

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 548 584**

51 Int. Cl.:

C12N 7/00 (2006.01)

A61K 35/76 (2015.01)

C12N 15/63 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.03.2009 E 09719220 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.07.2015 EP 2268799**

54 Título: **Un procedimiento para la destrucción de bacterias**

30 Prioridad:

10.03.2008 US 35304

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

19.10.2015

73 Titular/es:

**GANGAGEN, INC. (100.0%)
3279 Emerson Street
Palo Alto, CA 94306, US**

72 Inventor/es:

**APPAIAH, C.B.;
MANUR, JAYASHEELA y
SRIRAM, BHARATHI**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 548 584 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

Un procedimiento para la destrucción de bacterias.

5 CAMPO DE LA INVENCION

[0001] La presente invención se refiere a procedimientos para el tratamiento de colonias bacterianas.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10

[0002] Las bacterias son ubicuas y se encuentran en entornos previamente considerados como inhabitables. Son comunes y diversas, desde el punto de vista ecológico, y encuentran nichos inusuales y comunes para su supervivencia. Están presentes en todo el entorno, en el suelo, el polvo, el agua y prácticamente en todas las superficies naturales. Muchas son cepas bacterianas normales y beneficiosas que proporcionan una relación sinérgica con sus huéspedes. Otras no son tan beneficiosas o causan problemas además de beneficios en condiciones específicas.

15

[0003] Las bacterias patógenas pueden causar enfermedades infecciosas o síntomas importantes en los humanos, en otros animales y también en las plantas. Algunas bacterias pueden afectar solo a huéspedes concretos; otras causan problemas en diversos huéspedes, dependiendo de la especificidad de huésped de las bacterias. Otras pueden ser inocuas o latentes en determinadas circunstancias y pueden volverse problemáticas en otros contextos o situaciones. Las enfermedades causadas por bacterias, bien en solitario o en combinaciones, son prácticamente tan diversas como las bacterias mismas e incluyen la intoxicación alimentaria, la caries dental, el ántrax, las enfermedades infecciosas generales e incluso ciertas formas de cáncer. Estos aspectos clínicos son típicamente objeto del campo de la microbiología clínica.

20

[0004] Las bacterias son dianas naturales de ciertos virus, por ejemplo, bacteriófagos o fagos. Los fagos han evolucionado en sus huéspedes naturales y tienen tasas de replicación y evolución muy rápidas. Los fagos pueden sacar el máximo rendimiento de la mínima vulnerabilidad presentada por la fisiología o la biología de sus huéspedes. Como tal, un aprovechamiento apropiado de la estructura, fisiología y principios de los fagos deberá ser útil para minimizar o controlar los problemas de causa bacteriológica.

30

[0005] Ciertas bacterias son normalmente inocuas, pero se vuelven patógenas cuando se presenta la oportunidad apropiada o se vuelven problemáticas si se introducen en un sitio o situación anormal. Además, ciertas combinaciones bacterianas evolucionan conjuntamente y pueden funcionar sinérgicamente para complementar funciones ausentes en miembros individuales de la colonia. Sin embargo, existen muchos y variados mecanismos, por ejemplo, en un organismo multicelular, para el manejo de diversos grados de exposición bacteriológica y a menudo no es necesaria la completa erradicación de los cultivos bacterianos. En muchos casos, una erradicación incompleta de la población bacteriana disminuirá los efectos de la infección para permitir al sistema resolver los problemas por mecanismos alternativos, por ejemplo, el sistema inmunitario.

40

[0006] Desde el punto de vista estadístico, las enfermedades infecciosas son un problema médico grave. Véase, por ejemplo, Watstein y Jovanovic (2003) Statistical Handbook on Infectious Diseases, Greenwood, ISBN: 1573563757. En los EE. UU., se producen aproximadamente 40.000-70.000 muertes cada año como resultado de infecciones nosocomiales (hospitalarias) del torrente sanguíneo.

45

[0007] Los antibióticos, en particular, han revolucionado la medicina clínica durante el último medio siglo. Desde el descubrimiento original de los fenómenos de antibiosis, el mecanismo de acción y el desarrollo de esta clase de notables entidades terapéuticas ha experimentado enormes progresos. Véanse, por ejemplo, Therrien y Levesque (2000) FEMS Microbiol. Rev. 24: 251-62; Durgess (1999) Chest 115 (suplemento 3): 19S-23S; Medeiros (1997) Clin. Infect. Dis. 24 (suplemento 1): S19-45; Jones (1996) Am. J. Med. 100 (6A): 3S-12S; Ford y Hait (1993) Cytotechnology 12: 171-212; y Liu (1992) Compr. Ther. 18: 35-42. Las ventas mundiales de antibióticos en 2002 fueron de aproximadamente 32.000 millones de dólares.

50

[0008] La aparición generalizada de bacterias resistentes a antibióticos ha resaltado la vulnerabilidad de los tratamientos antimicrobianos actuales a la adaptación bacteriana. Véanse, por ejemplo, Wise (2007) "An overview of the Specialist Advisory Committee on Antimicrobial Resistance (SACAR)", J. Antimicrob. Chemother. 60, suplemento 1: i5-7. PMID: 17656382; Finch (2007) "Innovation - drugs and diagnostics", J. Antimicrob. Chemother. 60, suplemento 1: i79-82, PMID: 17656390; Walsh (1992) Antibiotics: Actions, Origins, Resistance, Amer. Soc.

55

Microbiol., ISBN: 1555812546; Cunha (1992) Antibiotic Essentials, Physicians Press, ISBN: 1890114413; Amyes (2003) Magic Bullets, Lost Horizons: The Rise and Fall of Antibiotics, Taylor y Francis, ISBN: 0415272033; Axelsen (2001) Essentials of Antimicrobial Pharmacology: A Guide to Fundamentals for Practice, Humana Press, ISBN: 0896038424; y Mainous y Pomeroy (eds., 2001) Management of Antimicrobials in Infectious Diseases: Impact of Antibiotic Resistance, Humana Press, ISBN: 0896038211.

- [0009]** Además, los mecanismos de resistencia a antibióticos se desarrollan en condiciones mínimamente selectivas (por ejemplo, a baja concentración de antibiótico) y, a menudo, estos mecanismos se transfieren entre huéspedes. Así, los mecanismos evolucionan en diferentes organismos y se introducen frecuentemente en nuevos huéspedes, donde estos mismos mecanismos se refinan y optimizan adicionalmente. Con frecuencia, se generan combinaciones de mecanismos, ligados genéticamente entre sí, que se transfieren conjuntamente entre los huéspedes bacterianos. Estas combinaciones resultan a menudo en un agrupamiento genético de segmentos de ADN que codifican marcadores de resistencia a múltiples fármacos ligados.
- 15 **[0010]** Por lo tanto, procedimientos mejorados para disminuir la prevalencia de los plásmidos codificantes de resistencias, el crecimiento o la supervivencia, o para limitar la virulencia o la patogenicidad bacterianas serán de gran utilidad. Esta utilidad puede ser aplicable a la colonización ambiental, local, tópica o, en particular, *in vivo*. La presente invención aborda estos y otros problemas de importancia.
- 20 Xu y col. (2003) Structure 11: 309-322, describen que la proteína de unión P2 del fago tectivirus PRD1 es responsable del reconocimiento de PRD1 por el huésped. Este documento sugiere también que los bacteriófagos como tectivirus PRD1 pueden usarse para combatir infecciones bacterianas.

BREVE RESUMEN DE LA INVENCIÓN

- 25 **[0011]** La invención proporciona un procedimiento *ex vivo* para producir la muerte de las células bacterianas que comprende:
- 30 (a) la exposición de una célula bacteriana donante en un cultivo bacteriano heterogéneo a condiciones en las que un elemento genético movilizable que codifica un componente receptor para un fago puede transferirse de dicha célula donante a una célula receptora que no es sensible a la unión del fago, con lo que dicho elemento movilizable se transfiere a la célula receptora y le confiere a dicha célula receptora sensibilidad a la unión del fago; y
- 35 (b) la administración del fago para infectar las células que expresan el receptor, donde dicha infección resulta en la muerte de las células sensibles.

La invención también proporciona un fago para uso en un procedimiento terapéutico para producir la muerte de las células bacterianas que comprende:

- 40 (a) la exposición de una célula bacteriana donante en un cultivo bacteriano heterogéneo a condiciones en las que un elemento genético movilizable que codifica un componente receptor para el fago puede transferirse de dicha célula donante a una célula receptora que no es sensible a la unión del fago, con lo que dicho elemento movilizable se transfiere a la célula receptora y le confiere a dicha célula receptora sensibilidad a la unión del fago; y
- 45 (b) la administración del fago para infectar las células que expresan el receptor, donde dicha infección resulta en la muerte de las células sensibles.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

50 I. Introducción

- [0012]** La presente invención se basa, en parte, en el entendimiento de que existen diversos fagos de amplio espectro de huéspedes que pueden infectar muchos huéspedes diferentes. Véase, por ejemplo, Grahn y col. (2006) "PRD1: Dissecting the Genome Structure and Entry", en Calendar (ed.), The Bacteriophages (2.^a edición), Oxford Univ. Press, ISBN-13: 9780195148503. PRD1 es un miembro ejemplar del género Tectiviridae, que está estructural y funcionalmente definido. Sin embargo, el esquema de clasificación está evolucionando y se reconoce que el fago presenta similitud con funciones de adenovirus de animales superiores. Esto indica que tienen en común ciertas características estructurales fundamentales, que estos fagos utilizan para conseguir el objetivo común de infectar y replicarse en una amplia diversidad de especies bacterianas huéspedes. En particular, este amplio espectro de

huéspedes está por encima de la distinción entre bacterias gramnegativas y grampositivas, lo que sugiere ciertas características estructurales comunes en los procesos de unión e infección. Muchos elementos genéticos que codifican mecanismos de resistencia a antibióticos también pueden contener los medios para hacer vulnerables las células que contienen dichos elementos genéticos. Por ejemplo, ciertos plásmidos bacterianos que codifican genes de resistencia a antibióticos también codifican un receptor que hace a la célula vulnerable a la unión de un bacteriófago (y su destrucción por el mismo). Alternativamente, el plásmido puede codificar genes o estructuras que pueden transferirse a células que de otro modo carecen del plásmido, lo que resulta en la transferencia de los genes de resistencia y los marcadores de vulnerabilidad asociados. Este mecanismo puede servir como medio de transmisión horizontal del plásmido que codifica la resistencia o la virulencia a huéspedes similares que carecen del marcador o marcadores de resistencia. Si también se transfieren los genes de vulnerabilidad, estos huéspedes adquieren sensibilidad a los medios de eliminación.

[0013] La presente descripción proporciona medios para seleccionar eficazmente como diana células que contienen ciertos elementos genéticos, en particular formas transmisibles, que codifican resistencia a antibióticos o virulencia. En otras realizaciones, proporciona medios para transferir la sensibilidad a la unión de fagos y destrucción por los mismos a una amplia diversidad de bacterias huésped diana.

[0014] Usando el procedimiento, puede conseguirse una disminución de la prevalencia de un plásmido conjugativo que codifica un receptor para un fago, por ejemplo, un tectivirus, dentro de un cultivo bacteriano heterogéneo. Para seleccionar como diana las células que contienen los elementos genéticos, puede usarse un sistema biológico (ejemplificado por un fago o una parte del mismo) que depende de un sistema de formación de parejas de apareamiento bacterianas (ejemplificado por los pelos sexuales o una parte de los mismos) para su actividad antibacteriana (eliminación/reducción del número de bacterias que presentan propiedades no deseables como resistencia a antibióticos, virulencia, etc.).

[0015] Una bacteria huésped que incluye el plásmido conjugativo y expresa el receptor para un fago se produce exponiendo el cultivo bacteriano a un sistema de formación de parejas de apareamiento que proporciona la transferencia del plásmido conjugativo que codifica el receptor para el fago de un miembro donante a un miembro receptor de dicho cultivo bacteriano y permitiendo a dicho sistema efectuar la transferencia de dicho plásmido conjugativo de dicho miembro donante a dicho miembro receptor de dicho cultivo bacteriano. Como segunda etapa, una vez que se tienen células huésped que expresan el receptor para el fago, el cultivo bacteriano se expone al fago apropiado que se une al receptor. Como parte de su ciclo vital, el fago destruye la bacteria huésped, con lo que disminuye la prevalencia del plásmido conjugativo que codifica el receptor para el fago dentro del cultivo bacteriano heterogéneo.

[0016] En un aspecto de la descripción, la disminución de la prevalencia es una disminución del número relativo o absoluto de dichos plásmidos conjugativos en dicho cultivo bacteriano; una disminución del número relativo o absoluto de dichos plásmidos conjugativos por miembro de dicho cultivo bacteriano; o una disminución del número relativo o absoluto de dichos huéspedes que contienen el plásmido en el cultivo bacteriano heterogéneo. En otro aspecto, la prevalencia reducida es al menos dos veces inferior a la prevalencia antes de la exposición al sistema de parejas de apareamiento.

[0017] El fago puede ser, por ejemplo, un fago de amplio espectro de huéspedes con contenido lipídico, incluido un tectivirus; un miembro del grupo de fagos PRD1; un bacteriófago de amplio espectro de huéspedes dependiente de un plásmido; un fago de la familia Tectiviridae; un fago caracterizado por al menos uno o más de entre una morfología icosaédrica, contenido lipídico, una cabeza de 55-65 nm de diámetro y una cola de 12-130 nm; o se selecciona del grupo de fagos denominados PRD1, PRR1, PR3, PR4, PR5, L17, PR772, GIL01, pGIL10, BAM35 o GIL16.

[0018] El plásmido conjugativo puede seleccionarse, por ejemplo, entre plásmidos de los grupos de incompatibilidad N, P o W; codifica una o más proteínas adicionales importantes para la replicación de los fagos (por ejemplo, una proteína que funciona en la unión, infección, replicación o lisis en el plásmido); codifica uno o más marcadores de resistencia a antibióticos, selección o virulencia; está en forma de un ADN separado del cromosoma de dicho miembro; o codifica uno o más genes para la formación de los pelos sexuales.

[0019] En un aspecto, el cultivo bacteriano heterogéneo está, por ejemplo, en una fase logarítmica de crecimiento; en una fase estacionaria de crecimiento; es un lactobacilo o un cultivo del procesamiento de un producto lácteo; está en una instalación de tratamiento de aguas; está en un cultivo de células eucariotas o de órganos; en un huésped eucariótico; en o sobre un organismo vertebrado; o en o sobre un mamífero.

[0020] El sistema de formación de parejas de apareamiento puede incluir, por ejemplo, al menos un gen para la formación de pelos sexuales; u otro sistema de transferencia de elementos movilizables, como transducción o electroporación. Otros sistemas alternativos para la introducción de los plásmidos apropiados incluyen sistemas de 5 administración de ADN basados en fagos.

