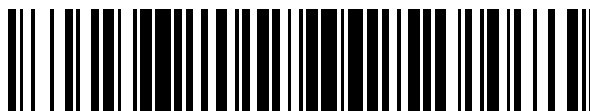


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 527 994**

51 Int. Cl.:

**A61K 35/76** (2006.01)

**A61P 31/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.07.2004 E 12195158 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.11.2014 EP 2570130**

54 Título: **Agentes terapéuticos que contienen bacteriófagos frente a P. aeruginosa**

30 Prioridad:

**23.07.2003 GB 0317240**

**14.05.2004 GB 0410855**

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

**03.02.2015**

73 Titular/es:

**BIOCONTROL LIMITED (100.0%)  
Colworth Science Park  
Sharnbrook Bedfordshire MK44 1LQ, GB**

72 Inventor/es:

**SOOTHILL, JAMES;  
HAWKINS, CATHERINE y  
HARPER, DAVID**

74 Agente/Representante:

**PONTI SALES, Adelaida**

**Observaciones :**

**Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 527 994 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

Agentes terapéuticos que contienen bacteriófagos frente a *P. aeruginosa*

5 **Campo de la invención**

**[0001]** La presente invención se refiere a preparaciones terapéuticas y diagnósticas que comprenden virus que destruyen bacterias (bacteriófagos), según se describe en las reivindicaciones. En particular, la memoria descriptiva proporciona en un aspecto preferido composiciones terapéuticas que comprenden combinaciones de bacteriófagos como agentes de control para infecciones en animales y en seres humanos causadas por bacterias patógenas de la especie *Pseudomonas aeruginosa*. La memoria descriptiva también se refiere al uso de bacteriófagos junto con antibióticos para el tratamiento de infecciones bacterianas caracterizadas por la formación de una biopelícula, especialmente, por ejemplo, infecciones tales que comprenden una infección por *Pseudomonas aeruginosa* tales como las otitis caninas.

15

**Antecedentes de la invención**

**[0002]** Los antibióticos se han contemplado durante muchos años como "la respuesta" al problema de las infecciones bacterianas. Esta actitud persistió hasta el desarrollo de las resistencias de amplio alcance (y en algunos casos totales) a los antibióticos observada en los últimos diez años. En muchos casos es necesario el uso de "fármacos de último recurso" (tales como la vancomicina para *Staphylococcus aureus*), que a menudo requieren unas vías de administración complejas y muestran unos efectos secundarios tóxicos, que necesitan un prolongado tratamiento hospitalario.

**[0003]** Incluso frente a estos fármacos las resistencias están alcanzando unos niveles preocupantes. Ahora está claro que las bacterias pueden adaptarse para resistir a cualquier antibiótico. Incluso los fármacos de nueva generación tales como linezolid ya están generando resistencias [Mutnick y col (2003) An. Pharmacother. 37: 769 - 774; Rahim y col (2003) Clin Infect Dis 36: E146 - 148], y a partir de los recientes desarrollos está claro que la resistencia se desarrolla más rápido de lo que pueden producirse, evaluarse y procesarse nuevos antibióticos a través de las autorizaciones sanitarias.

**[0004]** Un inconveniente adicional del tratamiento antibiótico es su carencia de especificidad. Los antibióticos pueden destruir una amplia variedad de bacterias y esto puede dar lugar a una recolonización del cuerpo por parte de bacterias inapropiadas y a menudo perjudiciales. Hay por tanto una necesidad de tratamientos antibacterianos que muestren especificidad frente a especies bacterianas en particular, de forma que se induzca poca resistencia en la flora normal.

**[0005]** La necesidad de nuevas formas de terapia antibacteriana está bien ilustrada por el caso de las infecciones por la bacteria aeróbica gramnegativa *Pseudomonas aeruginosa*.

40

**[0006]** *Pseudomonas aeruginosa* es un importante patógeno bacteriano oportunista. Algunas infecciones provocadas por *Pseudomonas aeruginosa* incluyen:

- otitis externa y otitis media en perros, otitis que ejemplifica la colonización basada en biopelícula de una superficie corporal y que son habituales en perros de razas puras (con pedigrí);
- otitis externa en seres humanos ("otitis externa aguda") junto con otras otitis y otras infecciones tópicas en seres humanos, incluyendo queratitis por *Pseudomonas* y foliculitis por *Pseudomonas*;
- infecciones de quemaduras y de injertos cutáneos en seres humanos;
- infecciones adquiridas en el hospital;
- infecciones pulmonares en pacientes con fibrosis quística (CF).

**[0007]** El 10 - 15 % de las infecciones nosocomiales (adquiridas en el hospital) son debidas a *Pseudomonas aeruginosa*, con 2 millones de casos anuales sólo en los Estados Unidos. En algunas situaciones, la frecuencia es incluso mayor. De los aproximadamente 150.000 pacientes con quemaduras tratados en los hospitales de Estados Unidos y en los centros de quemados por año, el 26 % presentan infecciones por *Pseudomonas aeruginosa*. *Pseudomonas aeruginosa* es tristemente célebre por su resistencia a los antibióticos, por lo que las infecciones causadas por ella pueden ser difíciles de tratar. Uno de sus hábitats naturales es el suelo, donde está expuesta a organismos que producen antibióticos. Esto puede haber conducido fácilmente al desarrollo de mecanismos de resistencia codificados tanto por los genes del cromosoma como por elementos genéticos transferibles conocidos como plásmidos. Las propiedades de la membrana externa de *P. aeruginosa* son importantes para conferir resistencia. Un mecanismo de resistencia adicional es su tendencia a crecer en las superficies disponibles en forma de capas complejas conocidas como biopelículas [Donlan (2002) Emerging Infectious Diseases 8: 881 - 890, <http://www.cdc.gov/ncidod/EID/vol18no9/02-0063.htm>; Fletcher & Decho (2001) Biofilms in Enciclopedia of Life Sciences, Nature Publishing, Londres; <http://www.els.net>] que son resistentes a concentraciones mucho mayores de antibióticos de las necesarias para destruir a las células individuales [Chen y col (2002) *Pseudomonas* infection; <http://www.emedicine.com/PED/topic2701.htm>; Qarah y col (2001) *Pseudomonas aeruginosa* infections;

65

<http://www.emedicine.com/MED/topic1943.htm>; Todar K. (2002) *Todar's Online Textbook of Bacteriology: Pseudomonas aeruginosa*; <http://textbookofbacteriology.net/Pseudomonas.html>; Iglewski B. H. (1996) *Pseudomonas*. Medical Microbiology 4ª edición, S. Baron (ed.). University of Texas; <http://gsbs.utmb.edu/microbook/ch027.htm>]. El efecto práctico de esto está demostrado por las infecciones en

5 pacientes con fibrosis quística, prácticamente todos los cuales son finalmente infectados por una cepa bacteriana que no puede ser erradicada mediante el uso de antibióticos, incluso cuando la cepa aislada puede parecer ser sensible en el laboratorio [Høiby N (1998) *Pseudomonas* in cystic fibrosis: past, present, future. European Cystic Fibrosis Society Joseph Levy Memorial Lecture; [http://www.ecfsoc.org/pa\\_review/nh\\_lect.html](http://www.ecfsoc.org/pa_review/nh_lect.html)].

10 **[0008]** *Pseudomonas aeruginosa* expresa un conjunto de genes (muy notablemente el gen *algC*) que produce los componentes extracelulares responsables de la formación de la biopelícula, que a menudo es de naturaleza polisacárida (Friedman y Kolter, *Mol. Microbiol.* (2004) 3, 675 - 690). Se sabe que dicha formación de biopelícula es una característica de muchas bacterias patógenas importantes que contribuye al aumento de la resistencia a los

15 antibióticos. Dichas biopelículas pueden comprender más de un tipo de bacteria, soportada y rodeada por una matriz extracelular que es excretada y ayuda a la bacteria a colonizar superficies desde arrecifes marinos hasta el esmalte dental. Las biopelículas permiten a las bacterias unirse a las superficies y alcanzar unas densidades de población que de otro modo no serían soportables. Le imparte un aumento en la resistencia no sólo a los antibióticos sino también a estreses medioambientales, incluyendo toxinas tales como metales pesados, lejías y otros agentes blanqueantes. Anteriormente se pensaba que la contribución de la formación de una biopelícula a la resistencia a los

20 antibióticos era fundamentalmente un proceso físico procedente de la limitación de difusión, pero pruebas más recientes han demostrado que algunas biopelículas parecen tener unas capacidades específicas para atrapar antibióticos (Mah y col., *Nature* (2003) 426, 306 - 310). Se sabe que las bacterias dentro de las biopelículas pueden ser entre 100 y 1.000 veces más resistentes a los antibióticos que la misma cepa bacteriana creciendo en forma de células individuales ("planctónica"). Este aumento en la resistencia significa que las bacterias que son

25 aparentemente sensibles a los antibióticos en un ensayo de laboratorio pueden ser resistentes a la terapia en un entorno clínico. Incluso si algunas son eliminadas, las biopelículas pueden proporcionar depósitos resistentes que permiten una rápida colonización una vez que los antibióticos ya no están presentes. Por lo tanto resulta claro que las biopelículas son factores importantes en muchas enfermedades humanas.

30 **[0009]** Los tratamientos químicos no son adecuados para usarlos frente a las biopelículas dado que esto es precisamente frente a lo que han evolucionado, y muchas superficies en las que las biopelículas ayudan a la patogénesis bacteriana están poco preparadas para una abrasión rigurosa. La abrasión física no proporciona un medio para romper las biopelículas. Sin embargo, muchas superficies en las que las biopelículas ayudan a la patogénesis bacteriana están poco preparadas para una abrasión rigurosa. Por ejemplo, las superficies de heridas o

35 de quemaduras son extremadamente sensibles y delicadas. Incluso cuando la abrasión es tanto adecuada como de uso rutinario, la eliminación de las biopelículas está limitada. La placa oral en la superficie de los dientes es una biopelícula y es parcialmente eliminada por el cepillado regular. Sin embargo, las bacterias se mantienen en las superficies no cepilladas (por ejemplo, en los huecos entre los dientes) y pueden recolonizar las superficies limpiadas tanto rápida como eficazmente. A partir de esto, está claro que las metodologías existentes para la

40 eliminación de las biopelículas tienen una eficacia limitada.

**[0010]** Además del problema de la biopelícula, sólo unos pocos antibióticos son en cualquier caso capaces de una acción eficaz frente a *Pseudomonas aeruginosa*, incluyendo fluoroquinolonas, gentamicina e imipenem, e incluso estos antibióticos no son eficaces frente a todas las cepas. La resistencia multifarmacológica es común y

45 creciente [Friedland I y col (2003). *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 45: 245 - 50; Henwood y col (2001). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 47: 789 - 799]. The U.S. National Nosocomial Infections Surveillance System Report de junio de 1999 [Gerberding J y col (2001). *National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report*, resumen de datos desde enero de 1992 - junio de 2001, publicado en agosto de 2001. El U.S. Department of Health and Human Services, Atlanta, [http://www.cdc.gov/ncidod/hip/NNIS/2001nnis\\_report.PDF](http://www.cdc.gov/ncidod/hip/NNIS/2001nnis_report.PDF)]

50 establece que la resistencia a antibióticos de *Pseudomonas aeruginosa* aislada a partir de infecciones nosocomiales de pacientes ingresados en UCI en 1999 ha aumentado durante el periodo de 1994 - 98 para todas las clases de antibióticos estudiadas. Existe por tanto una necesidad demostrada de nuevas metodologías para el control de las infecciones por *Pseudomonas aeruginosa*. Los inventores en este caso han abordado este problema a través del uso de nuevas terapias basadas en bacteriófagos.

55 **[0011]** Los bacteriófagos (a menudo conocidos simplemente como "fagos") son virus que crecen dentro de las bacterias. El nombre se traduce como "comedores de bacterias" y refleja el hecho de que al crecer, la mayoría de los bacteriófagos destruyen a su hospedador bacteriano al liberarse la siguiente generación de bacteriófagos. El trabajo temprano con los bacteriófagos estuvo obstaculizado por muchos factores, uno de los cuales era la extendida

60 creencia de que sólo había un tipo de bacteriófago, un virus no específico que destruye a todas las bacterias. De hecho, el abanico de hospedadores de los bacteriófagos (el espectro de bacterias que son capaces de infectar) es a menudo muy específico. Esta especificidad puede considerarse como una fuerza terapéutica, ya que las poblaciones de bacteriófagos pueden elegirse para que eliminen específicamente sólo las bacterias objetivo. Por otro lado, los antibióticos destruyen una amplia variedad de bacterias y su uso puede dar lugar consecuentemente a una

65 alteración de la flora normal, dando lugar a la recolonización del cuerpo por parte de bacterias inapropiadas y a menudo perjudiciales.

**[0012]** A pesar de las ventajas terapéuticas proporcionadas por la especificidad de hospedador de los bacteriófagos, esta característica tiene el inconveniente de que puede ser difícil conseguir una amplitud de acción en las cepas objetivo. Por esta razón ha habido un interés en hallar combinaciones de bacteriófagos con una amplia capacidad de direccionamiento en relación con los tipos particulares de infección bacteriana (véase por ejemplo Pirsí, The Lancet (2000) 355,1418).

**[0013]** Los inventores en este caso han establecido una combinación de bacteriófagos que consiste en seis bacteriófagos, cada uno con una especificidad de cepa diferente frente a *Pseudomonas aeruginosa* y que son particularmente adecuados para un amplio direccionamiento hacia infecciones por *P. aeruginosa*, especialmente, por ejemplo, las otitis caninas. Se averiguó que la combinación era capaz de destruir el 90 % de las cepas de *P. aeruginosa* recogidas a partir de otitis externas caninas y de otras otitis caninas. Adicionalmente, han establecido que dicha combinación de fagos puede emplearse sinérgicamente con un tratamiento antibiótico para conseguir una mejora en la eficacia. Como consecuencia, ahora se ha extrapolado que la terapia combinada de fago / antibiótico representa una nueva metodología general ventajosa para afrontar las infecciones bacterianas caracterizadas por la formación de una biopelícula.

**[0014]** La terapia con fagos y antibióticos ha sido usada previamente de forma conjunta en Europa oriental (véase por ejemplo Bradbury, The Lancet (febrero de 2004) 363, 624 - 625), pero no había una relación específica con la formación de una biopelícula. Adicionalmente, se ha sugerido que los antibióticos pueden afectar negativamente al uso de la terapia con bacteriófagos, dado que los bacteriófagos usan el metabolismo bacteriano para replicarse y esto es inhibido por los antibióticos (Payne y Janssen, Clinical Pharmacokinetics (2002) 42, 315 - 325).