[0021] La transferencia de material genético puede tener lugar, por ejemplo, a una temperatura de al menos 30 °C; una temperatura a la que se expresa una pluralidad de los genes para la formación de los pelos sexuales. Otra condición que puede variarse es el tiempo de transferencia, por ejemplo, entre dos y doce horas o, con mayor 10 preferencia, dos horas. La célula donante puede ser una célula bacteriana F+. La célula receptora puede ser una célula bacteriana F-. La transferencia de material genético resulta típicamente en un aumento de los miembros de dicho cultivo bacteriano que comprenden dicho plásmido conjugativo. La relación entre células donantes y células receptoras puede estar dentro de dos unidades logarítmicas con respecto a 1:1, por ejemplo, 100:1 a 1:100.

[0022] En relación con la adición del fago tectivirus al cultivo bacteriano heterogéneo, pueden añadirse al 15 menos 10 fagos por cada célula bacteriana que comprende dicho plásmido conjugativo que codifica dicho receptor, es decir, por cada célula sensible a la infección por el fago, incluido un tectivirus. El fago puede disminuir el número de dichos plásmidos conjugativos. El fago puede ser incapaz de replicarse en la bacteria huésped, por ejemplo, debido a una infección, replicación o lisis deficientes, incluido un mecanismo de incompatibilidad que incluye células 20 huésped que comprenden el plásmido conjugativo. El fago puede ser incapaz de replicar su genoma en bacterias huésped que comprenden dicho plásmido conjugativo. Por lo tanto, en los procedimientos no se requieren fagos que sean capaces de replicarse en la bacteria huésped.

[0023] En un aspecto, la descripción proporciona un procedimiento para transferir un elemento genético 25 movilizable que confiere sensibilidad a la unión de un fago, por ejemplo, un tectivirus, dentro de un cultivo bacteriano heterogéneo. El cultivo bacteriano heterogéneo incluye una célula bacteriana donante sensible a la unión del fago y una célula bacteriana receptora que no es sensible a la unión del fago. La transferencia del elemento genético tiene lugar entre la célula bacteriana donante y la célula bacteriana receptora en las condiciones apropiadas. Con la transferencia del elemento genético a la célula bacteriana receptora, la célula bacteriana receptora se vuelve 30 sensible a la unión de un fago, lo que típicamente conduce a la muerte de la célula receptora.

[0024] El elemento movilizable es típicamente un plásmido que codifica, por ejemplo, un gen receptor para un fago tectivirus o un gen para la formación de un pelo sexual. El plásmido puede seleccionarse entre cualquiera de los plásmidos siguientes: F, R386, R1, Col B-K99, Col B-K166, R124, R62, R64, R483, R391, R46, R724, RP4, RK2, 35 R751, RSF1010, R401, R388 o S-a; en un grupo Inc N, P o W; o en un grupo Inc D, M, X, Pl, U, C o J.

[0025] Algunos ejemplos de células bacterianas donantes sensibles a fagos tectivirus son, por ejemplo, una célula F+; una célula de una especie bacteriana gramnegativa; una célula de un género tal como *Escherichia*, 40 *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Proteus*, *Vibrio*, *Acinetobacter*, *Bacillus* o *Micrococcus*.

[0026] Algunos ejemplos de células bacterianas receptoras son una célula F-; una célula de una especie bacteriana gramnegativa; una célula de un género tal como *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Proteus*, *Vibrio*, 45 *Acinetobacter*, *Bacillus* o *Micrococcus*; o una célula portadora de un gen de resistencia a antibióticos o un gen de virulencia.

[0027] Algunos ejemplos de fagos tectivirus incluyen PRD1, AP50, Bam35, NS11, PR3, PR4, PR5, PR722, 50 L17 o P37-14.

[0028] La célula bacteriana donante y dicha célula bacteriana receptora pueden ser de especies bacterianas 50 diferentes o de géneros bacterianos diferentes.

[0029] En otro aspecto de la descripción, el procedimiento incluye una etapa de administración de un fago, por ejemplo, un tectivirus, para infectar las células huésped sensibles al fago que expresan el receptor, lo que resulta en la muerte de las células huésped sensibles o en una disminución del número de elementos movilizables que 55 codifican genes de resistencia a antibióticos o genes de virulencia bacteriana en el cultivo bacteriano heterólogo. También pueden administrarse antibióticos con el fago, por ejemplo, en administración secuencial o simultánea.

[0030] En un aspecto, la descripción proporciona una construcción genética recombinante que incluye un ácido nucleico que codifica un componente receptor para un fago, por ejemplo, un tectivirus. La expresión del

componente receptor para el fago puede estar dirigida por un promotor heterólogo fuerte que es funcional en la célula bacteriana huésped. En un aspecto preferido, el promotor es un promotor inducible que puede dirigir la expresión del gen del receptor hasta niveles al menos dos, cuatro, cinco, diez o más veces mayores en el estado inducido en comparación con el estado sin inducir. La construcción genética recombinante puede incluir también un
5 marcador seleccionable que está ligado al ácido nucleico que codifica el receptor del tectivirus. La bacteria huésped puede ser, por ejemplo, una bacteria gramnegativa.

[0031] En otro aspecto, la descripción proporciona una composición farmacéutica que comprende un ADN transmisible que codifica un receptor para un fago que se une a un fago lítico, donde el fago lítico destruirá una
10 célula bacteriana que exprese el receptor para el fago, y un excipiente farmacéuticamente aceptable. En ciertos aspectos, el ADN transmisible es un plásmido Inc seleccionado entre N, P, W, D, M, X, PI, U, W, C o J; o el fago lítico es un fago denominado PRD1, PRR1, PR3, PR4, PR5, L17, PR772, GIL01, pGIL01, BAM35 o GIL16. Además, se describe un kit que comprende uno o más compartimentos con el fago lítico y la composición farmacéutica.

[0032] La presente descripción proporciona un procedimiento para disminuir la prevalencia de un plásmido conjugativo que codifica un factor de resistencia a antibióticos y/o virulencia en una población bacteriana heterogénea. El procedimiento comprende las etapas de puesta en contacto de la población bacteriana heterogénea con el fago, por ejemplo, un tectivirus, que se une a o entra en una célula bacteriana huésped que contiene el plásmido conjugativo por medio de una interacción con una proteína receptora codificada por un componente de
20 ácido nucleico del plásmido conjugativo. Una vez que el fago se ha puesto en contacto con la célula bacteriana huésped y ha insertado su genoma en la misma, la célula huésped puede expresar el receptor apropiado. Un fago que se une a dicho receptor puede destruir la célula bacteriana huésped o reducir su replicación y la del plásmido relevante contenido en la misma. En otro aspecto, el procedimiento incluye una etapa de transformación de una proporción creciente de la población bacteriana con el plásmido que codifica un factor de resistencia a antibióticos
25 y/o virulencia y un receptor para un fago. De este modo, una población bacteriana infecciosa o patogénica puede convertirse en una población bacteriana sensible a destrucción o a la reducción de su proliferación después de la infección con el fago apropiado.

[0033] En un aspecto de la descripción, el número absoluto de dichas bacterias que contienen el plásmido en
30 la población bacteriana heterogénea disminuye, por ejemplo, en el 10 %, 20 %, 25 %, 40 %, 50 %, 75 %, 80 % o 90 % con respecto al total inicial. El número de bacterias presentes puede determinarse, por ejemplo, mediante recuento celular con un hemocitómetro o por dilución seriada en un medio apropiado, incluidas las condiciones de selección apropiadas.

[0034] El fago puede ser un fago de amplio espectro de huéspedes. Algunos ejemplos de fagos de amplio espectro de huéspedes incluyen la familia de bacteriófagos Tectiviridae; bacteriófagos de amplio espectro de huéspedes dependientes de plásmidos; fagos caracterizados por al menos uno o más de entre una morfología icosaédrica, contenido lipídico, una cabeza de 55-65 nm de diámetro y una cola de 12-130 nm; y fagos seleccionados del grupo siguiente: PRD1, PRR1, PR3, PR4, PR5, L17, PR772, GIL01, Bam35, PhiNS1 o GIL16,
40 AP50, P23-62, -65, -65H, -71, -72, -77, P37-2, -4, -4A, -4B, -6, -6A, -7A, -8, -8B, -9, -9A, -3, -13B, -13C, -13L, -14A, -21, -21C, -21T, -26, -265, -28, -36, -41, -41A, -41B, -43, -45, -50, -50L, -61, 61L, -62, -63, -64, -64C, -64L, -64T, -71, -72, -72L, -73, -74, -76, -77, -81, -82, -83, -84, -87, -88, P78-76.

[0035] El plásmido conjugativo puede tener una o más de las siguientes características: es miembro de un
45 grupo de incompatibilidad, por ejemplo, N, P, W, L/M, T, U, W, Y, B/O, FII, II, K, com9, FI, HI1, HI2, X, A/C, D, FIV, FV/FO, FVI, H13, HII, 12, Iy, J, V y similares, incluidas las variantes de los mismos, por ejemplo, que presentan una relación sustancial de secuencia o funcional; codifica uno o más genes adicionales importantes para la replicación de los fagos tectivirus; codifica uno o más marcadores de resistencia a antibióticos, selección o virulencia; está en forma de un ADN separado del cromosoma de la célula bacteriana huésped; o es parte del cromosoma; codifica uno
50 o más genes para la formación de pelos sexuales para la conjugación bacteriana.

[0036] La población bacteriana heterogénea puede estar en una fase de crecimiento logarítmica o estacionaria. La población bacteriana puede encontrarse en diversos entornos, por ejemplo, una unidad de procesamiento de alimentos; una instalación de tratamiento de aguas; una planta de tratamiento de aguas
55 residuales; una unidad de asistencia sanitaria; en un entorno tal como un entorno marino, aguas de estuario o una fuente termal. La población bacteriana puede estar en una colonia sinérgica en la que distintas especies interaccionan para constituir una colonia viable, como en una biopelícula o el intestino de las termitas. En tales colonias, la eliminación de un miembro crítico puede eliminar la viabilidad de la población. La población bacteriana puede encontrarse en un cultivo de células eucariotas o de órganos. En otra realización, la población bacteriana se

encuentra, por ejemplo, en un huésped eucariota; en o sobre un organismo vertebrado; o en o sobre un mamífero.

[0037] El contacto entre la célula huésped bacteriana y el fago puede tener lugar en un complejo de conjugación en la superficie de la célula bacteriana o en un apéndice de la célula bacteriana como un pelo sexual. El complejo de conjugación puede estar asociado con plásmidos conjugativos o movilizables. El contacto también puede producirse a través de una proteína asociada al bacteriófago que reconoce el complejo de conjugación anterior y se une al mismo. Para el contacto entre el fago y la célula bacteriana huésped, se prefiere una temperatura de 37 °C, aunque el contacto puede producirse a otras temperaturas superiores o inferiores. Un pH óptimo preferido para el contacto es 7,0, pero el contacto se producirá también a pH superior o inferior.

[0038] El contacto entre la célula huésped bacteriana y el fago se produce usando un fago que es capaz de unirse a la célula bacteriana huésped a diversas multiplicidades de infección con o sin la amplificación del fago.

[0039] En un aspecto de la descripción, el elemento genético transmisible es un plásmido o un fragmento cromosómico. El elemento genético transmisible codifica preferentemente un receptor para un fago tectivirus, un pelo sexual o un componente del complejo de conjugación bacteriano. En otro aspecto, el elemento genético transmisible es un plásmido. Los ejemplos preferidos de plásmidos incluyen, por ejemplo, F, R386, R1, Col B-K99, Col B-K166, R124, R62, R64, R483, R391, R46, R724, RP4, RK2, R751, RSF1010, R401, R388 o S-a. El plásmido puede pertenecer a un grupo de incompatibilidad (grupo Inc) tal como N, P, W, LM, T, U, W, Y, B/O, FII, II, K, com9, FI, HI1, HI2, X, A/C, D, FIV, FV/FO, FVI, HI3, HII, 12, Iy, J y V o variantes de los mismos. El donante sensible al fago puede ser, por ejemplo, una célula F+; una célula de un género tal como *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Proteus*, *Vibrio*, *Acinetobacter*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Bacillus* o *Micrococcus*; o una célula portadora de un gen de resistencia a antibióticos o de virulencia. La célula bacteriana receptora no sensible al fago puede ser, por ejemplo, una célula F-; una célula de un género tal como *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Proteus*, *Vibrio*, *Acinetobacter*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Bacillus* o *Micrococcus*. Si en el procedimiento se usa un fago tectivirus, los tectivirus preferidos incluyen, por ejemplo, PRD1, PRR1, PR3, PR4, PR5, L17, PR772, GIL01, Bam35, PhiNS1 1 o GIL16, AP50, P23-62, -65, -65H, -71, -72, -77, P37-2, -4, -4A, -4B, -6, -6A, -7A, -8, -8B, -9, -9A, -3, -13B, -13C, -13L, -14A, -21, -21C, -21T, -26, -26S, -28, -36, -41, -41A, -41B, -43, -45, -50, -50L, -61, 61L, -62, -63, -64, -64C, -64L, -64T, -71, -72, -72L, -73, -74, -76, -77, -81, -82, -83, -84, -87, -88, P78-76. En un aspecto preferido, la proporción de las células sensibles al fago tectivirus aumenta en la colonia o infección bacteriana.

[0040] Se usa un fago, por ejemplo, un tectivirus para infectar las células a las que se ha hecho expresar el receptor y se producen los resultados siguientes: la infección del fago resulta en la muerte de las células sensibles; la transmisión de otros elementos movilizables que codifican genes de resistencia a antibióticos o de virulencia bacteriana disminuye en la población celular sensible; la población bacteriana resistente a antibióticos y al fago y la población bacteriana virulenta disminuyen.

[0041] En cualquiera de los procedimientos descritos anteriormente, puede administrarse un antibiótico o antibióticos apropiados junto con el fago. La administración combinada del fago y el antibiótico puede resultar en una reducción sinérgica de las células bacterianas sensibles en la población bacteriana heterogénea o en la reducción del número de copias de ADN plasmídico presentes en la población.

[0042] Se ha caracterizado un grupo peculiar de fagos aislados de diversas partes del mundo que infectan bacterias gramnegativas que contienen un plásmido conjugativo. Véase Grahn y col. (2006) "PRD1: Dissecting the Genome, Structure and Entry", en Calendar (ed.), *The Bacteriophages* (2.ª edición), Oxford Univ. Press, ISBN-13: 9780195148503. Aislados muy similares también infectan bacterias huésped grampositivas. Estos fagos estrechamente relacionados se han clasificado conjuntamente en la familia Tectiviridae e incluyen, por ejemplo, los fagos denominados PR3, PR4, PR5, PR772, L17, AP50, NSI 1 y P37-14. Entre las diversas características interesantes de estos fagos, se incluye que el mecanismo de replicación, la arquitectura de la cápsida, el plegamiento de la principal proteína de la cubierta y la estructura del vértice se asemejan en gran medida a los de los adenovirus humanos. Esto ha llevado a la sugerencia de que estos virus pertenecen a un linaje original con un antepasado común que precede a la divergencia de los dominios bacteriano y eucariota de la vida. Las características estructurales de la familia Tectiviridae (en adelante, tectivirus) sugiere algunos principios subyacentes, consistentes con que estos fagos tienen mecanismos de unión e infección funcionalmente aplicables tanto a bacterias huésped gramnegativas como grampositivas. Por lo tanto, el dogma general de la biología de los fagos con respecto a la alta selectividad de unión a un huésped y de su infección parece no poderse aplicar a estos fagos de amplio espectro de huéspedes en concreto y quizás a otros, según se describe.

[0043] Típicamente, los tectivirus tienen una cápsida proteínica exterior icosaédrica, una bicapa de membrana

lipídica y el genoma de ADN vírico. El miembro mejor caracterizado, el fago PRD1, tiene un amplio espectro de huéspedes, es un fago específico del donante e infecta solamente células que contienen plásmidos IncP, IncN o IncW, que son plásmidos conjugativos de resistencia a múltiples fármacos. Los plásmidos Inc son plásmidos de grupos de "incompatibilidad" que impiden eficazmente la presencia de otros plásmidos del mismo grupo de incompatibilidad en el mismo huésped, pero que parecen ser necesarios para la infección del fago. Por lo tanto, los plásmidos parecen codificar alguna función necesaria para la infección del fago, presumiblemente el receptor para el fago. Parece que plásmidos de diferentes grupos de incompatibilidad son capaces de coexistir en un huésped individual, pero existe un mecanismo para impedir que varios plásmidos del mismo grupo coinfecten un huésped individual. Típicamente, los plásmidos codifican receptores para el fago y confieren a la bacteria huésped sensibilidad a la unión del fago (y en último término, a la infección por el mismo). Esto implica que la sensibilidad puede transferirse a células huésped que inicialmente no eran sensibles.

[0044] Existen muchos grupos Inc diferentes, con uno o más plásmidos descritos en cada grupo. Por ejemplo, el grupo FI está representado por los plásmidos F y R386; el grupo FII está representado por el plásmido R1; el grupo FIII está representado por los plásmidos Col B-K99 y Col B-K166; el grupo FIV está representado por el plásmido R124; el grupo I está representado por los plásmidos R62, R64 y R483 (al menos cinco subgrupos); el grupo J está representado por el plásmido R391; el grupo N está representado por el plásmido R46; el grupo O está representado por el plásmido R724; el grupo P está representado por los plásmidos RP4, RK2 y R751; el grupo Q está representado por el plásmido RSF1010; el grupo T está representado por el plásmido R401; y el grupo W está representado por los plásmidos R388 y S-a. Existen otros grupos similares con menos representantes que se identificarán en su momento.

II. Definiciones

[0045] Un "cultivo bacteriano" es una población de células, algunas de las cuales o todas son bacterias. En contextos de laboratorio, el cultivo es típicamente homogéneo y a menudo, clonal. En el contexto clínico, frecuentemente existen "cultivos bacterianos heterogéneos". Con frecuencia, el cultivo incluirá múltiples especies bacterianas, cada una de las cuales contiene a menudo variantes genéticas, y estas pueden interactuar y ejercer efectos biológicos sistemáticos sobre la población colectiva. Un cultivo bacteriano heterogéneo puede incluir más de una especie bacteriana. En algunas realizaciones, se encuentran más de dos, tres, cinco o diez especies bacterianas en un cultivo bacteriano heterogéneo. Los aspectos dinámicos del cultivo bacteriano heterogéneo pueden causar cambios en las cantidades relativas y prevalencia de diferentes subpoblaciones dentro del cultivo y en la dirección resultante del desarrollo de la población. En otros contextos, algunos aislados específicos pueden ser clonales y ciertas subpoblaciones pueden ser un foco o causa de síntomas de enfermedades infecciosas diferentes. Diferentes miembros del cultivo pueden ser clonales, pueden ser multiclonales o el cultivo puede incluir especies mixtas. La población puede tener componentes poblacionales sinérgicos, que a menudo forman estructuras de biopelículas. Véanse, por ejemplo, Talsma (2007) "Biofilms on medical devices", *Home Healthc. Nurse* 25(9): 589-94, PMID: 18049256; Paju y Scannapieco, "Oral biofilms, periodontitis, and pulmonary infections", *Oral Dis.* 13(6): 508-512, PMID: 17944664; Visai y col. (2007) "Staphylococcus biofilm components as targets for vaccines and drugs", *Int. J. Artif. Organs* 30(9): 813-819, PMID: 17918127; del Pozo y Patel (2007) "The challenge of treating biofilm-associated bacterial infections", *Clin. Pharmacol. Ther.* 82(2): 204-209, PMID: 17538551; y Ryan (2007) "Infection following soft tissue injury: its role in wound healing", *Curr. Opin. Infect. Dis.* 22(2): 124-128, PMID: 17496569, así como libros de texto de microbiología clínica general. Los cultivos bacterianos heterogéneos incluyen cultivos sinérgicos/simbióticos como biopelículas. En este tipo de cultivo bacteriano heterogéneo, la eliminación de un componente del cultivo puede hacer el cultivo inviable en su totalidad. Véase, por ejemplo, Colin y Moran (2006) "Molecular Interactions between Bacterial Symbionts and Their Hosts", *Cell* 126: 453-465.

[0046] Algunos ejemplos de sitios típicos de infección bacteriana en mamíferos y de cultivos bacterianos heterogéneos que se encuentran en los sitios infectados se listan a continuación. Cualquier sitio de infección puede incluir al menos dos o más de las especies listadas a continuación.

[0047] Intestino humano/de animales: especies de *Escherichia*, especies de *Salmonella*, especies de *Shigella*, especies de *Pseudomonas*, especies de *Klebsiella* y especies de *Proteus*.

[0048] Garganta humana (y neumonía por aspiración, sinusitis, otitis media, etc.): especies de *Staphylococcus*, especies de *Streptococcus*, especies de *Haemophilus*, especies de *Corynebacterium* y especies de *Neisseria*.

[0049] Heridas/quemaduras de la piel: especies de *Pseudomonas*, especies de *Staphylococcus*, especies de

Klebsiella. Infección de heridas de accidentes de tráfico: en su mayoría organismos del suelo y anaerobios (especies de *Clostridium*, especies de *Bacteroides*).

- [0050]** Los cultivos bacterianos heterogéneos que se encuentran en el entorno pueden incluir al menos dos especies bacterianas, incluida una de las especies siguientes: especies de *Escherichia*, especies de *Salmonella*, especies de *Shigella*, especies de *Pseudomonas*, especies de *Klebsiella*, especies de *Proteus*, especies de *Bacillus*, micobacterias del suelo y *Streptomyces*. Esta lista no excluye otros tipos de especies bacterianas que pueden estar representados en la población.
- 10 **[0051]** Pueden existir subconjuntos o subpoblaciones que contienen plásmidos, por ejemplo, algunas bacterias pueden tener diversos plásmidos diferentes o combinaciones de los mismos, los cuales pueden conferir diversas ventajas selectivas en determinadas condiciones. Ciertos plásmidos pueden codificar uno o más genes de resistencia a antibióticos o de virulencia. Los plásmidos de grupos Inc sirven típicamente para impedir la coexistencia de otros plásmidos del grupo de incompatibilidad en el mismo huésped. Véanse, por ejemplo, Fernández-López y col. (2006) "Dynamics of the IncW genetic backbone imply general trends in conjugative plasmid evolution", FEMS Microbiol. Rev. 30(6): 942-66, PMID: 17026718; y Adamczyk y Jagura-Burdzy (2003) "Spread and survival of promiscuous IncP-1 plasmids", Acta Biochim. Pol. 50(2): 425-53, PMID: 12833168. A menudo, la heterogeneidad en una especie puede reflejar la falta de presión selectiva entre formas diferentes o la incompleta selección de un fenotipo individual preferido.
- 15 20 **[0052]** Los tectivirus, miembros de la familia Tectiviridae, se refieren a un cierto fago de amplio espectro de huéspedes. Aunque los tectivirus son una forma de fagos de amplio espectro de huéspedes, existen otros, y otros más se descubrirán con la caracterización apropiada o con los criterios de selección pertinentes. Los criterios de clasificación pueden basarse en combinaciones de características estructurales y funcionales compartidas por los miembros del género o la especie. En particular, existen otros fagos similares, por ejemplo de las familias Inoviridae, Leviviridae y Podoviridae, cuya infectividad depende de plásmidos. En particular, estos ejemplos incluyen fagos cuyo espectro de huéspedes se define por que los huéspedes tienen plásmidos especiales, por ejemplo, que codifican un receptor para el fago respectivo. Como tales, estos plásmidos confieren la capacidad para la unión del fago y la infección por el mismo de huéspedes compatibles con el plásmido.
- 25 30 **[0053]** Entre otros fagos dependientes de plásmidos se incluyen: los plásmidos IncP proporcionan sensibilidad a ciertos fagos de la familia Inoviridae, por ejemplo, PR64FS e If1. Según se describe en otra parte, los plásmidos IncP, IncN e IncW proporcionan sensibilidad a ciertos fagos de la familia Tectiviridae, por ejemplo, PRD1, PR4, PR3, PR5, PR72 y L17. Los plásmidos IncD proporcionan sensibilidad a ciertos fagos de la familia Leviviridae o de ARN, incluidos, por ejemplo, los fagos D; R687, R711b, R778b y R840; el plásmido codifica estructuras que se asemejan a los fagos M y pilH α y el fago se une a los lados y el extremo de los pelos sexuales. La formación de placas muestra cierta sensibilidad a la temperatura, a menudo con mayor sensibilidad a menor temperatura. Los plásmidos IncM proporcionan sensibilidad a fagos de ARN, por ejemplo, el fago M, que parece funcionar en muchos organismos que contienen estos plásmidos. Los plásmidos IncX, IncM, IncN, IncP1, IncU, IncW y el plásmido R775 parecen proporcionar sensibilidad a fagos filamentosos que se adsorben a los extremos de los pelos sexuales, incluidos, por ejemplo, los fagos X y R6K. Los plásmidos IncC proporcionan sensibilidad a fagos de ARN, incluido, por ejemplo, el fago C-1; o fagos filamentosos, incluido, por ejemplo el fago C-2. Los plásmidos IncC, IncD e IncJ proporcionan sensibilidad a fagos de la familia Siphoviridae, incluido, por ejemplo, el fago J. El plásmido Folac proporciona sensibilidad al fago Folac. Los plásmidos IncP también proporcionan sensibilidad al fago filamentosos Pf3 (véase Luiten y col. (1985) J. Virol. 56(1): 288-276) y los segmentos de unión al receptor en este pueden usarse para el direccionamiento de un agente destructivo, ya se trate de un fago intacto u otra actividad ligada al dominio de unión al receptor (véanse, por ejemplo, los documentos WO 2007/130655 y PCT/US2007/010972). Igualmente, los plásmidos IncI o IncN proporcionan sensibilidad al fago filamentosos Ike y los plásmidos IncI, IncN e IncP confieren sensibilidad al fago filamentosos I2-2. Véase, por ejemplo, Bradley y col. (1983) J. Bact. 154(1): 505-507.
- 35 40 45 50 **[0054]** Varios de los tectifagos descritos afectan a diferentes organismos grampositivos, por ejemplo, Bam35 actúa sobre *B. thuringiensis*, AP50 sobre *B. anthracis*, PhiNS1 sobre *B. acidocaldarius*, GIL16 y GIL01 sobre *B. thuringiensis*, y pBCLIN sobre *B. cereus*.
- 55 **[0055]** Un fago de amplio espectro de huéspedes será un fago cuyo espectro de huéspedes es típicamente más amplio que lo que corresponde según el dogma de la alta especificidad de los huéspedes bacterianos. Véanse, por ejemplo, Bamford y col. (1995) "Bacteriophage PRD1: a broad host range DSDNA tectivirus with an internal membrane", Adv. Virus Res. 45: 281-319, PMID: 7793328; y Saren y col. (2005) "A snapshot of viral evolution from genome analysis of the tectiviridae family", J. Mol. Biol. 350(3): 427-40, PMID: 15946683. Típicamente, el fago de

amplio espectro de huéspedes puede infectar a muchos huéspedes que expresan una molécula receptora apropiada, pero pueden ser huéspedes clasificados en géneros, familias, u otras categorías de clasificación divergentes. El receptor puede estar codificado en un plásmido conjugativo o en otro sitio, de modo que proporcione los genes necesarios para la unión, infección y/o destrucción, según se desee.

5

[0056] Un plásmido conjugativo codifica típicamente las funciones necesarias para su propia transmisión intercelular, preferentemente por conjugación. En el contexto usado en este documento, se desea la función de codificación de la mayoría de los genes necesarios, lo que deja la posibilidad de seleccionar o diseñar construcciones que puedan complementar los componentes ausentes en el propio plásmido. Por lo tanto, existen medios para ampliar el espectro de huéspedes de los plásmidos mediante la adición o selección de plásmidos que ya presentan amplios espectros de huéspedes, incluidos orígenes de replicación de baja especificidad u orígenes múltiples compatibles con el espectro de huéspedes deseado. El plásmido conjugativo es una forma de “elemento movilizable”, el cual es típicamente el medio físico por el que se consigue la diversificación de especies y patotipos bacterianos. Por ejemplo, la transferencia génica lateral (TGL) de diversos elementos móviles de ADN puede tener lugar por medio de plásmidos, fagos, transposones e islas genómicas. Aunque los medios que se consideran más comunes son los plásmidos, pueden conseguirse funciones similares mediante la aplicación análoga de los principios descritos entre fagos, transposones y similares.

10

15

[0057] La disminución de los plásmidos conjugativos, ya sea en números absolutos o en prevalencia en las células huésped, puede efectuarse de muchas maneras. La desventaja selectiva de contener un plásmido de gran tamaño puede seleccionar contra los huéspedes que contienen el plásmido o causar que los huéspedes pierdan todo o parte del plásmido. Por el contrario, los plásmidos pueden conferir un fenotipo ventajoso, por ejemplo, resistencia a un antibiótico, y todas las células podrían contener el plásmido. En otras situaciones, el plásmido puede codificar el receptor para un fago, lo que hace del fago un medio para destruir o eliminar los huéspedes que contienen el plásmido. En algunas realizaciones, el plásmido conjugativo es un plásmido recombinante que ha sido diseñado para reducir su tamaño (reducción del número total de nucleótidos), manteniendo la función del plásmido conjugativo, es decir, la capacidad de transferirse entre células y la presencia de una secuencia de ácido nucleico que, expresada en la célula huésped, codifica un receptor para un tectivirus. La disminución puede ser en el número absoluto de plásmidos, en el número de huéspedes pertinentes en el cultivo que contienen el plásmido o en la fracción relativa de huéspedes que contienen el plásmido.