**[0015]** El documento WO2004/062677 describe una composición para el tratamiento de una biopelícula bacteriana, que comprende un primer bacteriófago escapa de infectar una bacteria dentro de dicha biopelícula, y una primera enzima liasa de polisacárido que es capaz de degradar un polisacárido dentro de dicha biopelícula.

**[0016]** El documento WO2002/007742 describe composiciones y métodos para la profilaxis y el tratamiento de infecciones bacterianas mediante el uso de bacteriófagos polivalentes con un abanico de múltiples hospedadores.

**[0017]** Carlton (Arch. Immunol. Ther. Exp. 47 (5): 267 - 274; 1999) describe el uso histórico de bacteriófagos como agentes terapéuticos *in vitro* en varios ensayos desde los años 20 hasta los años 50, apreciando las limitaciones presentes en dichos ensayos.

**[0018]** Soothill (Burns 20 (3): 209 - 211; 1994) describe estudios sobre el efecto de la infección por *Pseudomonas aeruginosa* sobre la supervivencia de injertos cutáneos en cobayas, y su control mediante un bacteriófago.

**[0019]** Hanlon (Appl. Envir. Microbiol. 67 (6): 2746 - 2753; 2001) describe una reducción en la viscosidad del exopolisacárido como una ayuda a la penetración del bacteriófago a través de biopelículas de *Pseudomonas aeruginosa*.

**[0020]** El documento SU1472500 describe una cepa del bacteriófago de *Pseudomonas aeruginosa* usada para la identificación y la señalización de microbios de *Pseudomonas aeruginosa*.

**[0021]** Tait (Biofouling 18 (4): 305 - 311; 2002) describe una investigación sobre la capacidad del bacteriófago y sus despolimerasas de polisacárido asociadas para controlar la formación de una biopelícula entérica.

### **Resumen de la Invención**

**[0022]** La presente invención proporciona una preparación de bacteriófago que comprende uno o más bacteriófagos para su uso en un método terapéutico o profiláctico de tratamiento de una infección bacteriana, según se describe en las reivindicaciones.

**[0023]** En un aspecto, la presente memoria descriptiva proporciona el uso de (i) uno o más bacteriófagos y (ii) uno o más antibióticos, en la elaboración de un producto combinado para la administración simultánea, por separado o secuencial de (i) y de (ii) para el tratamiento de una infección bacteriana caracterizada por la formación de una biopelícula, por ejemplo, una infección bacteriana que comprende o que consiste en *Pseudomonas aeruginosa*.

**[0024]** Se entenderá que el tratamiento de dicha infección bacteriana en este contexto significa un tratamiento tanto terapéutico como profiláctico. Los bacteriófagos son especialmente adecuados para el uso profiláctico debido a que:

- los agentes químicos deben usarse por encima de unos niveles mínimos específicos para que sean eficaces.

Unos niveles menores son como mucho ineficaces. En el peor de los casos, pueden favorecer el desarrollo de resistencias.

- por el contrario, los agentes de replicación biológica tienen la capacidad innata de generar dosis terapéuticas tanto y cuando sea necesario, incluso desde una dosis introducida muy baja.

5

**[0025]** La presente memoria descriptiva también proporciona un conjunto de bacteriófagos activos frente a *Pseudomonas aeruginosa* que muestran cada uno una diferente especificidad de cepa. Más particularmente, la memoria descriptiva proporciona ocho bacteriófagos depositados en la National Collection of Industrial and Marine Bacteria, Aberdeen, Reino Unido, el 24 de junio de 2003 como NCIMB 41174, NCIMB 41175, NCIMB 41176, NCIMB 41177, NCIMB 41178, NCIMB 41179, NCIMB 41180 y NCIMB 41181 y mutantes de los mismos que conservan la capacidad de dirigirse a *P. aeruginosa*. Aunque los miembros del conjunto podrían usarse individualmente, se prefiere el uso de combinaciones de dichos fagos de forma que se amplíe la eficacia frente a la cepa objetivo. Como se ha indicado anteriormente se ha averiguado que una combinación de seis de estos fagos, más particularmente desde N41174 hasta N41179, es particularmente ventajosa para el tratamiento de las otitis caninas que comprenden *P. aeruginosa* y también podrían ser empleados ventajosamente en el tratamiento de otras infecciones por *P. aeruginosa*, especialmente junto con un tratamiento antibiótico. Dicho tratamiento con fagos o un tratamiento combinado con fagos y antibióticos también podía combinarse con el uso de alginasa. De nuevo, se entenderá que dicho tratamiento engloba el tratamiento profiláctico.

**[0026]** La memoria descriptiva también se extiende a métodos no terapéuticos de eliminación, reducción o prevención de la contaminación bacteriana caracterizada por la formación de una biopelícula. En una forma de realización, dicho método comprende la aplicación en el sitio o en el posible sitio de contaminación de uno o más bacteriófagos capaces de dirigirse a las bacterias de la contaminación, y simultáneamente, por separado o secuencialmente en el mismo, de uno o más antibióticos o antisépticos. En otra forma de realización, se proporciona un método de eliminación, reducción o prevención de la contaminación bacteriana que comprende o que consiste en *P. aeruginosa* que comprende la aplicación en el sitio o en el posible sitio de contaminación de uno o más de los bacteriófagos depositados mencionados anteriormente.

**[0027]** Los fagos de la memoria descriptiva también pueden usarse en métodos para la detección de la presencia de cepas objetivo de *P. aeruginosa*. Consecuentemente, la memoria descriptiva proporciona un método de detección de *P. aeruginosa* en una muestra *in vitro*, por ejemplo, en una muestra biológica procedente de un ser humano o de un animal con fines diagnósticos, que comprende poner en contacto dicha muestra con uno o más bacteriófagos de la invención, y determinar si dicho(s) bacteriófago(s) es (son) capaz(es) de destruir las bacterias de dicha muestra.

35

**[0028]** La memoria descriptiva también proporciona un método de identificación de una cepa bacteriana indicativa para un bacteriófago elegido de entre los ocho bacteriófagos depositados enumerados anteriormente, método que comprende las etapas de medir la formación de placa por el bacteriófago en varias cepas bacterianas y elegir una cepa que permita la formación de al menos 1.000 veces más placa por dicho bacteriófago que por cualquier otro de dichos bacteriófagos depositados.

40

**[0029]** También se proporcionan cepas bacterianas identificadas mediante dicho método que pueden usarse para la identificación de los bacteriófagos presentes en las preparaciones destinadas al uso terapéutico y/o a la identificación de las cepas presentes en muestras tisulares obtenidas durante dicho uso terapéutico o después de dicho uso. Dichas cepas bacterianas también pueden usarse como cepas de recuento para determinar la cantidad de un bacteriófago en particular capaz de infectar la cepa en una preparación de bacteriófago.

45

### **Breve descripción de las figuras**

50 **[0030]**

**Figura 1:** eficacia de los bacteriófagos frente a diferentes cepas de *Pseudomonas aeruginosa*. Las cepas indicadas en negrita eran resistentes.

55

□ placas observadas

■ sin placas

x Uno de

(1) se observó alguna inhibición diluible pero sin placas evidentes, o

(2) mediante una evaluación visual, la cepa aislada de *P. aeruginosa* se consideró poco susceptible

60

ND no realizado

Los seis bacteriófagos BC-BP-01, BC-BP-02, BC-BP-03, BC-BP-04, BC-BP-05 y BC-BP-06 (correspondientes a los depósitos NCIMB 41174, NCIMB 41175, NCIMB 41176, NCIMB 41177, NCIMB 41178 y NCIMB 41179 respectivamente) conjuntamente dieron como resultado una cobertura del 90 % de todas las cepas cribadas de *P. aeruginosa*.

65

Ejemplos de cepas aisladas bacterianas usadas:

Bacteria	Cepa	Especie de origen	Fecha de la cepa aislada	Ubicación	Número de pases
7 Usada para BC- BP-04	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Humano	Años 60	US army surgical research unit Ft Sam Houston, Texas, EE.UU.	10 - 100
3708 Usada para BC-BP-01	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Humano	Años 70	Public Health Laboratory, Cambridge, Reino Unido	10 - 100
G184 Usada para BC-BP-02	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Humano	Años 80	Edimburgo, Reino Unido	10 - 100
919686 Usada para BC-BP-05	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Perro	Años 80	Idexx Laboratories, Wetherby, Reino Unido	2 - 3
27225 Usada para BC-BP-06	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Perro	2003	Royal Veterinary College, Londres, Reino Unido	2 - 3
C33138 Usada para BC-BP-03	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Perro	2003	Axiom laboratories, Devon, Reino Unido	2 - 3

Figura 2: identificación de una cepa de recuento BC-BP-03. Las placas de cepas de recuento infectadas son como sigue:

- A: no infectada.
- B: infectada con BC-BP-03 (dilución de 1.000.000 veces).
- C: infectada con BC-BP-01 (dilución de 10 veces).
- D: infectada con BC-BP-04 (dilución de 10 veces).
- E: infectada con BC-BP-02 (dilución de 10 veces).

Figura 3: resolución de la infección en un oído canino tratado con el bacteriófago BC-BP-04:

- A: aspecto del oído derecho 24 horas después del tratamiento con 400 unidades infecciosas de BC-BP-04.
- B: aspecto del oído izquierdo que no recibió el tratamiento con bacteriófago.

Figura 4: mejora en la puntuación clínica total como el % del nivel inicial (oclusión, eritema, úlcera, tipo de exudado, volumen de exudado, olor) de seis perros con una otitis resistente a antibióticos después de 2 días de tratamiento con una preparación de bacteriófagos combinados que contiene los seis bacteriófagos desde NCIMB 41174 hasta NCIMB 41179 (BioVet-PA) (la línea continua más gruesa es un promedio)

Figura 5: recuento de bacterias *Pseudomonas* por gramo de detrito como el % del nivel inicial en el mismo grupo de perros en tratamiento después de 2 días de tratamiento (la línea continua más gruesa es un promedio)

Figura 6: número de bacteriófagos por gramo de detrito como el % del nivel original (escala log) en el mismo grupo de perros en tratamiento después de 2 días de tratamiento (la línea continua más gruesa es un promedio)

### Descripción detallada de la invención

**[0031]** La presente memoria descriptiva utiliza grupos de virus naturales que infectan bacterias patógenas. Dichos grupos pueden formularse en medicamentos terapéuticos adecuados para la evaluación a lo largo de los procesos de ensayos clínicos. Como se ha indicado anteriormente, en un aspecto, la memoria descriptiva proporciona el uso de (i) uno o más bacteriófagos y (ii) uno o más antibióticos en la elaboración de un producto combinado para la administración simultánea, por separado o secuencial de (i) y de (ii) para el tratamiento de la infección bacteriana caracterizada por la formación de una biopelícula. Con este fin puede emplearse un conjunto de dos o más bacteriófagos en la elaboración de una única preparación combinada de bacteriófagos. Los bacteriófagos del grupo elegido serán preferiblemente capaces de infectar la misma especie bacteriana, y cada uno mostrará una especificidad de cepa diferente.

**[0032]** Los antibióticos que se van a usar pueden pertenecer a cualquier clase conocida que sea activa frente a cualquiera de las especies bacterianas presentes o probablemente presentes en la biopelícula. Preferiblemente, el uno o más antibióticos se administran después del uno o más bacteriófagos, de forma que se haya establecido la replicación del bacteriófago antes de que comience cualquier tratamiento antibiótico. En este caso, el tratamiento antibiótico puede retrasarse unos días desde la aplicación del uno o más bacteriófagos, por ejemplo, desde 1 hasta 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 días. Preferiblemente, se tomará una muestra del sitio de infección para comprobar que se está produciendo la replicación del bacteriófago antes de comenzar el tratamiento antibiótico. Cuando se emplea un grupo de bacteriófagos en el que cada miembro del grupo muestra una diferente especificidad de cepa, será suficiente con que al menos una proporción del grupo pueda dirigirse a la infección bacteriana. Esto puede ser un único bacteriófago o más de un bacteriófago.

**[0033]** Cuando se emplea un grupo de bacteriófagos, los bacteriófagos pueden proporcionarse en forma de una única composición terapéutica o como varias composiciones terapéuticas por separado, comprendiendo cada una uno o más miembros del grupo. Un grupo adecuado puede consistir en dos o más, en tres o más, en cuatro o más, en cinco o más o en seis, cepas de bacteriófagos. Dicho grupo puede comprender dos, tres, cuatro, cinco, seis, 5 siete, ocho, nueve, diez, quince, veinte o más bacteriófagos diferentes. Los bacteriófagos puede ser del mismo grupo taxonómico de virus o de grupos diferentes.

**[0034]** Los bacteriófagos con el potencial de controlar infecciones bacterianas pueden ser identificados mediante un proceso de bioprospección. Esto implica la identificación de dichos agentes mediante el ensayo del 10 material procedente de fuentes ricas en las bacterias objetivo, y la introducción de dicho material en cultivos de las bacterias objetivo. Puede tomarse una muestra adecuada a partir de las aguas residuales de un hospital, urbanas o de otra fuente.

**[0035]** Normalmente, las muestras de aguas residuales se mezclan con un medio de cultivo bacteriano en 15 polvo o líquido y con las cepas de bacterias objetivo frente a las que se desean bacteriófagos específicos para la cepa aislada.

**[0036]** Las muestras se criban para comprobar la presencia de los bacteriófagos adecuados mediante la monitorización de su efecto sobre las células bacterianas. Normalmente esto puede implicar la determinación de la 20 muerte bacteriana mediante la observación de la formación de zonas claras en el crecimiento bacteriano sobre sustratos sólidos ("placas"), o de una pérdida de turbidez en un cultivo líquido.

**[0037]** Cada una de las cepas de bacteriófago elegida para la formación de un grupo para su uso en una terapia combinada de fagos y antibióticos según se ha analizado anteriormente presentará normalmente actividad 25 frente a la misma especie bacteriana objetivo. Por actividad se entiende la capacidad de un bacteriófago de infectar esa especie bacteriana y de tener un efecto perjudicial sobre las células infectadas. Esto puede observarse en la muerte de algunas o de todas las células infectadas. Preferiblemente, los bacteriófagos presentarán actividad frente a la especie bacteriana objetivo, pero no tendrán actividad o tendrán una actividad menor frente a otra especie bacteriana.