30

[0058] Un sistema de formación de parejas de apareamiento es el medio por el que se transfiere el ADN de una célula a otra. Esto es distinto de la división de una célula para producir dos células, aquí dos células transfieren entre sí algún componente de ADN. Véanse, por ejemplo, Schaechter (2004) *The Desk Encyclopedia of Microbiology* (2.^a edición), Academic Press, ISBN 0126213615, 9780126213614; Funnell y Phillips (eds., 2004) *Plasmid Biology*, ASM Press, ISBN-10: 1555812651, ISBN-13: 978-1555812652; Streips y Yasbin (2003) *Modern Microbial Genetics* (2.^a edición), Wiley-IEEE (2003), ISBN 0471461083, 9780471461081; Schrodera y Lankab (2005) "The mating pair formation system of conjugative plasmids - A versatile secretion machinery for transfer of proteins and DNA", *Plasmid* 54(1): 1-25; Francia y col. (2004) "A classification scheme for mobilization regions of bacterial plasmids", *FEMS Microbiol. Rev.* 28(1): 79-100; Frost y col. (1994) "Analysis of the sequence and gene products of the transfer region of the F sex factor", *Microbiol. Rev.* 58(2): 162-210; Novotny y col. (1969) "Functions of F Pili in Mating-Pair Formation and Male Bacteriophage Infection Studied by Blending Spectra and Reappearance Kinetics", *J. Bact.* 98(3): 1307-1319; Delmonte-Corrado y col. (2007) "Lectin-Binding Sites Involved in *Paramecium primaurelia* Mating Pair Formation", *Journal of Eukaryotic Microbiology* 44(6): 603-608; Murakami y Haga (1995) "Interspecific Pair Formation Induced by Natural Mating Reaction in *Paramecium*", *Zoological Sci.* 12: 219-223; Mating pair formation in Gram-positive Bacteria: Dale y Park (2004) *Molecular Genetics of Bacteria* (4.^a edición), John Wiley and Sons. Típicamente, la transferencia se produce a través de un mecanismo de conjugación, pero variantes de la misma, incluida la transformación, la transferencia de fagos o la transferencia parcial del genoma de fagos, la transducción u otros procesos relacionados conseguirán con frecuencia el fin deseado. En el proceso de conjugación, el sistema incluye típicamente las funciones necesarias para la producción de los pelos sexuales y permite la transferencia y el uso de marcadores genéticos o casetes relevantes, por ejemplo, de resistencia a antibióticos, virulencia o marcadores de receptores para fagos. Existen medios para suplir o complementar sistemas incompletos, por ejemplo, mediante el uso de una o más construcciones auxiliares.

50

[0059] Las “condiciones GMP” se refieren a buenas prácticas de fabricación, por ejemplo, según define la Administración de Medicamentos y Alimentos del Gobierno de los Estados Unidos. En Europa, Japón y la mayoría de los países desarrollados existen prácticas y regulaciones análogas.

55

[0060] El término “sustancialmente” en las definiciones anteriores, por ejemplo, de “sustancialmente puro”,

indica generalmente al menos aproximadamente el 60 %, al menos aproximadamente el 70 %, al menos aproximadamente el 80 % o, con mayor preferencia, al menos aproximadamente el 90 % y, aún con mayor preferencia, al menos aproximadamente el 95 % de pureza, ya se trate de una proteína, un ácido nucleico u otra estructura u otra clase de moléculas.

5

[0061] La práctica de esta invención puede implicar la construcción de ácidos nucleicos recombinantes y la expresión de genes en células huésped, preferentemente, células huésped bacterianas. A menudo será aplicable un uso de codones optimizados para un huésped específico. Los procedimientos de clonación molecular para alcanzar esto fines son conocidos en la técnica. Los expertos en la materia conocen bien una amplia diversidad de procedimientos de clonación y amplificación *in vitro* adecuados para la construcción de ácidos nucleicos recombinantes tales como vectores de expresión. Algunos ejemplos de estas técnicas y de instrucciones suficientes para dirigir a los expertos en la materia a través de numerosos ejercicios de clonación se encuentran en Berger y Kimmel, *Guide to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzymology*, volumen 152, Academic Press, Inc., San Diego, CA (Berger); y *Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel y col., eds., Current Protocols, una empresa conjunta de Greene Publishing Associates, Inc. y John Wiley & Sons, Inc. (suplemento de 1999) (Ausubel). Las células huésped adecuadas para la expresión de los polipéptidos recombinantes son conocidas por los expertos en la materia e incluyen, por ejemplo, células procariontas, como *E. coli*, y células eucariotas, incluidas células de insectos, mamíferos y hongos (por ejemplo, *Aspergillus niger*).

10

15

20

[0062] Algunos ejemplos de protocolos suficientes para dirigir a los expertos en la materia a través de procedimientos de amplificación *in vitro*, incluida la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la reacción en cadena de la ligasa (LCR), la amplificación con replicasa Q β y otras técnicas mediadas por polimerasas de ARN se encuentran en Berger, Sambrook y Ausubel, así como en Mullis y col. (1987) patente de los EE. UU. n.º 4.683.202; PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications (Innis y col., eds.), Academic Press Inc., San Diego, CA (1990) (Innis); Arnheim y Levinson (1 de octubre de 1990) C&EN 36-47; The Journal of NIH Research (1991) 3: 81-94; Kwoh y col. (1989) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 86: 1173; Guatelli y col. (1990) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 87: 1874; Lomell y col. (1989) J. Clin. Chem. 35: 1826; Landegren y col. (1988) Science 241: 1077-1080; Van Brunt (1990) Biotechnology 8: 291-294; Wu y Wallace (1989) Gene 4: 560; y Barringer y col. (1990) Gene 89:117. En Wallace y col., patente de los EE. UU. n.º 5.426.039, se describen procedimientos mejorados para la clonación de ácidos nucleicos amplificados *in vitro*.

30

[0063] El término "ácido nucleico" se refiere a un polímero de desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos en forma mono o bicatenaria y, a menos que se limite en otro sentido, abarca los análogos conocidos de los nucleótidos naturales que hibridan con los ácidos nucleicos de manera similar a los nucleótidos de origen natural. A menos que se indique lo contrario, una secuencia de ácido nucleico concreta incluye la secuencia complementaria de la misma.

35

[0064] Un "casete de expresión recombinante" o simplemente, un "casete de expresión" es una construcción de ácido nucleico, generada de forma recombinante o sintética, con elementos de ácido nucleico que son capaces de afectar la expresión de un gen estructural en huéspedes compatibles con tales secuencias. Los casetes de expresión incluyen al menos promotores y, opcionalmente, señales de terminación de la transcripción. Típicamente, el casete de expresión recombinante incluye un ácido nucleico que ha de transcribirse (por ejemplo, un ácido nucleico que codifica un polipéptido deseado) y un promotor. También pueden usarse factores adicionales necesarios o útiles para efectuar la expresión, según se describe en este documento. Por ejemplo, un casete de expresión también puede incluir secuencias nucleotídicas que codifican una secuencia señal que dirige la secreción de una proteína expresada por la célula huésped. En un casete de expresión también pueden incluirse señales de terminación de la transcripción, potenciadores y otras secuencias de ácido nucleico que influyen en la expresión génica. En realizaciones preferidas, un casete de expresión recombinante que codifica una secuencia aminoacídica que comprende un receptor para un fago se expresa en una célula huésped bacteriana. En otra realización, un casete de expresión recombinante que codifica una secuencia aminoacídica que comprende una proteína terapéutica se expresa en una célula huésped bacteriana. En otra realización, un casete de expresión policistrónica que codifica una secuencia aminoacídica que comprende un receptor para un fago se expresa en una célula huésped bacteriana. En otra realización, un casete de expresión policistrónica se expresa en una célula bacteriana para la producción de más de una proteína, por ejemplo, un receptor para un fago y una proteína terapéutica. En otro ejemplo de expresión de más de una proteína recombinante, un casete de expresión puede incluir más de un casete de expresión monocistrónica.

40

45

50

55

[0065] Una "secuencia heteróloga" o un "ácido nucleico heterólogo", según se usan en este documento son aquellos que se originan a partir de una fuente exógena a la célula huésped concreta o, si son de la misma fuente, están modificados con respecto a su forma original. Por lo tanto, un gen de un receptor para un fago heterólogo en

una célula huésped bacteriana incluye un gen que codifica un receptor modificado que es endógeno de la célula huésped concreta. La modificación de la secuencia heteróloga puede tener lugar además, por ejemplo, por tratamiento del ADN con una enzima de restricción para generar un fragmento de ADN que puede ligarse operativamente al promotor. Las técnicas tales como la mutagénesis dirigida también son útiles para modificar una
5 secuencia heteróloga.

[0066] El término “ligado operativamente” se refiere a un ligamiento funcional entre una secuencia de control de la expresión de un ácido nucleico (como un promotor, una secuencia señal o una disposición de sitios de unión para factores de transcripción) y una segunda secuencia de ácido nucleico, en que la secuencia de control de la
10 expresión afecta a la transcripción y/o traducción del ácido nucleico que corresponde a la segunda secuencia.

[0067] “Proteína”, “polipéptido” o “péptido” se refieren a un polímero en el que los monómeros son aminoácidos y están unidos entre sí mediante enlaces amida, alternativamente denominados polipéptidos. Cuando los aminoácidos son aminoácidos α , puede usarse el isómero óptico L o el isómero óptico D. Adicionalmente, se
15 incluyen también aminoácidos no naturales, por ejemplo, β -alanina, fenilglicina y homoarginina. En la presente invención pueden usarse también aminoácidos que no están codificados por genes. Además, en la invención pueden usarse aminoácidos que han sido modificados para incluir grupos reactivos. Todos los aminoácidos usados en la presente invención pueden ser isómeros D o L. Generalmente se prefieren los isómeros L. Además, en la presente invención también son útiles otros peptidomiméticos. Para una revisión general, véase Spatola, A. F., en
20 Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides and Proteins, B. Weinstein, eds., Marcel Dekker, Nueva York, pág. 267 (1983).

[0068] El término “recombinante”, cuando se usa con referencia a una célula, indica que la célula replica un ácido nucleico heterólogo o expresa un péptido o una proteína codificados por un ácido nucleico heterólogo. Las
25 células recombinantes pueden contener genes que no se encuentran en la forma nativa (no recombinante) de la célula. Las células recombinantes pueden contener también genes que se encuentran en la forma nativa de la célula, donde los genes han sido modificados y reintroducidos en la célula por medios artificiales. El término también abarca células que contienen un ácido nucleico endógeno de la célula que ha sido modificado sin retirar dicho ácido nucleico de la célula; tales modificaciones incluyen aquellas obtenidas por sustitución génica, mutación de sitios
30 específicos y técnicas relacionadas. Una “proteína recombinante” es aquella que ha sido producida en una célula recombinante. En realizaciones preferidas, una célula bacteriana recombinante produce un receptor para un fago recombinante.

III. Mecanismos generales de resistencia a antibióticos, agrupaciones RMF, factores de virulencia

[0069] Según se indica anteriormente, los antibióticos han revolucionado la práctica de la medicina al evitar muchos de los problemas presentados por las enfermedades infecciosas. El descubrimiento de la penicilina inició esta estrategia y se han explotado muchos mecanismos de acción diferentes para impedir el crecimiento de la flora
40 microbiana. En respuesta, han evolucionado muchos mecanismos bacterianos para eludir las actividades de los antibióticos y prácticamente todos los antibióticos han conducido a la adopción de estrategias de resistencia por los huéspedes diana. Entre los muchos mecanismos de acción, se han desarrollado antibióticos que alteran la síntesis de la pared celular, la función de la membrana celular, la síntesis de proteínas, la síntesis de ácidos nucleicos y la actividad metabólica. Además, los muchos medios de resistencia a menudo se encuentran genéticamente agrupados o ligados entre sí, con frecuencia de forma extracromosómica, para poder transferirse entre huéspedes
45 de manera eficiente. Generalmente, las agrupaciones extracromosómicas están en plásmidos R, pero pueden estar en otras formas genéticas relacionadas, por ejemplo, plásmidos F o fagos. Véase, por ejemplo, Torres y col. (2007) "Current concepts in antibiotic-resistant gram-negative bacteria", Expert Rev. Anti Infect. Ther. 5(5): 833-43.

[0070] Los factores de virulencia son estructuras que proporcionan funciones importantes en la patogenicidad
50 microbiana. Véase, por ejemplo, Finlay and Falkow (1997) "Common themes in microbial pathogenicity revisited", Microb. Mol. Biol. Rev. 16: 136-139. Existen diversas definiciones de patogenicidad microbiana y los patógenos pueden distinguirse de sus homólogos no virulentos por la presencia de dichos genes de virulencia. Varios grupos han explorado el dilema de lo que constituye exactamente un factor de virulencia. Se ha sugerido que las proteínas que se piensa que son necesarias para la patogenicidad se ordenan en tres categorías: (1) genes de virulencia
55 “verdaderos”, (2) aquellos que se asocian con virulencia, como los reguladores de la expresión de los factores “verdaderos”, y (3) genes de “estilo de vida” virulento que la bacteria necesita para hacer posible la colonización del huésped. Esencialmente, un factor de virulencia es cualquier fracción producida por un patógeno que es esencial para causar una enfermedad en un huésped. Véase, por ejemplo, Wassenaar y Gaastra (2001) "Bacterial virulence: can we draw the line?" FEMS Microbiol. Lett. 9995: 1-7.

[0071] Los factores de virulencia bacterianos pueden dividirse aproximadamente en varios grupos, sobre la base de mecanismo de virulencia y función. Estos incluyen generalmente factores de adherencia y colonización, invasinas, cápsulas y componentes superficiales, endotoxinas, exotoxinas, sideróforos y transportadores de toxinas.

5

[0072] Normalmente, la primera barrera del huésped para muchos patógenos invasores es una superficie mucosa, como el intestino o las vías respiratorias. Dado que el tiempo de renovación de las células epiteliales es de aproximadamente 48 horas en estos entornos, la bacteria debe unirse y replicarse suficientemente para evitar su arrastre. Por consiguiente, muchas de ellas han desarrollado elementos móviles o de unión como flagelos y pelos/fimbrias para cruzar la barrera e invadir. Una unión simple se produce a través de un receptor en la superficie de la célula huésped y una adhesina en la de la bacteria. Algunas pueden ser específicas de la especie e incluso de la cepa, mientras que otras muestran tropismo tisular, es decir, *Streptococcus mutans* colonizará los dientes, pero no el epitelio de la lengua. Otros ejemplos incluyen la subunidad proteínica fimbrial de *Vibrio*, *Neisseria* y *Pseudomonas ssp.* que se unen a D-manosa en la superficie de las células huésped. *Escherichia coli* también usa esta estrategia, pero puede variar la proteína de los extremos de las fimbrias para unirse a otros receptores como el ácido siálico (fimbrias S).

10

15

[0073] Las invasinas difieren de los factores de adherencia por el hecho de que actúan extracelularmente, destruyendo las defensas del huésped a nivel local y facilitando el paso de la infección. La mayoría son enzimas, que afectan a las barreras físicas como las matrices de tejidos y las membranas celulares. De esta manera, la bacteria puede diseminarse rápidamente a través de los espacios intercelulares. Algunas exotoxinas pueden tener también propiedades invasivas de corta duración, pero pueden distinguirse de las verdaderas invasiones, es decir, la toxina pertúsica de *Bordetella*. Hay varias clases de enzimas invasivas. Algunas disuelven tejidos resistentes como el componente hialurónico del tejido conectivo (la hialuronidasa de *Clostridium*). Otras proteínas perforan orificios en las membranas celulares y causan la lisis celular (lecitinasas y fosfolipasas de *Clostridium* y cocos grampositivos). Otras proteínas bacterianas intracelulares obligadas (por ejemplo, de *Listeria*) han sido denominadas "invasinas", pero estas actúan exclusivamente sobre los filamentos de actina del huésped e inducen el englobamiento del microorganismo para la colonización.

20

25

30

[0074] Las cápsulas y los componentes superficiales pueden usarse para evitar la fagocitosis. Muchos patógenos han desarrollado componentes superficiales que evitan la unión de macrófagos y su englobamiento por los mismos y otras respuestas inmunitarias celulares del huésped. Estos pueden tomar la forma de proteínas unidas a la membrana, cápsulas de polisacárido viscoso o fracciones "endógenas" secuestradas por el microorganismo y unidas a su superficie celular. Un ejemplo de las últimas se encuentra en *Treponema pallidum*, el agente causante de la sífilis. La bacteria secuestra fibronectina del huésped y une la fracción a su membrana celular externa.

35

[0075] Las bacterias grampositivas están rodeadas de forma natural por una gruesa pared celular que tiene una baja permeabilidad al entorno circundante, mientras que el lipopolisacárido (LPS) o "endotoxina" de las bacterias gramnegativas puede proteger contra la lisis mediada por el complemento. Además, varios antígenos producidos por las dos clases pueden inhibir la adsorción, como la proteína M de *Streptococcus*, la proteína A de *Staphylococcus* y el antígeno Vi de *Salmonella typhi*.

40

[0076] Algunos cocos intracelulares piógenos tienen también la capacidad de destruir fagocitos. *Streptococcus pyogenes* y estafilococos patógenos excretan enzimas líticas que causan la explosión de los lisosomas de los neutrófilos en el citoplasma y destruyen las células huésped. La exotoxina A de la bacteria gramnegativa *Pseudomonas aeruginosa* también puede destruir fagocitos al detener la maquinaria intracelular de síntesis de proteínas.

45

[0077] Prácticamente solo los organismos gramnegativos tienen endotoxinas. La endotoxina o lipopolisacárido (LPS) activa la ruta del complemento del huésped y es un potente inductor de inflamación. Es una fracción química de la membrana externa que consta de tres secciones: un lípido tóxico (lípido A) anclado en la membrana externa, un núcleo de polisacárido inmunógeno y una serie de oligosacáridos antigénicos enlazados a O en la superficie extracelular. Se considera parte de la patología de las bacterias gramnegativas. Especies tan diversas como *Salmonella typhimurium* y *Neisseria meningitidis* expresan LPS en sus superficies celulares.

50

55

[0078] Las endotoxinas son tóxicas para la mayoría de los mamíferos y pueden ser letales si se encuentran en una dosis demasiado alta. La liberación específica de LPS en la circulación del huésped estimula la unión de una cierta proteína, lo que se denomina el "complejo de unión al LPS". Este interacciona con receptores CD14 en diversos monocitos y macrófagos, lo que desencadena la liberación de citocinas inflamatorias y la activación del

complemento y de cascadas de coagulación. El malestar fisiológico que implica la pirogenicidad y mitogenicidad conduce eventualmente a la septicemia y la muerte. Sin embargo, bajos niveles de LPS usados, por ejemplo, como adyuvante, aumentan favorablemente la resistencia microbiana del huésped e inducen la producción por las células T de más interferón γ , que potencia la actividad antiviral. El lípido A, como componente del LPS, es un fuerte potenciador biológico y puede reforzar el sistema inmunitario.

[0079] Las exotoxinas son secretadas por células patógenas viables. Las exotoxinas proteínicas bacterianas están entre las toxinas más potentes conocidas. A menudo están codificadas por bacteriófagos o plásmidos y hay muchas clases, todas ellas fuertemente antigénicas pero intrínsecamente inestables. Algunas actúan en la superficie de la célula huésped, mientras que la mayoría (toxinas A/B) se unen a la membrana de la diana con un receptor (subunidad B) y suministran una segunda porción (subunidad A) directamente al citoplasma. Algunas toxinas más especializadas implican la "inyección" de la proteína en el huésped por medio de un sistema de secreción único del "tipo III". Este último se encuentra solamente en algunos enteropatógenos gramnegativos. Las toxinas también pueden agruparse de acuerdo con su actividad biológica en ciertas células, como leucotoxinas, neurotoxinas, etc.

[0080] Una toxina típica A/B bien estudiada es la exotoxina diftérica (TD) de *Corynebacterium diphtheriae*. El receptor específico usado es el factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina; la subunidad A detiene la síntesis de proteínas del huésped y provoca la muerte celular. Sin embargo, la toxina puede usar también endocitosis mediada por receptores del huésped (EMR) para entrar en la célula a través de un endosoma. Una subunidad A en el citoplasma es suficiente para causar la muerte y la bacteria puede liberar hasta 5.000 moléculas en una hora.

[0081] Las toxinas de acción superficial normalmente inducen sus efectos al unirse a moléculas de la célula diana o al formar poros en la membrana a través de los que se produce la lisis celular. Este grupo incluye la toxina vacuolizante de *Helicobacter pylori*, la hemolisina de *E. coli* y los "superantígenos" pertenecientes a *Streptococcus pyogenes* y *Staphylococcus aureus*. A partir de la elucidación de la estructura cristalina, es posible clarificar la función de tales proteínas a nivel molecular. En los receptores de linfocitos T indiferenciados de unión inespecífica por medio de complejos MHC-II, se desencadena una liberación masiva de citocinas inflamatorias que causa un síndrome de choque tóxico similar a la fiebre piógena.

[0082] Los sistemas de secreción del tipo III (SSTT) de algunos enteropatógenos gramnegativos son un grupo inusual de exotoxinas. Están compuestos de dos grupos de proteínas; fracciones estructurales y efectores, que están codificados conjuntamente en islas de patogenicidad de gran tamaño en el cromosoma bacteriano. Aunque la mayor parte de los componentes estructurales proteínicos de los SSTT muestran homología de secuencia, los efectores afectan a la célula huésped de diversas maneras con el fin de facilitar la diseminación bacteriana. Por ejemplo, las seis exotoxinas Yop secretadas por *Yersinia pestis* afectan drásticamente al citoesqueleto de actina, lo que interfiere con la fagocitosis mediada por integrinas y permite la absorción de la bacteria intracelular facultativa. Las proteínas Ipa de *S. flexneri* contribuyen a la muerte de los neutrófilos por necrosis, lo que permite al patógeno entrar en las células huésped por medio de la rotura de la barrera epitelial. Algunas características comunes a estos efectores incluyen: la falta de una señal sec tradicional que se observa en otras exotoxinas secretadas, extensivo acompañamiento por proteínas accesorias (también codificadas en las islas de patogenicidad de los SSTT) cuando se encuentran en el citoplasma bacteriano y una posible señal de translocación dentro del ARNm que codifica cada toxina.

[0083] El entorno del huésped es típicamente ideal para las bacterias en todos los sentidos, excepto en uno: hay abundante hierro, pero firmemente unido en grupos hemo, ferritina, transferrina o lactoferrina. Este puede ser el factor limitante en las infecciones. Por consiguiente, algunos patógenos han desarrollado factores de virulencia sideróforos que intervienen en la liberación del hierro del huésped para consumo del parásito. Algunos ejemplos incluyen la enteroquelina de *Escherichia* y *Salmonella spp.* que secuestran hierro unido al huésped mediante altas constantes de unión. Algunos experimentos que implican la delección de los siete genes de la enteroquelina de *Salmonella* han demostrado que los patógenos pierden su virulencia cuando se inyectan en modelos de ratón. Por lo tanto, los sideróforos son esenciales para la virulencia.

[0084] La mayoría de los patógenos bacterianos gramnegativos usan cuatro sistemas de secreción para transportar las toxinas proteínicas de su citoplasma al huésped o a la matriz extracelular. Numerados del tipo I a IV, respectivamente, los sistemas son usados por diferentes grupos de exotoxinas, como la secreción del tipo I de la hemolisina de *E. coli* a través del periplasma. Aunque las proteínas del tipo I tienen una señal de secreción, no se escinde nada durante el transporte y todo el proceso opera como un mecanismo en una etapa que implica un poro a través de las membranas interna y externa. Muchos de los genes de exotoxinas secretados específicamente están

agrupados en islas de patogenidad próximas a los genes de sus aparatos de secreción respectivos.

[0085] La mayoría de las exotoxinas A/B, como las de *Corynebacterium diphtheriae* y *Vibrio cholerae* se transportan a la superficie de la célula bacteriana por medio del sistema del tipo II, en dos etapas. Después de la escisión del extremo amino en el citoplasma bacteriano y del transporte de la proteína por la maquinaria *sec*, se forma un intermedio periplásmico. Este pasa entonces a través de un segundo conjunto de proteínas transmembranales. Las exotoxinas segregadas del grupo IV también usan las proteínas *sec* de la membrana interna, pero pasan a través de la membrana externa por medio de su extremo carboxilo, como la fracción CagA de *Helicobacter pylori*. El sistema de secreción del tipo III, ya descrito anteriormente, secreta efectores a través de una "aguja" macromolecular especializada que inyecta las exotoxinas directamente en el citoplasma de la célula huésped.

[0086] Estos numerosos factores de virulencia están codificados frecuentemente en plásmidos que se transfieren entre las cepas bacterianas huésped. Los medios para disminuir el número de huéspedes o de plásmidos en una población que tiene dichos plásmidos pueden conseguirse utilizando los procedimientos descritos en este documento. Los plásmidos o elementos movilizables pueden representar dianas mucho más amplias que simplemente los plásmidos de resistencia a fármacos antibacterianos, pero incluyen aquellos que codifican algunos o todos estos diversos elementos de virulencia diferentes.

20 IV. Sistemas de conjugación; elementos movilizables; transferencia de ADN

[0087] Un plásmido es típicamente un replicón o pieza de ADN replicable que se hereda de forma estable en estado extracromosómico. En la bibliografía antigua, se usaba el término episoma para plásmidos capaces de integrarse en el cromosoma, pero hace mucho tiempo que este término está en desuso. Típicamente, un plásmido existe como una pieza circular cerrada covalentemente de ADN bicatenario que tiene la capacidad de replicarse de forma autónoma y es esta propiedad la que conduce a su aislamiento y reconocimiento físico. La naturaleza covalente cerrada de su estructura permite separarlos del ADN cromosómico por electroforesis en gel o por gradientes de densidad flotante de cloruro de cesio. Véase, por ejemplo, bact.wisc.edu o libros de texto básicos o monografías sobre microbiología o biología molecular.

[0088] Prácticamente todos los plásmidos tienen dos características en común: tienen funciones de replicación y típicamente se ordenan en grupos de incompatibilidad, que restringen qué plásmidos pueden coexistir en un huésped individual.

[0089] En el caso más simple, la función de replicación deriva de uno o más orígenes de replicación con las proteínas transactivas necesarias para la replicación codificadas por el plásmido mismo o "tomadas en préstamo" de la maquinaria de replicación normal del huésped. El amplio espectro de huéspedes de algunos plásmidos se explica al menos en parte por sus múltiples sistemas de replicación, que les permiten funcionar en una diversidad de huéspedes distintos, por ejemplo, orígenes de replicación promiscuos, múltiples orígenes alternativos, una combinación o similares.

[0090] Los plásmidos se ordenan típicamente en solo uno de los muchos grupos de incompatibilidad existentes. Dos plásmidos son incompatibles si cualquiera de ellos es menos estable en presencia del otro de lo que lo era por sí mismo. Hasta ahora se han descrito más de 30 grupos de incompatibilidad, sin límite superior a la vista. La incompatibilidad, cuya designación genotípica es *inc*, es frecuentemente una consecuencia necesaria del deseo de un plásmido de mantener un cierto número de copias en una célula. Si los plásmidos de un grupo de incompatibilidad dado tienen un cierto número de copias que intentan mantener, cuando dos plásmidos del mismo grupo de incompatibilidad se encuentran en la misma célula, resulta una competición. El plásmido que sea capaz de replicarse más rápidamente o tenga alguna otra ventaja estará representado en un grado desproporcionado entre las copias permitidas por el sistema de incompatibilidad. Sorprendentemente, los plásmidos también pueden ser incompatibles cuando los dos poseen las mismas funciones para el reparto de los mismos en las células hijas.

[0091] En los plásmidos se encuentran a menudo diversas características adicionales. Muchos plásmidos contienen genes que no están implicados en la replicación ni en la incompatibilidad. Tales genes pueden codificar propiedades como la resistencia a antibióticos (y por lo tanto, dan lugar a los términos factores de "resistencia" o "R"), la degradación de macromoléculas complejas, la producción de bacteriocinas, la resistencia a diversos metales pesados, la síntesis de antibióticos o factores de virulencia necesarios para la infección de huéspedes animales o vegetales.