**[0038]** Una vez aislada la cepa, los bacteriófagos pueden ensayarse frente a múltiples cepas (cepas aisladas) 30 de la especie bacteriana objetivo con objeto de determinar su actividad y su especificidad. Estas cepas aisladas pueden tomarse a partir de pacientes infectados o colonizados con una especie bacteriana. Las cepas aisladas adecuadas también pueden obtenerse a partir de fuentes naturales o medioambientales de la cepa bacteriana objetivo, tales como muestras de suelo. Los métodos para el aislamiento de bacterias a partir de dichas muestras 35 son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, las cepas de aisladas *P. aeruginosa* adecuadas para el ensayo de grupos de bacteriófagos pueden obtenerse a partir de infecciones conocidas por *P. aeruginosa* tales como otitis externas, infecciones tópicas, infecciones de quemaduras, infecciones nosocomiales u otras infecciones. Las cepas aisladas adecuadas también pueden obtenerse a partir de fuentes naturales de *P. aeruginosa*, tales como muestras 40 de suelo.

**[0039]** Como se ha indicado anteriormente, es particularmente deseable reunir un grupo de fagos que muestre una especificidad de cepa más amplia para la especie bacteriana objetivo que cualquiera de los fagos individuales 45 elegidos. Esto es, el grupo de bacteriófagos es capaz de destruir un número mayor de cepas o de cepas aisladas de la especie bacteriana objetivo que cualquiera de los bacteriófagos individuales elegidos.

**[0040]** Esto puede conseguirse mediante la inclusión en la preparación de varias cepas de bacteriófagos que tenga cada una, una especificidad diferente para la cepa bacteriana aislada objetivo, proporcionando la preparación una eficacia global total frente a muchas más cepas que cualquiera de los bacteriófagos individuales. El grupo de 50 fagos puede incluir una o más cepas de bacteriófagos que son eficaces frente a un amplio espectro de cepas bacterianas aisladas de la especie objetivo, de forma que los bacteriófagos de la preparación tengan una eficacia solapada, dirigiéndose múltiples bacteriófagos a algunas cepas aisladas específicas, ayudando por tanto a minimizar cualquier desarrollo de resistencia. Las cepas individuales de la especie bacteriana objetivo pueden ser por tanto destruidas por uno o más de los bacteriófagos que forman una preparación. La actividad de los bacteriófagos frente 55 a una variedad de cepas aisladas, por ejemplo, de al menos 50 cepas aisladas, puede ser ensayada y correlacionarse le información resultante para identificar un grupo de al menos dos bacteriófagos diferentes que tengan una eficacia combinada frente a la especie bacteriana objetivo que es mayor que la eficacia de cualquiera de los bacteriófagos individuales. Dicho desarrollo de un grupo está ejemplificado mediante el desarrollo de un grupo de bacteriófagos eficaces frente a *Pseudomonas aeruginosa* según se muestra en la Figura 1.

**[0041]** Los bacteriófagos pueden hacerse crecer por separado en cepas (cepas de crecimiento) del 60 hospedador (o de una especie relacionada) que soporta el crecimiento hasta elevados niveles, titularse y combinarse a concentraciones terapéuticas. Normalmente, esto puede variar desde 100 hasta 100.000.000 de unidades infecciosas por dosis de cada bacteriófago en la mezcla.

**[0042]** La cantidad empleada de cada bacteriófago dependerá de su virulencia frente a la especie bacteriana

objetivo. Pueden usarse cepas bacterianas de recuento en el desarrollo de un grupo, es decir, cepas bacterianas que son indicadores de miembros prospectivos individuales del grupo. Una cepa de recuento puede permitir al menos 1.000 veces más formación de placa por parte de un miembro prospectivo del grupo de fagos que cualquier otra. De esta forma puede conseguirse un grupo que es coherentemente eficaz frente a una amplia variedad de cepas bacterianas aisladas.

**[0043]** Como se ha indicado anteriormente, la terapia combinada de fago / antibiótico de acuerdo con la memoria descriptiva puede ser particularmente útil, por ejemplo, para dirigirse a una infección bacteriana que comprende o que consiste en *Pseudomonas aeruginosa*. Dicha infección puede estar, por ejemplo, en el sitio de una quemadura cutánea o de otra herida cutánea. Puede ser en el pulmón, una infección ocular o una otitis. En este contexto, se entenderá que dicha infección que comprende *P. aeruginosa* incluye una infección consistente esencialmente en *P. aeruginosa*. Por lo tanto, puede aplicarse la terapia con fagos de acuerdo con la memoria descriptiva a una infección formada completamente, predominantemente o significativamente por *P. aeruginosa*.

**[0044]** Como se ha mencionado anteriormente, la presente invención proporciona ocho cepas de bacteriófagos depositadas, que en este documento se demuestra que son eficaces para destruir una amplia variedad de cepas aisladas de *P. aeruginosa*, y de mutantes de las mismas, que conservan la capacidad de dirigirse a la misma especie bacteriana. Las pertinentes cepas de bacteriófagos que fueron depositadas en la National Collection of Industrial and Marine Bacteria (23 St Machar Drive, Aberdeen, AB24 3RY, Escocia, Reino Unido) el 24 de junio de 2003 son como sigue:

Referencia	Número de depósito del NCIMB
BC-BP-01	NCIMB 41174
BC-BP-02	NCIMB 41175
BC-BP-03	NCIMB 41176
BC-BP-04	NCIMB 41177
BC-BP-05	NCIMB 41178
BC-BP-06	NCIMB 41179
BC-BP-07	NCIMB 41180
BC-BP-08	NCIMB 41181

**[0045]** Estos bacteriófagos pueden emplearse terapéuticamente individualmente o como parte de un grupo de fagos para combatir una infección por *P. aeruginosa*. Por ejemplo, un grupo de fagos para su uso de acuerdo con la invención puede comprender dos, tres, cuatro, cinco, seis o siete cualesquiera, o las ocho, cepas depositadas. Cualquiera de dichas cepas depositadas puede ser sustituida por un mutante de la misma que muestre una especificidad deseada hacia una cepa de *P. aeruginosa*. Como se ha indicado anteriormente, se ha averiguado que un grupo que consiste en las seis cepas BC-BP-01, BC-BP-02, BC-BP-03, BC-BP-04, BC-BP-05 y BC-BP-06 es particularmente favorable, por ejemplo, para uso veterinario en otitis caninas tanto solo como más preferiblemente junto con una terapia antibiótica. Sin embargo, la utilidad de éste grupo de fagos no está restringida a dicho uso. Puede hallar uso frente una infección por *P. aeruginosa* en diversas situaciones clínicas.

**[0046]** En un aspecto adicional, la memoria descriptiva proporciona una composición farmacéutica que comprende uno o más bacteriófagos elegidos de entre las ocho cepas de bacteriófagos depositadas mencionadas anteriormente y mutantes de las mismas que conservan la capacidad de dirigirse a *P. aeruginosa*, junto con un portador farmacéutico o un portador diluyente. Algunos portadores y diluyentes adecuados incluyen soluciones salinas isotónicas, por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato. La composición puede formularse para su administración por vía parenteral, intramuscular, intravenosa, subcutánea, transdérmica, ocular o auditiva, por ejemplo, una formulación líquida para su administración en forma de gotas oculares u óticas. Dicha preparación de bacteriófagos puede usarse directamente, almacenarse congelada en una solución acuosa u otra solución con un crioprotector apropiado (por ejemplo, sacarosa al 10 %), liofilizarse y rehidratarse antes de su uso, o permanecer estable en alguna otra formulación que incluye (pero no se limita a) un comprimido, una emulsión, un ungüento o un apósito para heridas impregnado, u otro artículo.

**[0047]** En otro aspecto adicional más, la memoria descriptiva proporciona un producto combinado para la administración simultánea, por separado o secuencial de un grupo de bacteriófagos para el tratamiento de una infección bacteriana que comprende o que consiste en *P. aeruginosa*, teniendo cada miembro de dicho grupo una especificidad de cepa diferente y en el que dicho grupo consiste en dos o más bacteriófagos elegidos de entre NCIMB 41174, NCIMB 41175, NCIMB 41176, NCIMB 41177, NCIMB 41178, NCIMB 41179, NCIMB 41180 y NCIMB 41181 y mutantes de los mismos que conservan la capacidad de dirigirse a *P. aeruginosa*. Como se ha indicado anteriormente, en una forma de realización ejemplificada, el grupo consiste en los seis bacteriófagos desde NCIMB 41174 hasta NCIMB 41179. Éstos pueden emplearse individualmente, o más preferiblemente, en una única composición farmacéutica. Un producto o una composición combinada que comprende uno o más de los anteriormente mencionados bacteriófagos depositados puede comprender adicionalmente uno o más antibióticos para una administración simultánea, por separado o secuencial a la del uno o más bacteriófagos. Dicho producto o



composición combinada puede comprender alternativa o adicionalmente una alginasa. La alginasa también puede proporcionarse para la administración simultánea, por separado o secuencial del uno o más bacteriófagos elegidos.

**[0048]** La especificidad de objetivo de un bacteriófago puede alterarse mediante la elección del sustrato sobre el que crece. Esto es, dos bacteriófagos genéticamente idénticos pueden mostrar diferentes especificidades de objetivo cuando se han hecho crecer sobre diferentes sustratos. En este caso, un bacteriófago puede ser identificado por la secuencia de nucleótidos de su genoma. Se considera que un bacteriófago con la misma secuencia genómica que uno de las ocho cepas de bacteriófagos depositadas enumeradas anteriormente es el mismo bacteriófago, incluso si la especificidad de objetivo que muestra no es idéntica a la de la cepa depositada.

**[0049]** Como se ha mencionado anteriormente, la memoria descriptiva también describe mutantes de las cepas depositadas que conservan la capacidad de destruir bacterias de la especie objetivo. En particular, la memoria descriptiva también describe formas mutantes de estas cepas que conservan una especificidad de objetivo similar o mejorada con respecto a la de la cepa de la que derivan. Por lo tanto, uno o más bacteriófagos en una composición o producto combinado según se describe en este documento puede ser mutantes derivados de estas cepas depositadas que conservan la capacidad de infectar y muestran actividad frente a *Pseudomonas aeruginosa*.

**[0050]** Los bacteriófagos mutantes adecuados pueden derivar de una cualquiera de las ocho cepas depositadas BC-BP-01, BC-BP-02, BC-BP-03, BC-BP-04, BC-BP-05, BC-BP-06, BC-BP-07 y BC-BP-08. Una cepa mutante adecuada puede conservar la misma especificidad de objetivo que la cepa de la que deriva. Esto es, puede infectar y destruir las mismas cepas aisladas o cepas de la especie bacteriana objetivo que el bacteriófago depositado. De forma análoga, puede ser ineficaz frente a las mismas cepas bacterianas aisladas o cepas que el bacteriófago depositado. Alternativamente, pueden usarse cepas mutantes de bacteriófagos que tengan una especificidad de objetivo alterada, siendo más o menos capaces de infectar y destruir cepas aisladas en particular o cepas de la especie bacteriana objetivo.

**[0051]** Las cepas mutantes de bacteriófagos adecuadas pueden tener un genoma similar al de una cepa depositada. Esto es, la secuencia de nucleótidos del genoma de un bacteriófago mutante puede conservar una identidad de secuencia con respecto al genoma del bacteriófago depositado del que deriva. Las cepas mutantes adecuadas pueden conservar una identidad de la secuencia de nucleótidos de al menos el 90 %, de al menos el 95 %, de al menos el 97 %, de al menos el 98 % o de al menos el 99 % con respecto al genoma de una cepa depositada, a lo largo de la longitud completa del genoma. En una forma de realización, el genoma de un bacteriófago mutante puede comprender un gen que codifica para una proteína terapéutica adicional, según se explica a continuación. En dicho caso, el genoma del bacteriófago puede consistir en un genoma con un grado de identidad de la secuencia de nucleótidos según se establece anteriormente, más aquellas secuencias necesarias para la expresión de la proteína terapéutica adicional.

**[0052]** El Conjunto UWGCG proporciona el programa BESTFIT que puede usarse para calcular la identidad de secuencia (por ejemplo, usado con sus ajustes por defecto) (Devereux y col (1984) Nucleic Acids Research 12, 387 - 395). Alternativamente pueden usarse los algoritmos PILEUP y BLAST para calcular la identidad o alinearlas (normalmente con sus ajustes por defecto), por ejemplo, según se describe en Altschul S. F. (1993) J Mol Evol 36: 290 - 300; Altschul, S. F. y col. (1990) J Mol Biol 215: 403 - 10. Por lo tanto, la identidad puede calcularse mediante el uso del conjunto UWGCG, mediante el uso del programa BESTFIT con sus ajustes por defecto. Alternativamente, la identidad de secuencia puede calcularse mediante el uso de los algoritmos PILEUP o BLAST. Puede usarse BLAST con sus ajustes por defecto.

**[0053]** El programa informático para la realización de los análisis BLAST está disponible públicamente a través del National Centre for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Este algoritmo implica en primer lugar la identificación de los pares de secuencias de alta puntuación (HSPs) mediante la identificación de palabras cortas de longitud W en la secuencia problema que coinciden o satisfacen una puntuación umbral de valor positivo T cuando son alineadas con una palabra de la misma longitud en una secuencia de la base de datos. T se conoce como el umbral de puntuación de palabras vecinas (Altschul y col, *supra*). Estos aciertos iniciales de palabras vecinas actúan como semillas para iniciar búsquedas para encontrar HSPs que los contengan. Los aciertos de palabra se extienden en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia siempre que pueda aumentarse la puntuación de la alineación acumulada. Las extensiones de los aciertos de palabras en cada dirección se detienen cuando: la puntuación de alineación acumulada cae fuera en una cantidad X de su valor máximo conseguido; la puntuación acumulada es cero o inferior, debido a la acumulación de una o más alineaciones residuales de puntuación negativa; o se ha alcanzado el final de alguna de las secuencias. Los parámetros del algoritmo BLAST W, T y X determinan la sensibilidad y la velocidad de la alineación. El programa BLAST usa por defecto una longitud de palabra (W) de 11, unas alineaciones de la matriz de puntuación BLOSUM62 (véase Henikoff y Henikoff (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 89: 10915 - 10919) (B) de 50, una expectativa (E) de 10, M = 5, N = 4, y una comparación de ambas hebras.

**[0054]** El algoritmo BLAST realiza un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias; véase, por ejemplo, Karlin y Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 90: 5873 - 5787. Una medición de similitud proporcionada por el algoritmo BLAST es la mínima probabilidad sumada (P(N)), que proporciona una indicación de

la probabilidad por la que se produciría una coincidencia al azar entre dos secuencias de polinucleótidos o de aminoácidos. Por ejemplo, una secuencia se considera similar a otra secuencia si la mínima probabilidad sumada en la comparación de la primera secuencia con la segunda secuencia es menor de aproximadamente 1, preferiblemente menor de aproximadamente 0,1, más preferiblemente menor de aproximadamente 0,01, y lo más preferiblemente menor de aproximadamente 0,001.