[0092] Otra segunda propiedad común es la capacidad de estimular la transferencia del plásmido mismo de una célula a otra, denominada capacidad conjugativa. La conjugación es una transferencia unidireccional de información genética entre células por contacto de célula a célula. Como tal, no está restringida a los plásmidos, sino que puede tener lugar con cualquier ADN, siempre que los elementos críticos estén presentes en la célula. Este requerimiento del contacto celular distingue la conjugación de la transducción y la transformación. El término "unidireccional" se refiere al hecho de que se transfiere una copia del plásmido de una célula denominada el "donante" a otra célula denominada el "receptor". Existen dos funciones distintas implicadas en la capacidad conjugativa: la primera es un sitio de iniciación de la transferencia, denominado *oriT* o *mob*. El primero es un término nemotécnico para "origen de transferencia" y el segundo es la abreviatura (en inglés) de "movilidad". En cada caso, se refieren a un sitio en el ADN y no a un producto difusible. Un segundo grupo de funciones las proporcionan proteínas que actúan en estos sitios y hacen que tenga lugar la serie de funciones necesarias para la movilización. Estas están codificadas por los genes *tra* y tienen diversas funciones incluida la formación del pelo sexual que establece el contacto con la célula receptora y parece estar implicado en juntar las células donante y receptora. Esto da lugar a una región de contacto entre membranas y parece ser que se forma un puente conjugativo de algún tipo. Los productos de los genes *tra* están implicados en la regulación y en la construcción física de estos eventos. Algún evento en esta secuencia desencadena el corte de un sitio, denominado *oriT*, por una nucleasa monocatenaria específica y la posterior unión de una o más proteínas "piloto" al extremo 5' libre del ADN. Estas proteínas parecen funcionar en la posterior replicación del ADN transferido con una de ellas actuando como "primasa". Entonces se transfiere una hebra sencilla al receptor a partir de este extremo mientras se produce una forma de replicación de "círculo rodante" en el donante. Si el ADN que se transfiere es un plásmido, se hace bicatenario y se circulariza en el receptor, después de lo cual presumiblemente puede replicarse. Si el ADN transferido es cromosómico, no puede producirse la circularización, pero de alguna manera se genera una hebra complementaria y puede producirse recombinación homóloga con el cromosoma (en cualquier caso, el ADN entrante se asocia a un replicón si ha de heredarse). Puede ser que un plásmido no sea conjugativo pero movilizable (si los productos *tra* son suministrados por otro plásmido) siempre que el plásmido contenga codificado un sitio *oriT* (cualquiera que contenga el sitio *oriT* se transfiere). Finalmente, un plásmido que carezca de las funciones *tra* y las funciones *oriT* no será conjugativo ni movilizable. Muchas aplicaciones en genética inversa emplean pequeños plásmidos que contienen regiones *oriT*, donde las funciones *tra* son suministradas por otro plásmido en la célula.

[0093] A menudo, los plásmidos tienen mecanismos que aumentan la probabilidad de que, después de la división, ambas células hijas contengan una copia de dicho plásmido. Las funciones de partición (a menudo denominadas *par*) son responsables de esta tarea por una diversidad de mecanismos que incluyen la monomerización de multímeros plasmídicos (es mejor tener muchos monómeros que unos pocos multímeros) y la asociación del plásmido con membranas (que aparentemente ayuda a la separación física de los plásmidos). Aunque se hace referencia a un plásmido como "perdido" por una célula, el verdadero mecanismo es casi con seguridad que la célula nunca recibió el plásmido en la división celular previa, debido a una partición inapropiada. Una pérdida tal se denomina segregación. Tanto para los plásmidos de bajo como de alto número de copias, esta "pérdida" se produce con una frecuencia (muy aproximada) del 1 %, aunque se han encontrado plásmidos excepcionalmente estables, presumiblemente debido a un conjunto de funciones *par* diferentes. Algunos plásmidos han desarrollado un sistema que tiene el mismo efecto que los sistemas *par* y que "evita" la segregación destruyendo cualquier célula hija que no ha recibido el plásmido. Esto lo llevan a cabo produciendo una función destructiva de larga duración (*kil*) y una función que contrarresta la destrucción de corta duración (*kor*). Una célula hija sin el plásmido tendrá el producto *kil*, pero no será capaz de mantener la cantidad necesaria del producto *kor* para sobrevivir. Para el experimentador, estos sistemas parecerán sistemas de partición, ya que, en mutantes que carecen de estos, los segregantes sin plásmidos se detectarán con mayor frecuencia. También pueden parecer funciones *inc*.

[0094] Ocasionalmente, es necesario aislar un derivado que no contenga dicho plásmido de una cepa que actualmente contiene un plásmido, un procedimiento que se denomina curado. Estos derivados pueden obtenerse (i) espontáneamente (quizás en réplicas por impresión de las colonias aisladas si el plásmido confiere un fenotipo detectable); (ii) a consecuencia de un enriquecimiento (de nuevo, si el plásmido confiere un fenotipo de crecimiento); (iii) por selección de un plásmido diferente pero incompatible en la célula; o (iv) por tratamiento con temperatura elevada o sustancias químicas como acridinas, bromuro de etidio, dodecilsulfato de sodio y novobiocina (dado que las dos primeras sustancias químicas son conocidos mutágenos, deberán usarse limitadamente). Se proporciona una forma de "curado" por eliminación de aquellas células que contienen el plásmido que confiere sensibilidad a la unión de fagos o infección por los mismos.

[0095] El factor F es el más estudiado de los grupos de incompatibilidad que tienen la propiedad de la capacidad de conjugación. En su estado extracromosómico, el factor tiene un peso molecular de aproximadamente

62 kb y codifica al menos 20 genes *tra*. También contiene tres copias de IS3, una copia de IS2 y una copia de una secuencia A, así como genes de incompatibilidad y replicación. El factor F puede existir en tres estados diferentes: "F+" se refiere a un factor en un estado autónomo extracromosómico que contiene solo la información genética descrita anteriormente. El estado "Hfr" (que se refiere a "alta frecuencia de recombinación") describe la situación cuando el factor se ha integrado en el cromosoma, presumiblemente debido a sus diversas secuencias de inserción. Finalmente, el estado "F'" o estado (F prima) se refiere al factor cuando existe como elemento extracromosómico pero con el requerimiento adicional de que contiene alguna sección del ADN cromosómico unida covalentemente al mismo. Una cepa que no contiene ningún factor F se denomina "F-".

10 **[0096]** Al aparear una cepa F+ con una cepa F-, se observa una rápida y eficiente transferencia de F+ (aproximadamente un 50 % de transferencia en una hora), pero la transferencia cromosómica solo tiene lugar en el orden de 10^{-5} a 10^{-7} por célula donante. Probablemente, esto es debido a la rara formación espontánea de Hfr. Según se menciona anteriormente, las formas Hfr surgen por integración en el cromosoma debido a las secuencias de inserción del plásmido. Estas parecen causar la integración en sitios preferidos, de manera que se encuentra una diversidad de Hfr diferentes que difieren con respecto a sus orígenes de transferencia y dirección de transferencia. Cuando se realiza un cruzamiento entre una cepa Hfr y una cepa F-, se observa la transferencia de marcadores cromosómicos con alta frecuencia (10^{-2} a 10^{-5}). Esta transferencia está orientada y depende del tiempo. Dado que la transferencia comienza en el sitio *oriT* del factor F, una porción del factor F se transfiere en primer lugar, seguida del resto del cromosoma. Si se transfiere todo el cromosoma, se transferirá la otra porción del factor F. El factor F mismo no se integra en el receptor, ya que no hay homología para tal integración, pero el ADN cromosómico transferido puede integrarse por recombinación homóloga. La transferencia de la totalidad del cromosoma de *E. coli* lleva aproximadamente 100 minutos, pero con gran frecuencia se produce la separación espontánea de la pareja de apareamiento. Tal separación significa que los marcadores que se transfieren tardíamente a menudo no se transfieren en absoluto y se obtiene un gradiente de transferencia que tiende a ser del orden de 10^3 (es decir, los marcadores tempranos se transfieren aproximadamente 10^3 veces más frecuentemente que los marcadores más distales). El resultado neto es que frecuentemente no se consigue transferir todo el cromosoma. En cruzamientos entre una cepa F' y una cepa F-, pueden producirse dos eventos de donación posibles, dependiendo del genotipo del donante. Si la cepa donante es Rec-, el plásmido se mantendrá como elemento extracromosómico en el donante y será la única información genética transferida en la conjugación. Sin embargo, si la célula donante es Rec+, parte de F' se integrará por recombinación homóloga en el cromosoma del donante, que entonces actuará como Hfr. Típicamente, por esta razón se emplean donantes Rec para tales análisis.

35 **[0097]** Una "limitación" de los factores F clásicos es que su uso se restringe generalmente a *E. coli* y especies muy próximas. En estos organismos, los plásmidos F' son plásmidos conjugativos de gran tamaño y bajo número de copias capaces de movilización cromosómica, pero su tamaño es demasiado grande para manejarlos físicamente con facilidad. Para su uso en los procedimientos descritos, se crearán nuevas variantes, por ejemplo, versiones diseñadas, o se optimizarán en cuanto a su eficiencia de transferencia, expresión o sensibilidad al fago empleado. Algunas nuevas variantes preferidas son de menor tamaño, por ejemplo, comprenden menos nucleótidos que los factores F naturales. Otras nuevas variantes de los factores F clásicos proporcionan mayor ligamiento, por ejemplo, entre un origen de replicación y un ácido nucleico que codifica un receptor para tectivirus.

45 **[0098]** Algunos plásmidos de una diversidad de otros grupos de incompatibilidad, con una amplia gama de propiedades, han sido útiles en el análisis genético. Los aislados naturales varían en el número de copias (desde aproximadamente una por célula a cientos de copias), tamaño (varias kb a cientos de kb), estabilidad, capacidad conjugativa, espectro de huéspedes y resistencia a fármacos. Además, dado que muchas de estas propiedades son producto de uno o un pequeño conjunto de genes, se ha diseñado una amplia gama de plásmidos para obtener un conjunto específico de propiedades útiles, incluida una serie de sitios de clonación únicos para la manipulación *in vitro*. Los manuales especializados describen las posibilidades generales y en la bibliografía se describen continuamente nuevas versiones.

50 **[0099]** El término "sistema de formación de parejas de apareamiento" es aplicable a los plásmidos para conjugación, junto con otros sistemas que permiten la transferencia eficaz de ADN, por ejemplo, por transducción o transformación. Véanse, por ejemplo, Schröder y Lankab (2005) "The mating pair formation system of conjugative plasmids - A versatile secretion machinery for transfer of proteins and DNA", Plasmid 54: 1-25; Dale y Park (2004) Molecular Genetics of Bacteria (4.ª edición), Wiley, ISBN-10: 047085085X, ISBN-13: 978-0470850855; Brooks (2007) Medical Microbiology (24.ª edición), McGraw-Hill Medical, ISBN-10: 0071476660, ISBN-13: 978-0071476669; Demuch y Lamont (eds., 2006) Bacterial Cell-to-Cell Communication: Role in Virulence and Pathogenesis (Advances in Molecular and Cellular Microbiology), Cambridge University Press, ISBN-10: 0521846382, ISBN-13: 978-0521846387; Phillips (ed., 2004) Plasmid Biology, ASM Press; ISBN-10: 1555812651, ISBN-13: 978-1555812652;

Thomas (2000) Horizontal Gene Pool: Bacterial Plasmids and Gene Spread, CRC Press, ISBN-10: 9057024624, ISBN-13: 978-9057024627; y otros libros de texto de microbiología o bacteriología.

[0100] En el contexto de un mecanismo de conjugación, las células pueden convertirse de F- a F+ en la población. Como los plásmidos contienen frecuentemente marcadores de resistencia, la selección en el contexto de un antibiótico asegurará la predominancia del plásmido que contiene el fenotipo. En caso de que el plásmido codifique también el receptor para un fago, la asociación del marcador de resistencia con el marcador de sensibilidad al fago hace que la combinación del antibiótico con la exposición al fago disminuya significativamente la población bacteriana, de manera suficiente para que el sistema inmunitario u otro sistema de eliminación bacteriana del huésped minimice la población. En muchos casos, la combinación puede funcionar de forma sinérgica, de modo que cantidades por debajo del umbral del antibiótico y el fago pueden controlar eficazmente la infección. Además, los tratamientos temporales con el fago y el antibiótico pueden ser coincidentes o separados.

V. Fago de amplio espectro de huéspedes; género Tectiviridae

[0101] El dogma clásico de los fagos establece que la unión y la infección son procesos con un espectro de huéspedes muy limitado y que la mayoría de los fagos carecen de la capacidad de unirse a una multiplicidad de huéspedes diferentes y/o de replicarse en ellos. La descripción de la familia de fagos Tectiviridae sugiere que la naturaleza especial del amplio espectro de huéspedes es inusual. Los mecanismos específicos del limitado espectro de huéspedes pueden ser debidos a una observación selectiva y a la combinación de una interacción típicamente de alta especialización de las funciones de unión, infección, replicación y lisis de la célula huésped.

[0102] Por el contrario, el reconocimiento del valor potencial de los fagos de amplio espectro de huéspedes significa que puede llevarse a cabo la selección del carácter de amplia selectividad. Partiendo de un fago con un espectro de huéspedes relativamente amplio, pueden aplicarse procedimientos de selección para ampliar su especificidad de huésped. Puede llevarse a cabo una mutagénesis de los componentes de especificidad de huésped del fago, por ejemplo, las proteínas de unión específica en los extremos de las fibras de la cola. Los genes que confieren especificidad de unión pueden identificarse por medios genéticos estándar para determinar qué proteínas del fago están implicadas. Por ejemplo, en el fago PRD1, se ha identificado la proteína P2 como el principal receptor para la célula diana. Los estudios combinados del receptor del fago y la proteína del huésped permitirán ampliar el espectro de unión y el análisis bioinformático puede identificar también otras especies que expresen receptores de fagos similares. El análisis estructural de la interacción receptor-proteína de unión permitirá la mutagénesis o el diseño de receptores diana que serán reconocidos por proteínas de unión menos selectivas.

[0103] Además de la especificidad de unión, parte de la limitación del espectro de huéspedes puede estar relacionada con las etapas posteriores de la infección por el fago después de la unión. Por lo tanto, las funciones de infección, replicación y lisis se modificarán para que una mayor promiscuidad tenga lugar con éxito en un espectro más amplio de cepas huésped. Alternativamente, una regulación restrictiva de estas funciones puede atenuarse por procesos de mutagénesis y selección.

[0104] En particular, será deseable encontrar medios para que la función restrictiva cruce la línea divisoria entre bacterias gramnegativas y grampositivas, la cual refleja las diferencias estructurales entre las estructuras de la pared celular externa. En particular, la estructura de la pared celular de las bacterias grampositivas es aparentemente similar a la estructura de la pared celular interna de las bacterias gramnegativas. Como tales, los elementos estructurales comunes de los huéspedes dentro de las bacterias gramnegativas serán sensibles a los fagos que puedan alcanzar dichas estructuras. Por lo tanto, puede ser útil combinar o modificar los fagos para incorporar medios para digerir las regiones locales de la pared celular externa de las cepas gramnegativas. Las actividades enzimáticas para ello estarán presentes en los fagos normales que ataquen a las bacterias gramnegativas desde fuera de la pared celular externa. Véase Padmanabhan y col. "Phage Derived Antimicrobial Activities", documento WO/2007/130655. Ya sea que la actividad enzimática esté asociada al fago o se administre separadamente, la digestión de la pared celular externa puede proporcionar accesibilidad para que el fago entre en contacto con la membrana celular interna.