**[0055]** Pueden realizarse mutaciones en bacteriófagos específicos mediante métodos químicos, radiológicos u otros bien conocidos por los expertos en la técnica. Los mutantes con características útiles pueden elegirse después mediante el análisis de las características infecciosas, físicas o genéticas, por ejemplo, de la capacidad de infectar cepas bacterianas previamente resistentes. La mutación también puede realizarse mediante métodos de recombinación homóloga bien conocidos por los expertos en la técnica. La secuencia mutada puede comprender delecciones, inserciones o sustituciones, todas las cuales son construidas mediante técnicas rutinarias. Las inserciones pueden incluir genes marcadores seleccionables, por ejemplo, *lacZ*, para cribar virus recombinantes mediante, por ejemplo, la actividad  $\beta$ -galactosidasa.

**[0056]** Las inserciones también pueden incluir secuencias que codifican para proteínas deseadas para su administración simultánea junto con los bacteriófagos, según se describe con más detalle a continuación. Por ejemplo, uno o más de los bacteriófagos de una preparación de la memoria descriptiva pueden incluir una secuencia que codifica para una alginasa, tal que la alginasa es expresada en una célula bacteriana infectada.

**[0057]** Los productos que contienen los bacteriófagos de la invención pueden ser utilizados en muchas situaciones en las que la terapia antibiótica convencional es problemática. En otro aspecto más, la memoria descriptiva proporciona un método de tratamiento terapéutico o profiláctico de una infección bacteriana caracterizada por la formación de una biopelícula que comprende la administración a un ser humano o a un animal no humano en necesidad de los mismos de uno o más bacteriófagos capaces de dirigirse a las bacterias de dicha infección y simultáneamente, por separado o secuencialmente con los mismos, uno o más antibióticos. En una forma de realización, los bacteriófagos empleados pueden ser uno o más de los bacteriófagos depositados indicados anteriormente capaces de dirigirse a infecciones por *P. aeruginosa*. La memoria descriptiva también proporciona en otro aspecto adicional un método de tratamiento terapéutico o profiláctico de una infección bacteriana que comprende o que consiste en *P. aeruginosa* que comprende la administración a un ser humano o a un animal no humano en necesidad de los mismos de uno o más de los bacteriófagos depositados o de mutantes de los mismos, según se ha analizado anteriormente.

**[0058]** En particular, las preparaciones o las cepas de la invención pueden usarse para abordar las infecciones crónicas o resistentes a antibióticos. Por lo tanto, el uso de las preparaciones de bacteriófagos y cepas según se ha especificado puede ser inicialmente un tratamiento secundario en el que la infección ha demostrado ser difícil de eliminar con los antibióticos existentes, o en combinación o en rotación cuando existe una necesidad crítica de eliminar la infección. Por lo tanto, pueden usarse para complementar y suplementar el uso de antibióticos en relación con infecciones por *P. aeruginosa* caracterizadas por la formación de una biopelícula.

**[0059]** La infección tratada puede ser en un ser humano o en un animal, por ejemplo, en un perro o en un gato. La infección puede estar, por ejemplo, en el oído, el ojo, la piel o en otra ubicación tópica. La infección puede ser sistémica. Las infecciones por *Pseudomonas aeruginosa* que pueden tratarse mediante los métodos de la invención incluyen otitis externa y otras otitis, queratitis y otras infecciones oculares, foliculitis, infecciones en quemaduras y rechazo inducido de trasplantes, infecciones en heridas, infecciones adquiridas en el hospital (infecciones nosocomiales) e infecciones pulmonares, por ejemplo, en la fibrosis quística. También pueden tratarse infecciones del tracto urinario y bacteremias.

**[0060]** Algunos usos profilácticos específicos del fago de acuerdo con la memoria descriptiva son: inclusión ocular en gotas oculares, soluciones o aditivos para lentes de contacto, incluido en lentes de contacto o formulado de otro modo para su administración en el ojo para la prevención de una infección por *P. aeruginosa*.

**[0061]** Inclusión ótica en gotas óticas, tapones auditivos, apósitos impregnados (por ejemplo, de algodón hidrófilo) dispositivos para su implantación (por ejemplo, injertos de membrana timpánica, injertos óseos) o de otro modo formulado para su administración en el oído para la prevención de una infección por *P. aeruginosa*. Apósitos para heridas, bálsamos, injertos cutáneos y otras formulaciones para la prevención de la infección por *P. aeruginosa* de las superficies corporales o de dispositivos dentro del cuerpo. Formulación en, o para el tratamiento de, dispositivos médicos, por ejemplo, articulaciones artificiales.

**[0062]** Las preparaciones de la memoria descriptiva pueden comprender adicionalmente, o pueden ser administradas simultáneamente, por separado o secuencialmente con, agentes terapéuticos adicionales. Por ejemplo, el tratamiento con una preparación o una cepa de la memoria descriptiva puede coordinarse con el de otro agente relacionado con la afección que se va a tratar. Las preparaciones con las cepas de la memoria descriptiva pueden administrarse junto con antibióticos para complementar o suplementar sus acciones. Las preparaciones con las cepas de la memoria descriptiva pueden administrarse junto con agentes dirigidos a otros aspectos de la afección del paciente, por ejemplo, agentes que pueden reducir la inflamación, estimular o reducir una respuesta

inmunitaria, aliviar el dolor o mejorar de cualquier otro modo el estado del paciente. Las preparaciones por las cepas de la memoria descriptiva pueden administrarse junto con otros agentes que se van a usar para tratar al paciente en los que los otros agentes pueden dar lugar a un aumento del riesgo de una infección bacteriana (por ejemplo, por *Pseudomonas aeruginosa*). Por ejemplo, las preparaciones o las cepas de la memoria descriptiva pueden administrarse a un paciente que padece una inmunosupresión, tal como una inmunosupresión localizada debida al tratamiento con otro agente.

**[0063]** En una forma de realización, el uso de las preparaciones o las cepas según se describen en este documento para el tratamiento de una infección por *P. aeruginosa*, por ejemplo, de una infección pulmonar, puede ser suplementado con la administración de una alginasa. Como se ha explicado anteriormente, *Pseudomonas* tiene tendencia a crecer en una capa compleja conocida como una biopelícula. La biopelícula es un conjunto de células microbianas asociadas en la superficie que está encerrada en una matriz de sustancia polimérica extracelular (EPS). El alginato es el principal componente de la matriz de EPS de *P. aeruginosa*. El uso de alginasa puede ayudar por tanto a destruir dichas biopelículas de *P. aeruginosa* y potenciar la eliminación de la infección. Las biopelículas pueden estar presentes en diversas infecciones por *P. aeruginosa*, incluyendo infecciones pulmonares y óticas. La administración conjunta de una alginasa con una preparación o una cepa según se describe en este documento puede ser particularmente adecuada para su uso en el tratamiento de dichas afecciones.

**[0064]** La alginasa puede estar incluida en una composición de la memoria descriptiva junto con uno o más bacteriófagos, o puede proporcionarse en una composición por separado para una administración por separado o secuencial a la del uno o más bacteriófagos. La alginasa puede proporcionarse a partir de una secuencia dentro del genoma de un bacteriófago. Esto puede implicar el aislamiento de dichos bacteriófagos a partir de fuentes medioambientales o, por ejemplo, puede modificarse genéticamente el genoma de un bacteriófago mediante métodos conocidos en la técnica para que incluya dicha secuencia unida operativamente a secuencias reguladoras adecuadas.

**[0065]** La cantidad of bacteriófago administrada dependerá del tamaño, la ubicación y la naturaleza del área que se va a tratar, y de la vía de administración usada. Dado que un tratamiento satisfactorio dará lugar a la multiplicación de los bacteriófagos y a la destrucción de las bacterias infectadas, algunos tratamientos, por ejemplo, aquellos que requieren una infección tópica, pueden requerir únicamente una dosis baja de los bacteriófagos. Esta dosis se mide en unidades infecciosas, definidas habitualmente por la capacidad para formar las zonas claras o "placas" de las placas de cultivo bacteriano. Dichas unidades se definen como "unidades formadoras de placa" o "ufp". Por ejemplo, en algunos casos, la dosis puede ser de unos pocos cientos de unidades infecciosas (ufp) o menos. Una dosis adecuada puede ser de entre  $10^2$  y  $10^8$  ufp, preferiblemente de entre  $10^4$  y  $10^6$  ufp. En otros casos, por ejemplo, en una infección sistémica o diseminada, puede ser necesario que la dosis sea mayor para asegurar que los bacteriófagos alcancen todas las áreas infectadas. En dicho caso, una dosis adecuada puede estar en el intervalo de desde  $10^4$  hasta  $10^{10}$  ufp, preferiblemente desde  $10^5$  hasta  $10^8$  ufp. Cuando se inyectan, normalmente se administran entre 10  $\mu$ l y 1 ml de bacteriófagos en un portador o un diluyente farmacéuticamente aceptable adecuado. Para su administración tópica, el volumen puede ser mayor, por ejemplo, de entre 100  $\mu$ l y 50 ml del medicamento, dependiendo del tamaño, la ubicación y la naturaleza del área que se va a tratar.

**[0066]** Las preparaciones y composiciones de bacteriófagos de la invención pueden ser administradas al paciente humano o animal por vía tópica, sistémica, oral o mediante cualquier otro medio adecuado para la administración de una dosis eficaz en el sitio de la infección que se va a tratar. La administración del bacteriófago será de tal forma que el bacteriófago pueda ser incorporado en las bacterias en el sitio de la infección. Las vías de administración y las dosis descritas sólo pretenden ser una guía, dado que un facultativo experto será capaz de determinar la vía de administración y la dosis óptimas para cualquier paciente y afección en particular.

**[0067]** Como se ha indicado anteriormente, la invención también se extiende a métodos no terapéuticos de eliminación, reducción o prevención de una contaminación bacteriana caracterizada por la formación de una biopelícula, según se describe en las reivindicaciones. La memoria descriptiva proporciona un método que comprende la aplicación en el sitio o en el sitio probable de dicha contaminación de uno o más bacteriófagos capaces de dirigirse a las bacterias apropiadas, y simultáneamente, por separado o secuencialmente con los mismos, de uno o más antibióticos o antisépticos. Dicho método puede aplicarse, por ejemplo, en una contaminación por *P. aeruginosa*, en cuyo caso pueden emplearse de nuevo uno o más de los anteriormente indicados bacteriófagos depositados o un mutante de los mismos. También pueden emplearse uno o más de los mismos bacteriófagos no terapéuticamente solos para dirigirse a la contaminación bacteriana que comprende o que consiste en *P. aeruginosa*. Dichos métodos pueden aplicarse para el tratamiento de diversas superficies tanto en contextos médicos como no médicos, por ejemplo, en lentes de contacto, en superficies de dispositivos que van a ser implantados en el cuerpo, en tuberías, conductos y otras superficies en las que puedan establecerse infecciones bacterianas.

**[0068]** Las preparaciones y las cepas según se describe en este documento también pueden usarse en métodos diagnósticos *in vitro* para detectar la presencia de *Pseudomonas aeruginosa*. Dichos métodos pueden comprender las etapas de poner en contacto una muestra de prueba con uno o bacteriófagos capaces de dirigirse a *P. aeruginosa* según se ha analizado anteriormente, y determinar si cualquiera de los bacteriófagos así añadido se

es capaz de destruir las bacterias de la muestra de prueba. Preferiblemente, la muestra de prueba será cultivada antes de entrar en contacto con la preparación o la cepa, por ejemplo, en unas condiciones adecuadas para permitir el crecimiento de cualquier bacteria de la especie objetivo que esté presente. Las condiciones de cultivo adecuadas son conocidas en la técnica, y dependerán de la especie bacteriana objetivo específica.

5

**[0069]** Un grupo de bacteriófagos de la memoria descriptiva capaz de dirigirse a *P. aeruginosa* es particularmente útil para dichos métodos, ya que detectará un amplio espectro de cepas bacterianas o de cepas aisladas. Un único bacteriófago procedente de una preparación de la memoria descriptiva puede detectar únicamente una pequeña proporción de cepas o de cepas aisladas de una especie bacteriana en particular, y por lo tanto normalmente ofrecerá una tasa de falsos negativos muy alta debido a esta elevada especificidad. Sin embargo, el uso de una preparación de la memoria descriptiva, que comprende dos o más de dichos bacteriófagos, permitirá la detección de un amplio espectro de cepas de una especie bacteriana objetivo.

10

**[0070]** En una forma de realización, la muestra de prueba puede cultivarse en un medio de crecimiento sólido, tal como una placa de agar. La muestra se cultiva preferiblemente en dicho medio durante un tiempo suficiente y en unas condiciones adecuadas para que cualquier bacteria objetivo presente en la muestra se multiplique en la superficie de la placa. Al poner en contacto la superficie de la placa con una preparación o una cepa de la invención, puede determinarse si cualquiera de los bacteriófagos así añadidos son capaces de infectar y destruir las bacterias. El medio infectado por el bacteriófago puede mantenerse en unas condiciones adecuadas para la infección y la replicación del bacteriófago, de forma que los bacteriófagos tengan la oportunidad de infectar cualquier célula objetivo de *P. aeruginosa* en la placa. Esto dará lugar al desarrollo de zonas claras (placas) en las que se ha producido la muerte bacteriana, e indicará que la muestra de prueba contenía la especie bacteriana objetivo.

15

20

**[0071]** En una forma de realización alternativa, la muestra de prueba puede mantenerse en un medio líquido. De nuevo, puede cultivarse en unas condiciones adecuadas para el crecimiento bacteriano. Después de la adición de una preparación o una cepa de la memoria descriptiva, el medio puede mantenerse durante un período adicional para permitir que los bacteriófagos infecten cualquier bacteria objetivo presente. Esto dará lugar a una pérdida de turbidez en el medio cuando se produzca la muerte bacteriana, y esto indicará que la muestra de prueba contenía la especie bacteriana objetivo.

25

30

**[0072]** La muestra de prueba puede ser cualquier muestra en la que se sospeche de la presencia de la especie bacteriana objetivo. La muestra de prueba puede proceder de una fuente medioambiental o biológica. Dicha muestra de prueba puede proceder o derivar de una muestra de un fluido o de un tejido obtenida de un paciente. La muestra puede obtenerse desde la ubicación de una infección. En el caso de una infección tópica, la muestra puede obtenerse mediante la realización de un hisopado de la región infectada. El método de detección de la invención puede usarse para determinar cepas en particular de *P. aeruginosa* responsables de la infección.