[0105] Debe señalarse que, en ciertas circunstancias, la célula huésped puede quedar incapacitada a pesar de una infección abortiva. El proceso de infección puede fracasar por fallo de las funciones de replicación o de lisis mientras que el proceso infeccioso de inyección de ADN puede por sí mismo incapacitar y destruir la célula sin que se produzcan más fagos. En ciertas circunstancias, esto consigue el resultado deseado de prevenir el crecimiento adicional o las funciones de virulencia de la célula bacteriana huésped, o de que esta sirva como reservorio para un plásmido que le confiera sensibilidad a un fago y/o resistencia a antibióticos a dicha célula bacteriana.

[0106] Los virus de amplio espectro de huéspedes que no son tectivirus también serán útiles de una manera similar. Otros fagos, cuyos receptores puedan asociarse con plásmidos que codifican factores de virulencia o resistencia pueden ser de utilidad. Será especialmente útil generar plásmidos en los que se ligan los marcadores de selección relevantes, ya sean de resistencia a antibióticos o virulencia, con los componentes del receptor para un bacteriófago apropiado. Véase, por ejemplo, Gaidelyte y col. (2006) J. Bact. 188: 5925-5934.

[0107] En otras realizaciones relacionadas, pueden diseñarse o crearse receptores promiscuos (por ejemplo, de un espectro de fagos más amplio) o múltiples receptores estrechamente relacionados a los que puedan unirse fagos relacionados de fuentes diferentes. Puede construirse un fago "universal" que pueda unirse a muchas bacterias huésped diferentes. Un mecanismo infectivo aplicable a muchos huéspedes bacterianos diferentes puede combinarse con la función de unión o reconocimiento provista inicialmente.

[0108] En una realización alternativa, donde el elemento movilizable transfiere un marcador diferente que puede usarse para marcar las células diana receptoras, el marcador puede ser, por ejemplo, un receptor para una fracción diana o un elemento de reconocimiento para la destrucción de la célula que lo expresa. Por ejemplo, el receptor puede ser un receptor de alta afinidad para una entidad tóxica, como un conjugado tóxico, o puede ser un receptor para otro sistema de destrucción, por ejemplo, fagocitosis por macrófagos o componentes inmunitarios.

VI. Construcciones de elementos movilizables artificiales; plásmidos con genes de receptores

[0109] En muchos casos, los procedimientos de la presente invención pueden llevarse a cabo más eficazmente generando construcciones artificiales en lugar de usar aislados naturales para conseguir los resultados. Por ejemplo, pueden construirse versiones especiales que mejoren aislados naturales de plásmidos o fagos. Es posible incorporar modificaciones en marcadores de resistencia o virulencia. Pueden usarse formas variantes diseñadas de los marcadores de evolución natural, por ejemplo, para contrarrestar antibióticos de uso terapéutico, con el fin de proporcionar una mayor selectividad por resistencia a un medio selectivo relacionado alternativo. Un antibiótico diferente, por ejemplo, un compuesto relacionado, puede usarse para seleccionar los plásmidos que codifiquen el marcador variante, el cual puede estar más estrechamente ligado a uno o más receptores deseados para su expresión. La población de bacterias puede someterse al marcador de selección alternativo para seleccionar más intensamente la versión deseada del elemento movilizable que proporcione una mejor eficiencia en la destrucción del huésped con el fago de amplio espectro de huéspedes. Alternativamente, el marcador variante puede ligarse a un receptor de mayor nivel de expresión o a un receptor que presente mayor afinidad o eficiencia en la destrucción del huésped por el fago correspondiente. Puede construirse un fago que muestre una mejor eficiencia o características de destrucción de los huéspedes que expresen los receptores definidos.

[0110] En otras realizaciones, el elemento movilizable puede diseñarse para que tenga características ventajosas para los procedimientos descritos. Los plásmidos pueden diseñarse para presentar, por ejemplo, mayor eficiencia de transferencia a nuevos huéspedes, mejor expresión en los huéspedes, mejores propiedades receptoras, cambios en la eficiencia de la metilación de ADN conducentes a cambios de los niveles de expresión de los ácidos nucleicos codificados, eliminación de tamaños o estructuras de plásmidos superfluos, características de seguimiento adicionales y similares. Los fagos o los elementos movilizables pueden diseñarse para funcionar más eficientemente en las condiciones de uso, por ejemplo, en condiciones de uso químicas o físicas. Las formulaciones de los materiales también pueden diseñarse para el entorno de uso específico, ya sea tóxico, superficial, en mucosas, disolución, etc.

[0111] Existen medios para diseñar o identificar receptores de espectro más amplio reconocidos por diferentes fagos. Por lo tanto, pueden examinarse sistemáticamente o seleccionarse receptores con respecto a muchos fagos tectivirus diferentes o similares. Las variantes seleccionadas o naturales pueden examinarse sistemáticamente e identificarse. Una afinidad o selectividad modificadas serán importantes en los usos apropiados. En otras situaciones, pueden aplicarse medios para cambiar las características de un receptor dado, por ejemplo, cambiando el entorno físico mediante la sal, el pH o la polaridad, y estos pueden causar cambios conformacionales que afectan a la función de las interacciones ligando-receptor. Véase la descripción de los fagos dependientes de plásmidos y los plásmidos correspondientes anteriormente.

[0112] En ciertas situaciones, puede ser útil identificar sistemas que funcionen en condiciones ambientales extremas en relación con las condiciones normales de laboratorio. La selección de sistemas que funcionan a bajas o altas temperaturas, por ejemplo, la expresión eficiente de pelos sexuales, permiten una transferencia más eficiente a una amplia población en condiciones ambientales extremas, en relación con las condiciones de laboratorio. La temperatura ambiente o las temperaturas del entorno pueden ser a las que se aplican los procedimientos para

remediación ambiental.

[0113] Además, las funciones de los fagos deseadas pueden alcanzarse frecuentemente usando fagos que no estén intactos. Los fragmentos o partes de fagos, por ejemplo, pirocinas, colas, enzimas, pueden sustituir a los tectivirus intactos para afectar eficazmente a las funciones genéticas. Las funciones de los elementos movilizables pueden ser afectadas por la degradación indirecta de los ácidos nucleicos que tiene lugar cuando se rompen las células.

VII. Aplicaciones prácticas

10

[0114] Las aplicaciones prácticas de la presente invención incluyen, por ejemplo, tratamiento sanitario de aguas y residuos públicos, tratamiento de bacterias en ámbitos hospitalarios, procesamiento de alimentos, eliminación terapéutica o ambiental de plásmidos codificantes de resistencias o virulencia, higienización eficaz o evaluación/detección de infecciones y presión selectiva para la adquisición de un plásmido seguida de una etapa para destruir las células que contienen el plásmido. Otras aplicaciones de la reducción de las especies bacterianas con plásmidos pueden llevarse a cabo en instalaciones para animales, por ejemplo, sobre las superficies adecuadas de los edificios y equipos, en las que no es deseable la presencia de bacterias perjudiciales. Además, los procedimientos pueden aplicarse a animales de granja, por ejemplo (ganado bovino lechero y de carne, cerdos, pollos, peces, gambas y similares), una aplicación para reducir la presencia general de bacterias que contienen elementos plasmídicos no deseables.

[0115] Una aplicación importante es el tratamiento de artículos que pueden contaminarse en el uso normal, por ejemplo, catéteres, sistemas de monitorización hospitalarios, instrumentos clínicos y equipos. Los emplazamientos, equipos, entornos o similares en los que las bacterias diana pueden representar un peligro para la salud pública pueden tratarse usando los procedimientos y composiciones proporcionados. Los emplazamientos de interés incluyen instalaciones públicas, especialmente de salud pública, en las que existe el propósito u oportunidad del manejo de materiales que contienen las bacterias diana, especialmente aquellas con los marcadores de virulencia o resistencia a antibióticos. Estos materiales pueden incluir productos de desecho, por ejemplo, líquidos, sólidos o aire. Las superficies que tocan muchas personas son importantes, incluidos los tiradores de las puertas, los grifos, los botones de los ascensores, etc.

[0116] Las plantas de tratamiento de residuos acuosos pueden incorporar estos procedimientos para eliminar el huésped diana o el elemento movilizable del efluente. Los sitios de residuos sólidos pueden introducir estos procedimientos para minimizar la posibilidad de brotes de infecciones o la liberación del elemento movilizable que podría transmitir sus genes a lugares indebidos. A la inversa, las áreas o los equipos de preparación de alimentos necesitan limpiarse regularmente y la invención proporciona composiciones y medios para eliminar eficazmente las bacterias diana, especialmente las más peligrosas que contienen los elementos movilizables. Los entornos médicos y otros entornos públicos sometidos a contaminación pueden justificar medios similares para minimizar el crecimiento y la diseminación de los microorganismos diana y la transferencia de elementos movilizables seleccionados. Los procedimientos pueden usarse en contextos en los que se desea la eliminación de las bacterias diana por esterilización, incluidos los sistemas de filtración de aire, por ejemplo, para unidades de cuidados intensivos o entornos de circulación limitada como aviones, submarinos, etc.

[0117] Algunas aplicaciones alternativas incluyen el uso en un contexto veterinario o médico. Los medios para determinar la presencia de bacterias concretas o para identificar dianas específicas permiten identificar fuentes adicionales para el uso de estas técnicas. La inclusión de actividades bactericidas o bacteriostáticas en los agentes de limpieza, incluida la limpieza de animales y mascotas, puede aplicarse en combinación con estas técnicas.

[0118] El fago puede usarse para eliminar huéspedes que contienen los plásmidos que confieren sensibilidad. En condiciones de selección con antibióticos que requieren que los huéspedes contengan el plásmido que tiene el gen de resistencia, los huéspedes también expresarán el receptor para el fago, lo que hará dichas células sensibles a la infección por dicho fago que, por tanto, destruirá las células que contienen el plásmido.

[0119] Los procedimientos de la invención pueden usarse para transferir la sensibilidad a fagos entre especies bacterianas que típicamente no interactúan. Como ejemplo, plásmidos conjugativos que se transfieren entre bacterias que típicamente tienen huéspedes animales, por ejemplo, vertebrados o mamíferos, pueden transferirse a bacterias que típicamente infectan huéspedes diferentes, por ejemplo, invertebrados, como insectos, o plantas. Alternativamente, las bacterias que típicamente infectan huéspedes vegetales o invertebrados pueden usarse como fuente de un plásmido conjugativo para su transferencia a bacterias que típicamente tienen un huésped vertebrado o

animal. Algunas especies ejemplares aptas para esta transferencia son, por ejemplo, bacterias de *Salmonella* y bacterias de *Xanthomonas*. En una realización, un plásmido conjugativo que codifica un receptor para el fago tectivirus PRD1 se transfiere de una célula bacteriana de *S. typhimurium* a una célula bacteriana de *X. campestris*. La transferencia del plásmido conjugativo hace a la célula huésped de *X. campestris* sensible a la infección por el tectivirus y, por lo tanto a su destrucción o a la disminución de su tasa de replicación. El ejemplo 8 en este documento proporciona una demostración de la transferencia de un plásmido conjugativo de una bacteria de *Salmonella* a una bacteria de *Xanthomonas*.

[0120] La metodología puede usarse también para eliminar plásmidos que contienen marcadores de resistencia a antibióticos en la población. Por lo tanto, en ciertos contextos, los procedimientos pueden usarse para reducir la prevalencia de genes de resistencia en una población o cultivo bacterianos definidos. Estos procedimientos pueden combinarse con otros tratamientos, por ejemplo, un tratamiento con procedimientos o composiciones antimicrobianos adicionales o pueden combinarse con compuestos que inducen la formación de pelos sexuales F. Véase, por ejemplo, Hergenrother y col., "Methods of Treating Drug-Resistant Bacterial Infections", publicación de patente de los EE. UU. 20030130169, USSN 10/261.851 y composiciones relacionadas. Las combinaciones pueden administrarse conjunta o sucesivamente.

[0121] Los plásmidos pueden usarse también para conferir sensibilidad a la infección por un fago mediante la transferencia de los genes que codifican receptores a las células que de otro modo carecen del receptor. De esta manera, se proporcionan los medios para convertir huéspedes no sensibles al fago en huéspedes sensibles.

VIII. Administración terapéutica

[0122] Los procedimientos aplicados o la vía de administración y la dosificación varían con la cepa o cepas bacterianas, el sitio y la extensión de la infección (por ejemplo, local o sistémica), el marcador o el receptor que se usan y el sujeto que se trata. Las vías de administración, ya sean para el plásmido o el fago, incluyen, pero no se limitan a: oral, aerosol u otro dispositivo para administración a los pulmones, pulverizador nasal, intravenosa (IV), intramuscular, intraperitoneal, intratecal, intraocular, vaginal, rectal, tópica, punción lumbar, intratecal y administración directa al cerebro y/o las meninges. Los excipientes que pueden usarse como vehículo para la administración del producto terapéutico serán evidentes para los expertos en la materia. Por ejemplo, el plásmido o el fago pueden estar en forma liofilizada y disolverse justo antes de su administración por inyección IV. La dosis de administración que se contempla es del orden de aproximadamente 0,03, 0,1, 0,3, 1, 3, 10, 30, 100, 300, 1.000, 3.000, 10.000 o más moléculas de plásmido por bacteria en la infección del huésped. Dependiendo del tamaño del plásmido, que puede estar asociado entre sí en tándems o en forma de múltiples copias (dímero, trímero, tetrámero, pentámero y similares) o en combinación con una o más entidades, por ejemplo, fragmentos o diferentes adyuvantes, la dosis puede ser de aproximadamente un millón a aproximadamente un billón por kg y día y preferentemente de aproximadamente un billón por kg y día. En las etapas posteriores de la administración del fago, las dosis pueden ser del orden de aproximadamente 0,03, 0,1, 0,3, 1, 3, 10, 30, 100, 300, 1.000, 3.000, 10.000 o más partículas de fago por bacteria en la infección del huésped o de aproximadamente 10^6 unidades destructoras de bacterias por kg y día hasta aproximadamente 10^{13} unidades destructoras por kg y día.

[0123] Los procedimientos para evaluar la capacidad destructora pueden ser similares a los procedimientos usados por los expertos en la materia para evaluar los fagos replicantes intactos, por ejemplo, las unidades formadoras de placas o ufp, aunque las unidades destructoras pueden evaluarse mejor determinando el número de bacterias supervivientes después de la titulación de las unidades destructoras. Sin embargo, la cuantificación de la destrucción es más definida, dado que puede que las partículas de fago que no se replican no formen placas en los tapices de huéspedes bacterianos. Por lo tanto, en lugar de las ufp estándar, se usan convenientemente procedimientos de dilución seriada para evaluar la cantidad de unidades "destructoras". Las diluciones seriadas de cultivos bacterianos expuestos a las composiciones destructoras pueden cuantificar las unidades destructoras. Alternativamente, la comparación de los recuentos de bacterias totales con las unidades de colonias viables puede establecer qué fracción de las bacterias es realmente viable y, por implicación, qué fracción ha sido sensible a las construcciones destructoras. Otras mediciones de la actividad en sustratos artificiales o preparados específicamente pueden usarse a menudo como mediciones sustitutivas de las unidades destructoras.