35

**[0073]** Una infección susceptible de ser identificada mediante el uso de una preparación o una cepa de la memoria descriptiva normalmente será tratable mediante el uso de la misma preparación o cepa. Esto es, si los bacteriófagos de una preparación de la memoria descriptiva son capaces de destruir las bacterias obtenidas a partir de un área infectada *in vitro*, también deberían ser capaces de destruir las mismas bacterias *in situ* en el sitio de la infección.

40

**[0074]** El método de detección de la memoria descriptiva puede usarse también por lo tanto para identificar una preparación o cepa de la invención adecuada para su uso en el tratamiento. El método de detección de la memoria descriptiva también puede usarse para identificar bacteriófagos individuales que sean adecuados para su uso en dicho tratamiento individualmente, en lugar de en combinación. Esto es, mediante el uso de diferentes bacteriófagos o combinaciones de bacteriófagos en los métodos de detección de la memoria descriptiva, puede(n) elegirse el (los) bacteriófago(s) con la mayor virulencia frente a la cepa bacteriana de la infección específica para su uso en el tratamiento. Preferiblemente, para su uso en el tratamiento se elige una combinación de dos o más bacteriófagos que tengan dicha actividad.

50

**[0075]** La presente memoria descriptiva también incluye la identificación y el uso de cepas bacterianas "de recuento" para los bacteriófagos depositados indicados anteriormente. Dichas cepas bacterianas se definen como cepas de la bacteria objetivo (o una relacionada) que soporta el crecimiento de un bacteriófago del grupo especificado permitiendo únicamente un crecimiento limitado de todos los demás componentes bacteriófagos del grupo. Estas cepas de recuento pueden usarse para evaluar los títulos de las reservas de bacteriófagos.

55

**[0076]** Las preparaciones de la memoria descriptiva comprenden al menos dos bacteriófagos. A lo largo de un espectro de cepas bacterianas, el crecimiento de un bacteriófago cualquiera será soportado con una eficacia variable (o nada en absoluto). Consecuentemente, los títulos obtenidos mediante el ensayo a través de un intervalo de cepas bacterianas diferirá sustancialmente. Con objeto de proporcionar un medio de determinación / estandarización de la dosis terapéutica que se va a administrar a cada paciente, pueden usarse cepas bacterianas "de recuento". El principio de esta metodología es que el crecimiento de cada bacteriófago es soportado únicamente a un nivel usable por uno de los intervalos de cepas bacterianas. Por lo tanto puede elegirse una cepa de recuento para cada uno de los bacteriófagos de una mezcla que soporte el crecimiento de uno de los bacteriófagos pero que

60

65

no soporte el crecimiento, o sólo soporte un nivel de crecimiento bajo, de los demás bacteriófagos en la mezcla. Los títulos de cada bacteriófago constituyente de la mezcla pueden calcularse basándose en el posible crecimiento de cada una de las cepas de recuento individuales.

5 **[0077]** Por ejemplo, una cepa de recuento adecuada puede permitir al menos 1.000 veces más, al menos 1.500 veces más, al menos 2.000 veces más crecimiento, o más, de un bacteriófago en comparación con los demás bacteriófagos que se están usando en una mezcla de bacteriófagos.

10 **[0078]** El crecimiento diferencial puede ser evaluado, por ejemplo, mediante la titulación de la formación de placas por parte de los bacteriófagos en las bacterias cuando se hacen crecer en un medio de crecimiento sólido a un intervalo de concentraciones. Alternativamente, el crecimiento diferencial puede ser evaluado mediante la observación del tamaño y la naturaleza de las placas así formadas. Por ejemplo, en una forma de realización, la cepa de recuento puede permitir al menos 1.000 veces más formación de placa por parte de un bacteriófago que de otros bacteriófagos. Dicha bacteria formaría una cepa de recuento para ese bacteriófago. Por ejemplo, según se muestra en la Figura 2, una cepa de crecimiento adecuada para BC-BP-03 puede mostrar una formación de placa significativa después de la infección con BC-BP-03 a una dilución de 1.000.000 de veces, pero poca o ninguna formación de placa cuando es infectada con otros bacteriófagos (aquí BC-BP-01, BC-BP-02 y BC-BP-04) a una dilución de 10 veces (una concentración 100.000 veces mayor).

20 **[0079]** Dicha cepa de recuento también puede usarse como una cepa de propagación para la producción del bacteriófago para su uso en las composiciones de la memoria descriptiva. Por ejemplo, una composición de la memoria descriptiva puede estar formada por la combinación de las cepas de recuento requeridas en las cantidades apropiadas. Las cepas de recuento pueden tener por lo tanto un uso terapéutico por sí mismas como una fuente de bacteriófagos.

25 **[0080]** Esta técnica también permite que la replicación de cada bacteriófago en una composición terapéutica sea monitorizada individualmente en un contexto clínico. Las cepas de recuento específicas para un bacteriófago en particular pueden usarse para identificar la presencia de ese bacteriófago en particular, por ejemplo en preparaciones destinadas a un uso terapéutico o en muestras tisulares obtenidas durante o después de dicho uso terapéutico. Se anticipa que este método permitirá distinguir los bacteriófagos terapéuticos de cualquier bacteriófago foráneo que pudiera existir en la cepa con la que está infectado el paciente, y también permitiría la determinación de los bacteriófagos de la mezcla terapéutica administrada que son activos frente a la infección bacteriana de ese paciente. Las cepas bacterianas "de recuento" pueden usarse para "tipificar" cualquier bacteriófago foráneo antes de la administración de la terapia con el bacteriófago. La presencia de los bacteriófagos requeridos en una composición o medicamento pueden por lo tanto confirmarse antes del tratamiento, y la presencia de los bacteriófagos en el sitio de tratamiento puede ser monitorizada durante y después del tratamiento. Esta información puede ser usada por el facultativo médico para monitorizar y ajustar el régimen de tratamiento.

40 **[0081]** Los siguientes ejemplos ilustran las enseñanzas detalladas en la memoria descriptiva hasta ahora.

## Ejemplos

### **I. Selección inicial de los bacteriófagos activos frente a *Pseudomonas aeruginosa***

45 **(a) Aislamiento de los bacteriófagos activos frente a *Pseudomonas aeruginosa*:**

**[0082]**

50 (i) se cultivan  $3 \times 10^9$  unidades formadoras de colonias (cfu) de la cepa apropiada de *Pseudomonas aeruginosa* con aguas residuales sedimentadas y caldo de nutrientes (volumen total 200 ml).

(ii) la suspensión se incuba a 37 °C durante 24 horas.

55 (iii) se extrae una alícuota de 1 ml y se filtra a través de un filtro de jeringa de 0,45 µm.

(iv) el lisado filtrado se cultiva con la misma cepa de *Pseudomonas aeruginosa* usada en la etapa (i), y se evalúa para comprobar la presencia del bacteriófago (véase a continuación)

60 (v) las placas de nutriente agar se incuban a 37 °C durante 24 horas.

(vi) se "recoge" una única placa mediante el uso de un cable estéril de 1 mm de diámetro y se usa para inocular 3 ml de medio de crecimiento (los constituyentes de este medio variaban entre las extracciones) que contenía  $5 \times 10^6$  ufc/ml de la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* usada en la etapa (i).

65 (vii) la suspensión se incuba a 37 °C hasta que se completa la lisis de las bacterias (esto tarda normalmente entre 5 - 8 horas) y se evalúa visualmente. La evaluación visual está facilitada por la comparación de la turbidez

de la suspensión bacteriana que contiene el bacteriófago con la de una suspensión de control. Las suspensiones de control no reciben bacteriófago, pero son similares a todos los demás respectos.

- (viii) el lisado se filtra a través de un filtro de jeringa de 0,1 µm.
- (xi) el lisado se ajusta para constituir glicerol al 2 % v/v, se alicuota en viales y se almacena a -80 °C.
- (xii) los títulos se evalúan mediante el cultivo conjunto con la cepa bacteriana apropiada (véase a continuación)

**10 (b) Preparación de las Siembras Maestras:**

**[0083]** Las disoluciones madre de las siembras maestras se establecen para todos los bacteriófagos como sigue:

- 15 (i) las preparaciones primarias de bacteriófagos se cultivaron conjuntamente con la cepa de propagación apropiada de *Pseudomonas aeruginosa* en placas de agar (véase a continuación)
- (ii) las placas individuales se "recogen" mediante el uso de un cable estéril de 1 mm de diámetro y se usan para inocular 4 ml de caldo de peptona vegetal que contiene  $5 \times 10^6$  unidades formadoras de colonias ufc/ml de la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* usada en la etapa (i).
- 20 (iii) la suspensión se incuba a 37 °C hasta que se completa la lisis de las bacterias (esto tarda normalmente entre 5 - 8 horas) y se evalúa visualmente. La evaluación visual está facilitada por la comparación de la turbidez de la suspensión bacteriana que contiene el bacteriófago con la de una suspensión de control. Las suspensiones de control no reciben bacteriófago, pero son similares a todos los demás respectos.
- 25 (iv) el lisado se filtra a través de un filtro de jeringa de 0,1 µm.
- (v) la disolución madre Maestra se ajusta para constituir glicerol al 2 % v/v, se alicuota en viales y se almacena a -80 °C.
- 30 (vi) títulos evaluados mediante el cultivo conjunto con la cepa bacteriana apropiada (véase a continuación)

**35 (c) Evaluación de los títulos de los bacteriófagos individuales en una población mixta: bacteriófago frente a cepas bacterianas de recuento de *Pseudomonas aeruginosa***

**[0084]** [0084]

- 40 (i) cada bacteriófago (suspensión individual) se ensayó por duplicado en todas las cepas de recuento. Se usaron las siembras maestras.
- (ii) se calculó el título de cada bacteriófago en cada cepa bacteriana "de recuento".
- (iii) se repitieron las etapas (i) hasta (ii) en dos ocasiones adicionales.
- 45 (iv) la última vez, la suspensión de bacteriófagos mixtos que contenía las mismas proporciones de las 6 preparaciones individuales de bacteriófagos se ensayó por duplicado en todas las cepas bacterianas "de recuento".
- 50 (v) se calculó el título de la mezcla de bacteriófagos en cada cepa bacteriana "de recuento"

**[0085]** Los tres conjuntos de experimentos produjeron unos resultados comparables, que están detallados en la Tabla 1, junto con un resultado promediado

**55 Tabla 1a:** Experimento # 1 - bacteriófago frente a cepas bacterianas "de recuento"

Título (ufp/ml) (los títulos presentados son las medias de lecturas por duplicado)						
Cepa de <i>P. aeruginosa</i>	Recuento 06	Recuento 02	Recuento 03	Recuento 01	Recuento 04	Recuento 05
Bacteriófago						
BC-BP-06	$5 \times 10^9$	-	-	-	-	-
BC-BP-04	-	-	Inhibición apenas discernible, sin placas	-	$1,22 \times 10^8$	-
BC-BP-02	-	$2 \times 10^8$	Inhibición apenas	-	-	-

			discernible, sin placas			
BC-BP-05	-	-	-	-	-	<b>2,3 x 10<sup>9</sup></b>
BC-BP-01	-	-	6 x 10 <sup>2</sup>	<b>2,84 x 10<sup>8</sup></b>	-	Se observan "turbulencias" a las diluciones de 10 <sup>-1</sup> y 10 <sup>-2</sup>
BC-BP-03	-	-	<b>3,1 x 10<sup>8</sup></b>	2,2 x 10 <sup>3</sup>	-	-

**Tabla 1b:** bacteriófago frente a cepas bacterianas "de recuento" reactivas; diferencia en los títulos (experimento #1)

Título (ufp/ml) (los títulos presentados son las medias de lecturas por duplicado)			
Cepa de <i>P. aeruginosa</i>	Recuento 03	Recuento 01	Nivel de diferencia
Bacteriófago			
BC-BP-01	6 x 10 <sup>2</sup>	<b>2,84 x 10<sup>8</sup></b>	4,73 x 10 <sup>5</sup>
BC-BP-03	<b>3,1 x 10<sup>8</sup></b>	2,2 x 10 <sup>3</sup>	1,4 x 10 <sup>5</sup>

5

**Tabla 1c:** Experimento # 2 - bacteriófago frente a cepas bacterianas "de recuento"

Título (ufp/ml) (los títulos presentados son las medias de lecturas por duplicado)						
Cepa de <i>P. aeruginosa</i>	Recuento 06	Recuento 02	Recuento 03	Recuento 01	Recuento 04	Recuento 05
Bacteriófago						
BC-BP-06	<b>4,8 x 10<sup>9</sup></b>	-	-	-	-	-
BC-BP-04	-	-	Inhibición apenas discernible, sin placas	-	<b>1,22 x 10<sup>8</sup></b>	-
BC-BP-02	-	<b>7,5 x 10<sup>8</sup></b>	Inhibición apenas discernible, sin placas	-	-	-
BC-BP-05	-	-	-	-	-	<b>1,5 x 10<sup>9</sup></b>
BC-BP-01	-	-	3,5 x 10 <sup>2</sup>	<b>8,1 x 10<sup>7</sup></b> (poco replicados)	-	Se observan "turbulencias" a las diluciones de 10 <sup>-1</sup> y 10 <sup>-2</sup>
BC-BP-03	-	-	<b>2,65 x 10<sup>8</sup></b>	7 x 10 <sup>2</sup>	-	-

10

**Tabla 1d:** bacteriófago frente a cepas bacterianas "de recuento" con reactividad cruzada; diferencia en los títulos (experimento #1)

Título (ufp/ml) (los títulos presentados son las medias de lecturas por duplicado)			
Cepa de <i>P. aeruginosa</i>	Recuento 03	Recuento 01	Nivel de diferencia
Bacteriófago			
BC-BP-01	3,5 x 10 <sup>2</sup>	<b>8,1 x 10<sup>7</sup></b>	2,3 x 10 <sup>5</sup>
BC-BP-03	<b>2,65 x 10<sup>8</sup></b>	7 x 10 <sup>2</sup>	3,8 x 10 <sup>5</sup>

**Tabla 1e:** Experimento # 3 - bacteriófago frente a cepas bacterianas "de recuento"; individual y mixto

Título (ufp/ml) (los títulos presentados son las medias de lecturas por duplicado)						
Los resultados de los experimentos en los que los 6 bacteriófagos se mezclan antes del ensayo se muestran en <b>negrita</b>						
Cepa de <i>P. aeruginosa</i>	Recuento 06	Recuento 02	Recuento 03	Recuento 01	Recuento 04	Recuento 05
Bacteriófago						
BC-BP-06	<b>6,36 x 10<sup>9</sup></b> 5,8 x 10 <sup>9</sup>	-	-	-	-	-
BC-BP-04	-	-	Inhibición apenas discernible, sin placas	-	<b>4,62 x 10<sup>8</sup></b> 9,6 x 10 <sup>8</sup>	-
BC-BP-02	-	<b>1,17 x 10<sup>9</sup></b> 7,5 x 10 <sup>8</sup>	Inhibición apenas discernible, sin placas	-	-	-
BC-BP-05	-	-	-	-	-	<b>1,35 x 10<sup>9</sup></b>

						1,4 x 10 <sup>9</sup>
BC-BP-01	-	-	1 x 10 <sup>2</sup>	2,61 x 10 <sup>8</sup> 3,3 x 10 <sup>8</sup>	-	Se observan "turbulencias" a las diluciones de 10 <sup>-1</sup> y 10 <sup>-2</sup>
BC-BP-03	-	-	3,69 x 10 <sup>8</sup> 3,35 x 10 <sup>8</sup>	7,5 x 10 <sup>2</sup>	-	-

**Tabla 1f:** bacteriófago frente a cepas bacterianas "de recuento" con reactividad cruzada; diferencia en los títulos (experimento #3)

Título (ufp/ml) (los títulos presentados son las medias de lecturas por duplicado)			
Cepa de <i>P. aeruginosa</i>	Recuento 03	Recuento 01	Nivel de diferencia
Bacteriófago			
BC-BP-01	1 x 10 <sup>2</sup>	3,3 x 10 <sup>8</sup>	3,3 x 10 <sup>6</sup>
BC-BP-03	3,35 x 10 <sup>8</sup>	7,5 x 10 <sup>2</sup>	4,5 x 10 <sup>5</sup>

5

**Tabla 1g:** bacteriófago frente a cepas bacterianas "de recuento"; resultados promediados de los experimentos #1, #2 y #3

Título (ufp/ml) (los títulos presentados son las medias de lecturas por duplicado de los experimentos #1, #2 y #3)						
Cepa de <i>P. aeruginosa</i>	Recuento 06	Recuento 02	Recuento 03	Recuento 01	Recuento 04	Recuento 05
Bacteriófago						
BC-BP-06	5,2 x 10 <sup>9</sup>	-	-	-	-	-
BC-BP-04	-	-	Inhibición apenas discernible, sin placas	-	4,8 x 10 <sup>8</sup>	-
BC-BP-02	-	5,3 x 10 <sup>8</sup>	Inhibición apenas discernible, sin placas	-	-	-
BC-BP-05	-	-	-	-	-	1,8 x 10 <sup>9</sup>
BC-BP-01	-	-	3,5 x 10 <sup>2</sup>	2,3 x 10 <sup>8</sup>	-	Se observan "turbulencias" a las diluciones de 10 <sup>-1</sup> y 10 <sup>-2</sup>
BC-BP-03	-	-	3 x 10 <sup>8</sup>	1,2 x 10 <sup>3</sup>	-	-

10

**Tabla 1h:** bacteriófago frente a cepas bacterianas "de recuento" con reactividad cruzada; diferencia en los títulos. Medias de los experimentos #1, #2 y #3

Título (ufp/ml) (los títulos presentados son las medias de lecturas por duplicado de los experimentos #1, #2 y #3)			
Cepa de <i>P. aeruginosa</i>	Recuento 03	Recuento 01	Nivel de diferencia
Bacteriófago			
BC-BP-01	3,5 x 10 <sup>2</sup>	2,3 x 10 <sup>8</sup>	6,6 x 10 <sup>3</sup>
BC-BP-03	3,5 x 10 <sup>8</sup>	1,2 x 10 <sup>3</sup>	2,5 x 10 <sup>5</sup>

**d) Preparación de suspensiones purificadas de bacteriófagos:**

15

**[0086]** Los bacteriófagos se prepararon para su uso a partir de las suspensiones maestras como sigue:

20

(i) se suspendieron 30 ml de las cepas de crecimiento apropiadas de *Pseudomonas aeruginosa* en caldo de peptona vegetal inoculado con siembras maestras del bacteriófago apropiado a una multiplicidad de infección de 0,1.

25

(ii) la suspensión se incubó a 37 °C hasta que se completó la lisis de las bacterias (esto tarda normalmente entre 5 - 8 horas) y se evaluó visualmente. La evaluación visual está facilitada por la comparación de la turbidez de la suspensión bacteriana que contiene el bacteriófago con la de una suspensión de control. Las suspensiones de control no reciben bacteriófago, pero son similares a todos los demás respectos.

(iii) las siembras submaestras se filtraron a través de filtros de jeringa de 0,45 µm y después de 0,1 µm.



(iv) se extendieron 27 ml de las siembras submaestras cuidadosamente sobre 5 ml de una "almohadilla" de sacarosa al 10 % p/v en tubos de centrifuga de polipropileno de 36 ml. El propósito de la "almohadilla" de sacarosa es evitar la sedimentación de endotoxinas, permitiendo que las partículas de virus sedimenten en el fondo del tubo.

5

(v) todos los tubos de centrifuga y los cubos se lavaron concienzudamente y después se estabilizaron en un autoclave a 121 °C antes de su uso.

(vi) los tubos se rotaron a 23.500 rpm a 4 °C durante 3 horas en una ultracentrifuga Beckman

10

(vii) las fracciones sobrenadantes se eliminaron y los sedimentos se drenaron. Después los sedimentos se resuspendieron en 1 ml de PBS + glicerol al 10 % v/v y se filtraron a través de filtros de jeringa de 0,2 µm.

15

(vi) los títulos se evaluaron mediante el cultivo conjunto con una cepa bacteriana apropiada (véase a continuación)

**[0087]** Este material puede usarse *in vivo*, sujeto a controles de esterilidad:

**(e) Esterilidad**

20

**[0088]** Se comprobó la esterilidad el producto final como sigue:

(i) se eligieron aleatoriamente tres alícuotas de 0,6 ml del producto terapéutico final

25

(ii) cada alícuota se diseminó en una placa nutriente de agar (permissiva para el crecimiento de diversas especies bacterianas, incluyendo *Pseudomonas*) mediante el uso de un asa de alambre estéril

(iii) las placas se incubaron a 37 °C durante 48 horas

30

(iv) se comprobó la presencia de colonias bacterianas en las placas

*(Dichas pruebas sobre el material así preparado no mostraron crecimiento bacteriano)*

**(f) Evaluación de la eficacia:**

35

**[0089]** Para el producto de bacteriófago diseñado para combatir las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* que provocan la otitis externa canina, el desarrollo del producto implicó la selección de los bacteriófagos apropiados para que cumplieran este papel. Esto se consiguió mediante el cultivo conjunto de un abanico de 22 bacteriófagos con 100 cepas clínicas aisladas de *Pseudomonas aeruginosa* derivadas de infecciones de otitis externa canina, según se indica a continuación. Se averiguó que el 90 % de estas cepas era susceptible a al menos uno de los 6 bacteriófagos candidatos desde BC-BP-01 hasta BC-BP-06 (Figura 1) del grupo inicial de 22 cepas. Estos 6 bacteriófagos fueron desarrollados en ensayos clínicos sobre la base de que estos datos *in vitro* apoyaban la expectativa de que el producto fuera clínicamente eficaz *in vivo*.

40

45 Método

**[0090]**

50

(i) la preparación de bacteriófago se diluyó en PBS en una serie de diluciones de 10 veces a la temperatura ambiente.

(ii) se añadieron 100 µl de la(s) dilución(es) apropiada(s) a 2,5 ml de agar fundido a 46 °C que contenía  $5 \times 10^6$  ufc de las bacterias pertinentes.

55

(iii) las suspensiones de agar fundido se vertieron en placas nutrientes de agar y se dejaron equilibrar hasta la temperatura ambiente.

(iv) las placas se transfirieron a 37 °C y se incubaron durante 24 horas.

60

(v) se contaron las placas y se usaron las cifras para calcular el título en ufp/ml. Se aspira a contar la dilución que proporciona alrededor de 100 placas por placa.

**(g) Evaluación de la seguridad:**

65

**[0091]** Se lleva a cabo un ensayo clínico veterinario para evaluar la toxicidad del producto de bacteriófago. La duración total del estudio fue de 21 días. Seis perros (3 machos; 3 hembras) recibieron el siguiente régimen de tratamiento administrado por vía ótica en 3 ocasiones, en los días 0, 3 y 6 del estudio:

Grupo	Número de animales	Sexo		Tratamiento	Volumen de dosis en el oído izquierdo	Volumen de dosis en el oído derecho
1 (control)	2	1 Macho	1 Hembra	Diluyente	0,2 ml	0,2 ml
2 (ensayo)	4	2 Macho	2 Hembra	Bacteriófago	0,2 ml (10x la dosis terapéutica)	0,2 ml (100x la dosis terapéutica)

5

**[0092]** La administración del tratamiento se realiza mediante gotas de la suspensión líquida en el canal auditivo externo, que después se masajeó para promover una penetración profunda.

**[0093]** Durante el estudio se llevaron a cabo las siguientes investigaciones:

10

(i) se evaluó la flora microbiológica en los días 0, 3 y 6 (las muestras se tomaron inmediatamente antes de la administración del tratamiento) colocando en placas los hisopados auditivos en:

15

1) agar de cetrimida, selectivo para *Pseudomonas* spp

2) agar de sal de manitol, selectivo para *Staphylococcus* spp

3) agar de glucosa de Sabouraud, selectivo para levaduras y mohos

20

4) agar FP, selectivo para micrococcos

5) agar sangre, no selectivo, permite al crecimiento de la mayoría de los microorganismos

25

(ii) un examen auditivo veterinario hasta el día 8 del estudio, después cada tres días hasta la finalización del estudio

(iii) una medición diaria de la temperatura interna

**[0094]** A lo largo del estudio:

30

(i) el examen auditivo veterinario no reveló cambios significativos en el estado de los oídos de los perros en el grupo de ensayo, en comparación con los registros de la situación inicial y del grupo de control.

35

(ii) no se produjeron cambios significativos en la flora microbiológica de los oídos de los perros del grupo de ensayo, en comparación con los registros de la situación inicial y del grupo de control.

(iii) en el grupo de ensayo, los registros de la temperatura interna no diferían significativamente de los apreciados en el grupo de control ni en la situación inicial.

40

## **II. Evaluación de la eficacia clínica de los bacteriófagos elegidos**

### **(a) Protección de ratones frente a la infección letal por *Pseudomonas aeruginosa***

**[0095]**

45

1. Se inyectaron 150.000.000 unidades infecciosas (10 DL<sub>50</sub>) de *Pseudomonas aeruginosa* en la cavidad peritoneal de 20 ratones

2. Se trataron grupos de 5 ratones con 4 concentraciones diferentes del bacteriófago BC-BP-08, administradas simultáneamente con la inyección bacteriana.

50

**Tabla 2:** supervivencia de los ratones después de la inyección de 150.000.000 unidades infecciosas (10 DL<sub>50</sub>) de *Pseudomonas aeruginosa* en la cavidad peritoneal de 20 ratones

Bacteriófago (unidades infecciosas)	No sobreviven	Sobreviven
290.000.000	0	5
29.000.000	4	1
5.800.000	5	0
290.000	5	0

**5 (b) Prevención de la destrucción de piel porcina *in vitro* por *Pseudomonas aeruginosa***

**[0096]** Se crearon catorce modelos de heridas consistiendo cada uno en cuatro capas de piel porcina limpiada con enzimas, esterilizada y liofilizada empapada en plasma humano. Se colocaron 100.000 ufc de *P. aeruginosa* en la parte superior de cada una. Siete de los modelos de heridas recibieron 1.000.000 unidades infecciosas del fago BC-BP-08, sirviendo el resto como controles. Después de 18 horas de incubación, 7 de los 8 controles fueron evaluados con enmascaramiento como deteriorados, mientras que todos los demás modelos tratados con el fago fueron evaluados como no deteriorados. Las bacterias sólo pudieron ser detectadas en tres de los discos tratados (recuento medio 0; valor más alto 12.000). Se averiguó que los fagos habían penetrado a través de la capa inferior del modelo y se habían replicado en ella (recuento medio en los modelos después de la incubación: 32.000.000; intervalo 14.000.000 - 20.000.000.000).

**(c) Protección de injertos cutáneos en cobayas frente a la infección por *Pseudomonas aeruginosa*****[0097]**

1. Se extirpó un rectángulo (2 cm x 1 cm) de 0,2 mm de espesor de piel afeitada de los dorsos de 14 cobayas
2. Las capas de piel subyacente se eliminaron para crear unas heridas comparables a una quemadura extirpada
3. Se introdujeron 600.000 unidades infecciosas de *Pseudomonas aeruginosa* en las heridas
4. Se introdujeron 12.000.000 unidades infecciosas del bacteriófago BC-BP-08 en las heridas de 7 animales, no introduciéndose ningún bacteriófago en las heridas de los otros 7
5. El rectángulo de piel fue sustituido y vendado
6. Se evaluó el éxito del injerto después de 5 días

**Tabla 3:** protección de injertos cutáneos en cobayas frente la infección por *Pseudomonas aeruginosa*

	Injertos con éxito	Injertos sin éxito
Sin bacteriófago	0	7
Con bacteriófago	6	1

**(d) Multiplicación de los bacteriófagos de *Pseudomonas aeruginosa* administrados en el canal auditivo externo de un perro con otitis externa**

**[0098]** El perro, con antecedentes de atopia, tenía una otitis externa crónica bilateral. Los hisopados de ambos oídos dieron repetidamente crecimiento de *P. aeruginosa* durante muchos meses, a pesar de la terapia antibiótica. Antes de la terapia con fagos, el perro tenía los canales aditivos externos eritematosos e hinchados bilateralmente, cada uno con un exudado purulento y copiosas secreciones cerosas en el pabellón auricular circundante. Los hisopados tomados de cada oído en ese momento crecieron como *P. aeruginosa* (identificada por API 20NE, Biomerieux, Francia). Las cepas aisladas de los dos oídos habían diferido ligeramente en sus reacciones bioquímicas y en sus patrones de sensibilidad antibiótica. A partir de una colección de fagos, se eligieron ocho para ensayarlos frente a las cepas, ya que habían sido previamente identificados por mostrar una buena actividad lítica frente a una amplia variedad de cepas de *P. aeruginosa*. Tres de los fagos mostraron una buena actividad lítica frente a ambas cepas aisladas obtenidas del perro. Los fagos fueron adicionalmente ensayados para comprobar cómo unas pocas unidades formadoras de placas lisarían un cultivo en caldo estándar de las dos cepas aisladas. BC-BP-04, para el trabajo *in vivo* se eligió el fago para el cual el número de ufp requeridas para la lisis era el más bajo. La concentración de fago en la disolución madre había sido titulada, aplicándose 0,2 ml de una dilución de 10<sup>5</sup> de esta disolución mediante una jeringa en el meato auditivo externo derecho del perro. Este volumen contenía aproximadamente 400 unidades infecciosas (unidades formadoras de placa, ufp).

**[0099]** Veintisiete horas después de la aplicación del fago se tomó un hisopado de los detritos del oído derecho. Se pesó antes y después del hisopado y se determinó la masa de detritos. Se contaron los fagos de los detritos colocando en placas diluciones sucesivas de 10 veces mediante el uso de la técnica de superposición en agar. Había  $1,6 \times 10^8$  fagos en los 0,032 g de detritos que había presentes en el hisopo, por lo que es probable que el fago se multiplicara más 1 millón de veces. Este aumento estuvo acompañado por una notable mejoría clínica del oído derecho. Había menos inflamación; desapareció el exudado purulento; y se redujo la cantidad de secreciones cerosas (Figura 3a). El aspecto del oído izquierdo, que no había recibido el fago, permaneció invariable (Figura 3b). En vista del cambio, se aplicaron 400 ufp del fago en el oído izquierdo, lo que fue seguido de una considerable mejoría clínica 24 - 48 horas después. Dos semanas después de la aplicación del fago, los oídos del perro se habían deteriorado; y ambos hisopados eran positivos para *P. aeruginosa* en cultivo. Posteriormente el estado de los oídos se deterioró y mejoró repetidamente durante muchos meses, pero el propietario y el veterinario creyeron que su estado era mejor que el que tenía antes de que se administrara el fago. Nueve meses después de la administración del fago ambos oídos se habían recuperado completamente, y desde entonces no se han aislado cepas de *P. aeruginosa* de los hisopados aditivos. No se administraron antibióticos al perro después de la administración de los fagos ya que no fueron considerados necesarios.

### **(e) Uso de un bacteriófago de *Pseudomonas aeruginosa* en el tratamiento de la infección de una quemadura humana**

**[0100]** Se realizó un ensayo de caso único con un hombre de 27 años con un 50 % de quemaduras. Los episodios de curación de las quemaduras se alternaban con periodos de degradación de la piel. Se apreció que la piel de la espalda y el pecho se había degradado. En este momento los médicos, que estaban preocupados por la rápida velocidad de degradación de la piel, preguntaron si podría encontrarse un fago para tratar su infección por *P. aeruginosa*. Se aisló un nuevo fago, BC-BP-07, que era activo. Aunque los ensayos *in vitro* no indicaron una gran actividad frente a la cepa, el tiempo estaba limitado por lo que se eligió para un trabajo adicional. Se elaboró una suspensión purificada y no aparecieron signos de toxicidad cuando se añadió a los cultivos de células epidérmicas humanas. Se aplicaron aproximadamente 1.000 unidades infecciosas (ufp) de BC-BP-07 a cada uno de dos discos de papel de filtro con un diámetro de 25 mm. En un cambio de apósito se colocaron estos discos en las áreas del paciente que se sabían colonizadas por *P. aeruginosa*. 48 horas después los recuentos del fago en los discos eran de  $1,2 \times 10^6$  y de  $4,3 \times 10^4$ , unos aumentos de 1.200x y de 43x. Después de esto se pulverizaron las quemaduras del paciente con el fago. Después de esto el estado del paciente mejoró gradualmente y sobrevivió, y finalmente todas las heridas se curaron. No se sabe si el fago contribuyó a la recuperación del paciente, a quien también se le administraron antibióticos, pero el fago se multiplicó en las quemaduras y demostró la multiplicación del bacteriófago en o sobre un paciente, indicando así la destrucción de las bacterias por parte del bacteriófago.

**[0101]** Antes de su depósito en el NCIMB el 24 de junio de 2003, ninguno de los bacteriófagos mencionados en este documento como BC-BP-01 hasta BC-BP-08 estaban disponibles públicamente, dado que cualquier referencia a dichas cepas en cualquier publicación u otra divulgación anterior a esa fecha no representa la autorización de la técnica anterior.

**[0102]** En la ejemplificación adicional proporcionada a continuación se hizo uso de una combinación de los seis bacteriófagos NCIMB 41174, NCIMB 41175, NCIMB 41176, NCIMB 41177, NCIMB 41178 y NCIMB 41179 (la composición BioVet-PA) que se había averiguado que era activa frente al 90 % de las cepas aisladas de *Pseudomonas aeruginosa* ensayadas en otitis caninas (otitis externa y otras otitis). 0,2 ml de BioVet-PA contenían  $1 \times 10^5$  unidades infecciosas de cada uno de los seis bacteriófagos medido frente a las cepas de recuento apropiadas, como se ha descrito anteriormente.

**[0103]** Se diluyeron las seis suspensiones individuales de bacteriófago purificado en glicerol / PBS al 10 % v/v hasta una concentración de aproximadamente  $3 \times 10^6$  ufp/ml. Esta etapa de dilución se basaba en los títulos calculados a partir de las muestras de las suspensiones de bacteriófago que habían sido congeladas a  $-80$  °C, después descongeladas y ensayadas. Después de la dilución, los seis bacteriófagos terapéuticos se mezclaron entre sí en proporciones iguales, diluyendo así cada bacteriófago en un factor de seis y llevando la concentración de los constituyentes individuales hasta  $5 \times 10^5$  ufp/ml. Esto es equivalente a  $1 \times 10^5$  ufp de cada bacteriófago terapéutico en 0,2 ml diluyente. En este punto, el producto mixto final se alícuotó en alícuotas de 0,6 ml y se almacenó a  $-80$  °C.

### **III. Ensayo de una composición de fagos combinados frente a la otitis canina**

**[0104]** Como se ha indicado anteriormente, las otitis caninas causadas por *Pseudomonas aeruginosa* (otitis externa y otitis media) son ejemplos de enfermedad clínica asociada con una colonización basada en biopelícula de una superficie corporal. Los signos clínicos de dicha infección incluyen dolor, irritación (eritema), aparición de úlceras y la secreción de grandes cantidades de material por el oído. Este es a menudo de naturaleza purulenta y está acompañado por un olor característico. La preparación combinada de BioVet-PA de seis bacteriófagos indicada anteriormente fue autorizada para su ensayo en perros con dicha infección por el Veterinary Medicines Directorate del Reino Unido bajo el Certificado de Ensayos en Animales 20505/0001 concedido a Biocontrol Limited el 17 de

noviembre de 2003.

**Realización del ensayo**

5 **[0105]** BioVet-PA se almacenó a -80 °C. Inmediatamente antes de su administración, el producto se descongeló y se calentó en la mano. Se administraron 0,2 ml (que contenían  $1 \times 10^5$  unidades infecciosas de cada uno de los 6 bacteriófagos) gota a gota mediante el uso de una jeringa estéril de 1 ml de capacidad en el oído. Se evaluó el estado y la microbiología del oído a los 2 días después de la administración.

10 **[0106]** El procedimiento fue como sigue:

Caracterización (entre 2 y 14 días antes del tratamiento):

15 **Día 0** Se realizaron hisopados tomados de cada oído por un cirujano veterinario. Se llevaron a cabo pruebas de laboratorio mediante el uso de estos hisopados para confirmar la presencia de *P. aeruginosa*. Si no se detectaba *P. aeruginosa*, el perro era excluido del ensayo

20 **Día 1** Si se detectaba *P. aeruginosa*, se ensayaban las cepas aisladas para comprobar su sensibilidad a BioVet-PA. Si la(s) cepa(s) de *P. aeruginosa* con las que estaba infectado el perro no eran sensibles a BioVet-PA, el perro era excluido del ensayo.

Tratamiento:

25 **Día 0** Los oídos se examinaron con un otoscopio para evaluar su estado. Se tomaron hisopados de cada oído para un análisis microbiológico. Se midió la temperatura interna del perro. Al perro se le administró una dosis de 0,2 ml de BioVet-PA en el oído (los tratamientos se administraron gota a gota mediante el uso de una jeringa estéril de 1 ml de capacidad, y después se masajearon los canales aditivos para promover una penetración profunda).

30 **Día 1** Se examinaron los oídos para evaluar su estado. Se tomaron hisopados de cada oído para su análisis microbiológico. Se midió la temperatura interna del perro.

35 **Día 2** Se examinaron los oídos para evaluar su estado. Se tomaron hisopados de cada oído para su análisis microbiológico. Se midió la temperatura interna del perro.

**Resultados:**

40 **[0107]** Los estudios con seis perros con otitis grave por *Pseudomonas aeruginosa* resistente a antibióticos tratada con BioVet-PA mostraron una mejoría en los síntomas clínicos a los dos días de tratamiento (Figura 4) y reducciones en las cifras bacterianas en la misma escala temporal (Figura 5). También se observó la replicación del bacteriófago en todos los perros (Figura 6). El análisis de la mejora en los síntomas clínicos demostró que esto era  
45 significativo a un nivel de confianza del 95 % tanto por la prueba del t como por la prueba de muestras apareadas de Wilcoxon.

**IV. Ensayo de una composición de fagos combinados con antibióticos frente a la otitis canina**

50 **[0108]** Se usó la composición BioVet-PA más antibióticos frente a la otitis por *Pseudomonas aeruginosa* en perros que había resultado ser resistente al tratamiento sólo con antibióticos.

**Caso 1**

55 **[0109]** El Perro M tenía un historial de otitis bilateral, que no se había conseguido resolver en el oído derecho a pesar de unos tratamientos repetidos con antibióticos, incluyendo marbofloxacino y gentamicina, que se usan para el tratamiento de las otitis por *Pseudomonas*. Al comienzo del ensayo con el fago (26/01/04), el oído derecho estaba infectado tanto con *Pseudomonas aeruginosa* como con un grupo de *Streptococcus* G beta-hemolíticos. El examen mostró eritema, formación de úlceras y exudado purulento acompañado por olor. Después del examen, el perro M se  
60 trató con BioVet-PA (100.000 unidades infecciosas de cada uno de los seis bacteriófagos en 0,2 ml de diluyente).

**[0110]** El análisis posterior al tratamiento mostró que cinco de los seis bacteriófagos se estaban replicando. Esto estaba acompañado por una caída en el número de bacterias de *Pseudomonas* presentes en el oído y por una mejora en los síntomas clínicos. Ocho días después de completar un periodo de monitorización de dos días después  
65 del tratamiento con el bacteriófago, el perro M se trató con Synulox (amoxicilina y clavulanato) para la infección acompañante por *Streptococcus*. Esta terapia también tiene una cierta actividad sobre las cepas de *Pseudomonas*.

Resultado

5 [0111] El análisis del hisopado tomado el 08/03/04 no mostró *Pseudomonas* detectables, acompañado por unos bajos niveles de *Streptococcus*. Esto demostraba la eficacia de los bacteriófagos en la resolución de la infección bacteriana en un sistema caracterizado por la formación de una biopelícula cuando los antibióticos y otros agentes químicos habían fracasado previamente en la eliminación de la infección, junto con unos resultados mejorados cuando se administraban antibióticos después de dicho tratamiento.

10 Caso 2

[0112] El Perro R tenía un historial de otitis bilateral, que no se había conseguido resolver a pesar del tratamiento con gentamicina, marbofloxacino (usado para el tratamiento de otitis por *Pseudomonas*), ampicilina (usado para otras infecciones bacterianas) y rimadyl (un antiinflamatorio). El perro R fue examinado el 16/02/04. En  
15 ese momento, ambos oídos estaban infectados tanto por *Pseudomonas aeruginosa* como por bacterias coliformes. Ambos oídos producían exudados purulentos acompañados de un olor intenso. También había un notable eritema y úlceras. Después del examen, el perro R se trató con BioVet-PA (100.000 unidades infecciosas de cada uno de los seis bacteriófagos en 0,2 ml de diluyente). El análisis después del tratamiento mostró que dos de los seis bacteriófagos se estaban replicando. Esto estaba acompañado por una caída en el número de bacterias de  
20 *Pseudomonas* presentes en el oído y por una mejoría en los síntomas clínicos. Después de un periodo de monitorización de cuatro días después del tratamiento con el bacteriófago, el perro R se trató con comprimidos de amoxicilina y clavulanato (por las bacterias coliformes presentes en el oído) y gotas óticas de Canaural (que contienen fusidato de dietanolamina, sulfato de framicitina, nistatina y prednisolona). Se sabía que la *Pseudomonas aeruginosa* presente en los oídos era parcialmente resistente a los antibióticos aminoglucósidos tales como la  
25 framicitina. Los demás componentes de la formulación Canaural no se usan frente a *Pseudomonas* (el fusidato de dietanolamina es un antibiótico usado frente a otras infecciones bacterianas que incluyen bacterias coliformes, la nistatina es un agente antifúngico; la prednisolona es un antiinflamatorio). La sensibilidad a los antibióticos de la infección coliforme era desconocida, pero un tratamiento con ampicilina completado el 30/01/04 no había conseguido resolver la infección.

30

Resultado

[0113] El examen del perro R el 01/03/04 mostró que los síntomas clínicos se habían resuelto completamente en ambos oídos. El eritema y las úlceras estaban ausentes, los exudados eran normales y no se detectaba olor.  
35 Esto demostraba la eficacia del tratamiento antibiótico realizado tras la aplicación de los bacteriófagos en la resolución de los síntomas clínicos de la infección, cuando los antibióticos y otros agentes químicos no habían conseguido eliminar la infección.

## REIVINDICACIONES

1. Una preparación de bacteriófago que comprende uno o más bacteriófagos para su uso en un método terapéutico o profiláctico de tratamiento de una infección bacteriana, en el que:
- 5
- (i) la infección bacteriana comprende o consiste en *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) y está **caracterizada por** la formación de una biopelícula;
  - (ii) dicho uno o más bacteriófagos se dirigen a la *P. aeruginosa* de dicha infección; y
  - (iii) en dicho método, este debe comprender
- 10
- (a) la administración de dicho uno o más bacteriófagos;
  - (b) permitir que se establezca la replicación de dicho uno o más bacteriófagos; y después
  - (c) la administración de uno o más antibióticos una vez que la replicación de dicho bacteriófago se ha establecido.
- 15
2. Una preparación de para bacteriófago su uso de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende más de un bacteriófago que se dirige a *P. aeruginosa*.
3. Una preparación de bacteriófago para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, que comprende una pluralidad de bacteriófagos que se dirigen a *P. aeruginosa*, en la que cada miembro de dicha pluralidad es específico para una cepa diferente de *P. aeruginosa*.
- 20
4. Una preparación de bacteriófago para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 3, en la que la infección se elige de entre: una infección de una quemadura cutánea o de otra herida cutánea, una infección pulmonar, una infección ocular, una otitis o una infección del tracto urinario.
- 25
5. Una preparación de bacteriófago para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, en la que la infección es una otitis canina.
- 30
6. Una preparación de bacteriófago para su uso de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 - 3, en la que el método de tratamiento es profiláctico.
7. Una preparación de bacteriófago para el uso de acuerdo con la reivindicación 6, en la que la infección que se va a prevenir es una infección asociada a un implante médico.
- 35
8. Un método no terapéutico para la eliminación, la reducción o la prevención de la contaminación bacteriana mediante la aplicación en el sitio o en el posible sitio de dicha contaminación de uno o más bacteriófagos, en el que:
- 40
- (i) la contaminación bacteriana comprende o consiste en *P. aeruginosa* y está **caracterizada por** la formación de una biopelícula;
  - (ii) dicho uno o más bacteriófagos se dirigen a la *P. aeruginosa* de dicha contaminación; y
  - (iii) dicho método comprende:
- 45
- (a) la aplicación de dicho uno o más bacteriófagos;
  - (b) permitir que se establezca la replicación de dicho uno o más bacteriófagos; y después
  - (c) la aplicación en dicho sitio de uno o más antibióticos o antisépticos una vez que la replicación de dicho bacteriófago se ha establecido.
- 50
9. Un método no terapéutico de acuerdo con la reivindicación 8, en el que el sitio es la superficie de un dispositivo médico que va a ser implantado.
10. Un método no terapéutico de acuerdo con la reivindicación 8, en el que el sitio es la superficie de una lente de contacto.
- 55
11. Una preparación de bacteriófago para su uso de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 - 7, o un método no terapéutico de acuerdo con una de las reivindicaciones 8 - 10, en los que el uno o más bacteriófagos se eligen de entre el grupo que consiste en:
- 60
- (i) NCIMB 41174, NCIMB 41175, NCIMB 41176, NCIMB 41177, NCIMB 41178, NCIMB 41179, NCIMB 41180 y NCIMB 41181 (depositados en la National Collection of Industrial and Marine Bacteria, Aberdeen, Reino Unido); y
  - (ii) mutantes de los mismos que conservan la capacidad de dirigirse a *P. aeruginosa*, preferiblemente en los que dicho mutante tiene una identidad en la secuencia de nucleótidos de al menos el 90 %, de al menos el 95
- 65
- %, de al menos el 97 %, de al menos el 98 % o de al menos el 99 % a lo largo de la totalidad de su genoma en comparación con el genoma de la pertinente cepa depositada.

12. Una preparación de bacteriófago para su uso de acuerdo con la reivindicación 11 o el método no terapéutico de acuerdo con la reivindicación 11, en los que el uno o más bacteriófagos que se dirigen a *P. aeruginosa* se proporcionan en un grupo de bacteriófagos, y en los que cada miembro del grupo tiene una especificidad de cepa diferente para *P. aeruginosa*.

13. Una preparación de bacteriófago para su uso de acuerdo con la reivindicación 11 o el método no terapéutico de acuerdo con la reivindicación 11, en los que el uno o más bacteriófagos que se dirigen a *P. aeruginosa* se proporcionan en un grupo de bacteriófagos que consiste en:

10

(i) NCIMB 41174, NCIMB41175, NCIMB41176, NCIMB41177, NCIMB41178, NCIMB41179, NCIMB41180 y NCIMB41181; o

(ii) mutantes de los mismos que conservan la capacidad de dirigirse a *P. aeruginosa*, preferiblemente en los que dicho mutante tiene una identidad en la secuencia de nucleótidos de al menos 90 %, de al menos el 95 %  
15 %, de al menos el 97 %, de al menos el 98 % o de al menos 99 % a lo largo de la totalidad de su genoma en comparación con el genoma de la pertinente cepa depositada.

14. Una preparación de bacteriófago para su uso de acuerdo con la reivindicación 11 o el método no terapéutico de acuerdo con la reivindicación 11, en los que el uno o más bacteriófagos que se dirigen a *P. aeruginosa* se proporcionan en:

20

(i) un grupo de bacteriófagos que consiste en NCIMB 41174, NCIMB 41175, NCIMB 41176, NCIMB 41177, NCIMB 41178 y NCIMB 41179; o

(ii) un grupo que difiere del grupo de (i) por la sustitución de cualquiera de dichos bacteriófagos por un mutante del mismo que muestra la especificidad de cepa objetivo deseada hacia *P. aeruginosa*, y preferiblemente en el que dicho mutante tiene una identidad en la secuencia de nucleótidos de al menos el 90 %, de al menos el 95 %, de al menos el 97 %, de al menos el 98 % o de al menos el 99 % a lo largo de la totalidad de su genoma en comparación con el genoma de la pertinente cepa depositada.

30



Fig.1a.

Cepa	BC-BP-01	BC-BP-04	BC-BP-02	BC-BP-05	BC-BP-06	BC-BP-03	BC-BP-08	BC-BP-07
920361								
923883								
925255	X		X					
924212								
925250								
925327								
922481								
922895	X	X					X	
920482								
921101				X				
925494							X	
920097	X		X					
919686								
920710								
925880								
27191				X				
27731								
27036								
27115			X					
27209								
26056								
W00340								
925576								
926032								
W00133								

Fig.1b.

Cepa	BC-BP-01	BC-BP-04	BC-BP-02	BC-BP-05	BC-BP-06	BC-BP-03	BC-BP-08	BC-BP-07
925984						X		
925617	X	X						
W00331								
W00341								
924903				X				
925480								
925738								
924226								
W00339						X	X	
925295	X							
W00334								
921513								
W00132								
C33199								
C32417								
C33139								
C33051								
C33391								
918672								
918625								
918682								
918040								
918884		X					X	
918701								
28471								

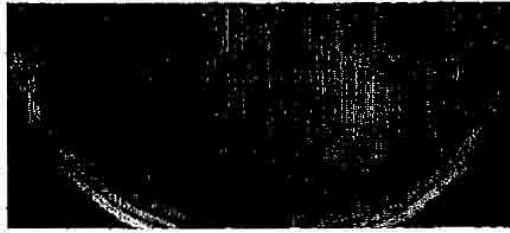
Fig. 1c.

Cepa	BC-BP-01	BC-BP-04	BC-BP-02	BC-BP-05	BC-BP-06	BC-BP-03	BC-BP-08	BC-BP-07
25872								
25484								
25749								
24810								
24536								
24533								
24537		X						
26458								
25029								
C28305								
C30125						X		
C28353								
C28176								
C28410								
27500								
C30605		X					X	
C28541								
C31217								
C29602								
26051								
27225								
58815								
27739								
C29232								
923741								X

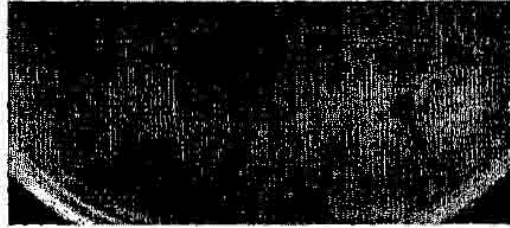
Fig. 1d.

Cepa	BC-BP-01	BC-BP-04	BC-BP-02	BC-BP-05	BC-BP-06	BC-BP-03	BC-BP-08	BC-BP-07
919935								
920608								
922205								
923471								
920191	X		X					
923456								
923821			X	X				
921365		X	X	X				
924577								
922816		X	X					
923007								
920880								
W00335								
W00074								
W00333								
W00344								
W00350								
W00343								
Vellab 7		X						
Vellab 11						X		
Vellab 9			X					
C32176					X			
C31676		X						
C33138								
Vellab 2					X			

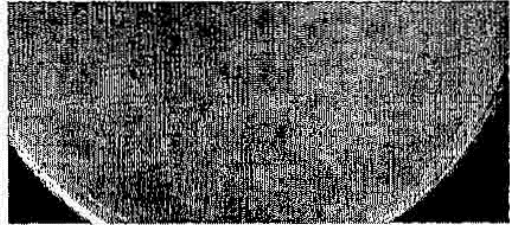
**A**



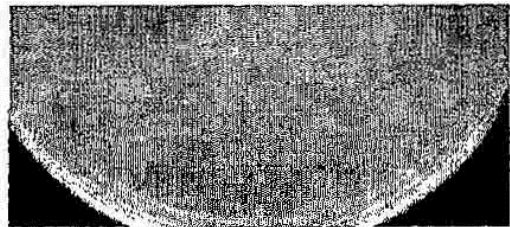
**B**



**C**



**D**

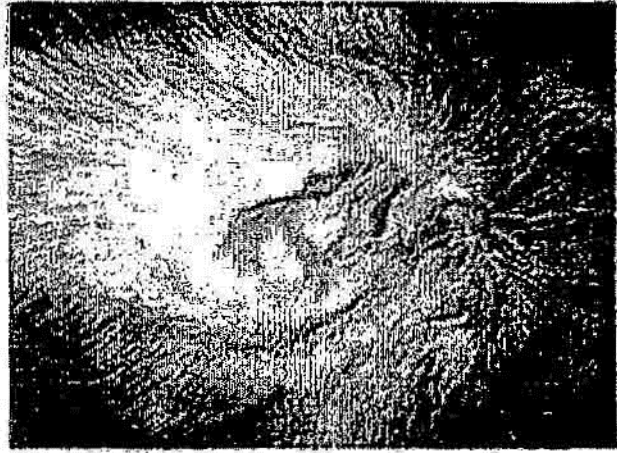


**E**



**Fig. 2.**

**A**



**B**



**Fig. 3.**

Fig.4.

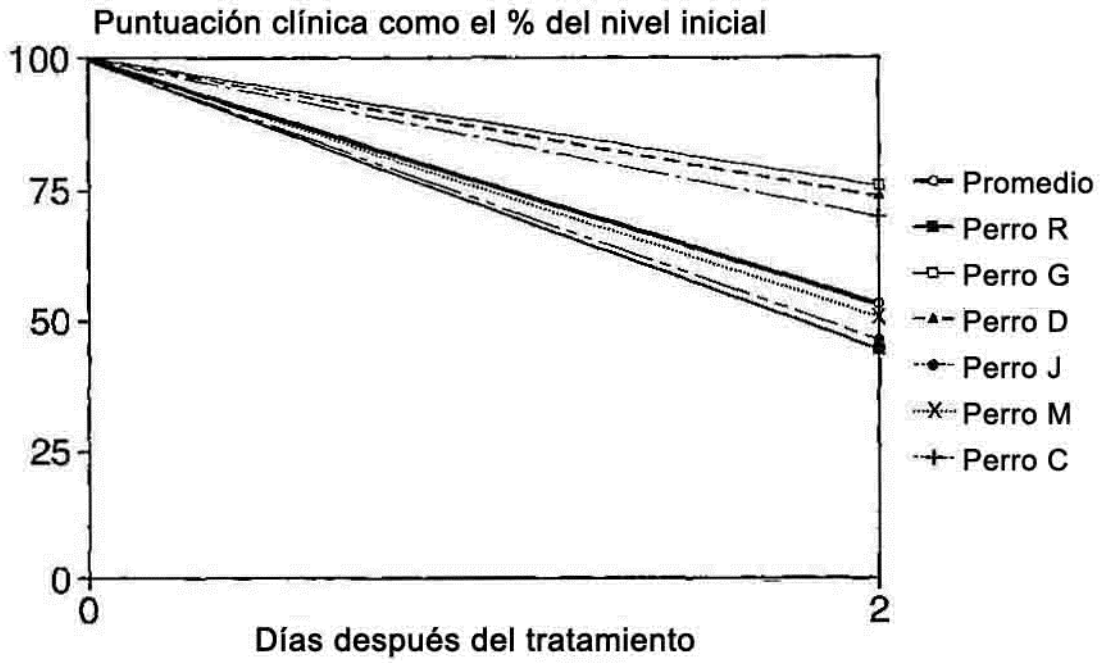


Fig.5.

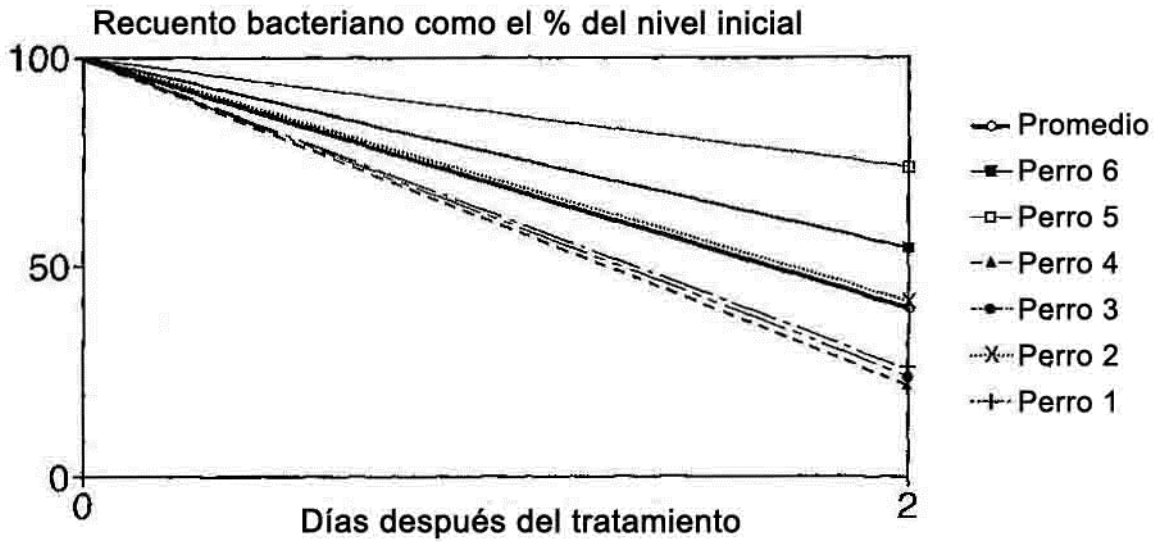


Fig.6.