[0124] El producto o productos terapéuticos se administran o dosifican típicamente hasta conseguir el éxito de la eliminación del plásmido patógeno, aunque pueden usarse formulaciones de amplio espectro mientras se determina el diagnóstico específico de la cepa de infección. Se contemplan formas de dosificación unitaria y formas de dosificación múltiple de las composiciones, así como procedimientos para obtener medios de liberación mantenida para la administración de tales formas de dosificación unitaria y múltiple. Pueden combinarse

formulaciones de liberación retardada de los fagos destructores con la transferencia anterior o inmediata de plásmidos, por ejemplo, sistemas de administración de elementos movilizables.

- [0125]** Con respecto a la administración de aerosoles a los pulmones u otras superficies mucosas, la composición terapéutica se incorpora en la formulación de aerosol específicamente diseñada para su administración. En la técnica se conocen muchos de estos aerosoles y la presente invención no se limita a formulaciones concretas. Un ejemplo de un aerosol tal es el inhalador Proventil fabricado por Schering-Plough, cuyo propulsor contiene tricloromonofluorometano, diclorodifluorometano y ácido oleico. Otras realizaciones incluyen inhaladores que se diseñan para la administración a las vías y los senos nasales de un sujeto o paciente. Las concentraciones de los ingredientes propulsores y emulsionantes se ajustan, en caso necesario, sobre la base de la composición específica que se usa en el tratamiento. El número de unidades destructoras de fagos para administrar por tratamiento de aerosol estarán típicamente en el intervalo de aproximadamente 10^6 a 10^{13} unidades destructoras y preferentemente serán aproximadamente 10^{12} unidades destructoras.
- [0126]** Típicamente, la destrucción disminuirá la capacidad de replicación del huésped en un factor de al menos 3, y puede afectarla en aproximadamente 10, 30, 100, 300, etc., hasta muchos órdenes de magnitud. Sin embargo, incluso la ralentización de la tasa de replicación del huésped sin destruirlo puede tener un valor terapéutico o comercial significativo. Las eficiencias de inactivación genética preferidas pueden ser de 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 8 o más unidades logarítmicas. De manera similar, una reducción de la tasa de aumento o del aumento absoluto de la prevalencia o el número de plásmidos por célula bacteriana huésped pueden ser medidas útiles y preferentemente resultarán en disminuciones de al menos aproximadamente 3, 10, 30, 100 o 300 veces con respecto a la ausencia de tratamiento.

IX. Formulaciones

- [0127]** Se contemplan composiciones farmacéuticas que comprenden un plásmido y/o un fago proporcionados en un excipiente farmacéuticamente aceptable. Por lo tanto, las formulaciones y composiciones farmacéuticas contemplan formulaciones que comprenden un segmento plasmídico aislado capaz de transferirse al huésped bacteriano específico; una mezcla de dos, tres, cinco, diez, veinte o más entidades que afectan a los mismos o típicos huéspedes bacterianos; o un plásmido que codifica dos, tres, cinco, diez, veinte o más receptores que afectan a diferentes huéspedes bacterianos o a diferentes cepas del mismo huésped bacteriano. Puede haber casos en los que sea útil usar un cóctel de mezcla de plásmidos que inhiban colectivamente el crecimiento de múltiples cepas de bacterias, por ejemplo, *Staphylococcus aureus*. De esta manera, las composiciones pueden prepararse a medida de las necesidades del uso deseado. Típicamente, los compuestos o composiciones serán estériles o prácticamente estériles.

- [0128]** En este documento, una "dosis terapéuticamente eficaz" indica una dosis que produce efectos, por ejemplo, bacteriostáticos o preferentemente bactericidas, por los cuales se administra. En el contexto de la eliminación de plásmidos, esta puede medirse en una disminución de la tasa del número o crecimiento entre los miembros de la población bacteriana. La dosis exacta dependerá de la finalidad del tratamiento y podrá ser determinada por un experto en la materia mediante las técnicas conocidas. Véanse, por ejemplo, Ansel y col., *Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery*; Lieberman (1992) *Pharmaceutical Dosage Forms* (volúmenes 1-3), Dekker, ISBN 0824770846, 082476918X, 0824712692, 0824716981; Lloyd (1999) *The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding*; y Pickar (1999) *Dosage Calculations*. Según se sabe en la técnica, pueden ser necesarios ajustes por la degradación del plásmido o el fago, la administración sistémica o localizada y la tasa de transferencia del plásmido, así como la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo, la dieta, el momento de administración, la interacción de fármacos, el espectro de componentes bacterianos en la colonia y la gravedad de la enfermedad, que podrán ser determinados con cierta experimentación por los expertos en la materia.

- [0129]** En la técnica se conocen bien diversos excipientes farmacéuticamente aceptables. Según se usa en este documento, un "excipiente farmacéuticamente aceptable" incluye un material que, cuando se combina con un ingrediente activo de una composición, permite al ingrediente retener su actividad biológica sin causar reacciones perturbadoras del sistema inmunitario del sujeto. Estos pueden incluir estabilizantes, conservantes, complejos o cristales de sal o de azúcar y similares.

- [0130]** Algunos vehículos farmacéuticamente ejemplares incluyen disoluciones, suspensiones y emulsiones acuosas o no acuosas estériles. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a excipientes farmacéuticos estándar como disolución salina tamponada con fosfato, agua, emulsiones tales como emulsión aceite/agua y diversos tipos de agentes humectantes. Algunos ejemplos de disolventes no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, aceites

vegetales como el aceite de oliva y ésteres orgánicos inyectables como el oleato de etilo. Los vehículos acuosos incluyen agua, disoluciones, emulsiones o suspensiones alcohólicas/acuosas, incluidos medios salinos y tamponados. Los vehículos para la vía parenteral incluyen disolución de cloruro de sodio, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro de sodio, disolución de Ringer con lactato o aceites fijos. Los vehículos para la vía intravenosa incluyen disoluciones de reposición de líquidos y nutrientes, disoluciones de reposición de electrolitos (como las basadas en dextrosa de Ringer) y similares. En otras realizaciones, las composiciones se incorporarán en una matriz sólida, incluidas partículas de liberación lenta, perlas de vidrio, vendas, insertos oculares y formas tópicas.

[0131] Una composición que comprende una composición descrita en este documento también puede liofilizarse por medios bien conocidos en la técnica, por ejemplo, para su posterior reconstitución y uso.

[0132] También son de interés formulaciones para administración mediante liposomas y formulaciones que comprenden enzimas microencapsuladas, incluidos cristales de azúcar. Las composiciones que comprenden tales excipientes se formulan por procedimientos convencionales bien conocidos. (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, capítulo 43, 14.^a edición, Mack Publishing Col, Easton PA 18042, EE. UU.). Pueden administrarse formulaciones de liberación retardada para el fago después de la etapa de movilización del plásmido, lo que puede permitir una única etapa de administración combinada.

[0133] En general, las composiciones farmacéuticas pueden prepararse en diversas formas, tales como gránulos, comprimidos, píldoras, supositorios, cápsulas (por ejemplo, adaptadas para la administración por vía oral), microperlas, microesferas, liposomas, suspensiones, bálsamos, lociones y similares. Para preparar las composiciones que comprenden los compuestos terapéuticamente activos, pueden usarse vehículos y/o diluyentes orgánicos o inorgánicos de calidad farmacéutica adecuados para uso por vía oral y tópica. Los diluyentes conocidos en la técnica incluyen medios acuosos, aceites y grasas vegetales y animales. Las formulaciones pueden incorporar agentes estabilizantes, humectantes y emulsionantes, sales para modificar la presión osmótica o tampones para asegurar un pH adecuado.

[0134] La composición farmacéutica puede comprender otros componentes además de la composición activa. Además, las composiciones farmacéuticas pueden comprender más de un principio activo, por ejemplo, dos o más, tres o más, cinco o más o diez o más entidades diferentes, donde los diferentes plásmidos o fagos pueden ser específicos para las mismas bacterias o bacterias diferentes o acompañantes. Por ejemplo, la composición farmacéutica puede contener múltiples plásmidos (por ejemplo, al menos dos o más), donde al menos dos de los plásmidos en la composición tienen diferente especificidad de huésped bacteriano para la transferencia. De esta manera, la composición terapéutica puede adaptarse para el tratamiento de una infección mixta de diferentes bacterias o puede ser una composición seleccionada para ser eficaz contra diversos tipos de infecciones encontradas comúnmente en un entorno institucional concreto. Una combinación selecta puede resultar, por ejemplo, mediante la selección de diferentes grupos de entidades plasmídicas para que contenga al menos un componente eficaz contra bacterias diferentes o críticas (por ejemplo, cepa, especie, etc.) cuya presencia se sospecha en la infección (por ejemplo, en el sitio de infección). Según se señala anteriormente, la composición puede administrarse conjuntamente con otros agentes tales como un agente antimicrobiano convencional. En algunas realizaciones, puede ser deseable administrar el plásmido y el fago en la misma formulación, que puede tener diferentes tasas de liberación de los componentes plasmídico y fágico.

X. Metodología

[0135] Algunos aspectos de la práctica de la presente invención implican procedimientos bien conocidos de microbiología clínica general, procedimientos generales para el manejo de bacteriófagos y fundamentos generales, principios y procedimientos de biotecnología. A continuación, se listan referencias de estos procedimientos.

50 A. Microbiología clínica general

[0136] La microbiología general es el estudio de los microorganismos. Véanse, por ejemplo, Sonenshein y col. (eds., 2002) *Bacillus subtilis* and Its Closest Relatives: From Genes to Cells, Amer. Soc. Microbiol., ISBN: 1555812058; Alexander y Strete (2001) *Microbiology: A Photographic Atlas for the Laboratory*, Benjamin/Cummings, ISBN: 0805327320; Cann (2001) *Principle of Molecular Virology* (libro con CD-ROM; 3.^a edición), ISBN: 0121585336; Garrity (ed., 2005) *Beigey's Manual of Systematic Bacteriology* (2 volumen, 2.^a edición), Plenum, ISBN: 0387950400; Salyers y Whitt (2001) *Bacterial Pathogenesis: A Molecular Approach* (2.^a edición), Amer. Soc. Microbiol., ISBN: 155581171X; Tierno (2001) *The Secret Life of Germs: Observations and Lessons from a Microbe Hunter*, Pocket Star, ISBN: 0743421876; Block (ed., 2000) *Disinfection, Sterilization, and Preservation* (5.^a edición) Lippincott,

- Williams & Wilkins Publ., ISBN: 0683307401; Cullimore (2000) Practical Atlas for Bacterial Identification, Lewis Pub., ISBN: 1566703921; Madigan y col. (2000) Brock Biology of Microorganisms (9.^a edición), Prentice Hall, ASIN: 0130819220; Maier y col. (eds., 2000) Environmental Microbiology, Academic Pr., ISBN: 0124975704; Tortora y col. (2000) Microbiology: An Introduction, con la página de internet Microbiology Place(TM), CD-ROM con tutorial para estudiantes y CD-ROM con ID de bacterias (7.^a edición), Benjamin/Cummings, ISBN 0805375546; Demain y col. (eds., 1999) Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology (2.^a edición), Amer. Soc. Microbiol., ISBN:1555811280; Flint y col. (eds. 1999) Principles of Virology: Molecular Biology, Pathogenesis, and Control, Amer. Soc. Microbiol., ISBN: 1555811272; Murray y col. (ed., 1999) Manual of Clinical Microbiology (7.^a edición), Amer. Soc. Microbiol., ISBN: 1555811264; Burlage y col. (eds., 1998) Techniques in Microbial Ecology, Oxford Univ. Pr., ISBN: 0195092236; Forbes y col. (1998) Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology (10.^a edición), Mosby, ASIN: 0815125356; Schaechter y col. (ed., 1998) Mechanisms of Microbial Disease (3.^a edición), Lippincott, Williams & Wilkins, ISBN: 0683076051; Tomes (1998) The Gospel of Germs: Men, Women, and the Microbe, en American Life, Harvard Univ. Pr., ISBN: 0674357078; Snyder y Champness (1997) Molecular Genetics of Bacteria, Amer. Soc. Microbiol., ISBN: 1555811027; Karlen (1996) MAN AND MICROBES: Disease and Plagues in History and Modern Times, Touchstone Books, ISBN: 0684822709; y Bergey (ed., 1994) Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (9.^a edición), Lippincott, Williams & Wilkins, ISBN: 0683006037.

B. Procedimientos generales para el manejo de bacteriófagos

- 20 **[0137]** Los procedimientos generales para el manejo de bacteriófagos son bien conocidos, véanse, por ejemplo, Snustad y Dean (2002) Genetics Experiments with Bacterial Viruses, Freeman; O'Brien y Aitken (eds., 2002) Antibody Phage Display: Methods and Protocols, Humana; Ring y Blair (eds., 2000) Genetically Engineered Viruses, BIOS Sci. Pub.; Adolf (ed., 1995) Methods in Molecular Genetics: Viral Gene Techniques, volumen 6, Elsevier; Adolf (ed., 1995) Methods in Molecular Genetics: Viral Gene Techniques, volumen 7, Elsevier; y Hoban y Rott (eds., 1988) Molec. Biol. of Bacterial Virus Systems (Current Topics in Microbiology and Immunology, n.º 136), Springer-Verlag.

C. Fundamentos generales, principios y procedimientos de biotecnología

- 30 **[0138]** Los fundamentos generales, principios y procedimientos de la biotecnología se describen, por ejemplo, en Alberts y col. (2002) Molecular Biology of the Cell (4.^a edición), Garland, ISBN: 0815332181; Lodish y col. (1999) Molecular Cell Biology (4.^a edición), Freeman, ISBN: 071673706X; Janeway y col. (eds., 2001) Immunobiology (5.^a edición), Garland, ISBN: 081533642X; Flint y col. (eds., 1999), Principles of Virology: Molecular Biology, Pathogenesis, and Control, Am. Soc. Microbiol., ISBN: 1555811272; Nelson y col. (2000) Lehninger Principles of Biochemistry (3.^a edición), Worth, ISBN: 1572599316; Freshney (2000) Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique (4.^a edición), Wiley-Liss; ISBN: 0471348899; Arias y Stewart (2002) Molecular Principles of Animal Development, Oxford University Press, ISBN: 0198792840; Griffiths y col. (2000) An Introduction to Genetic Analysis (7.^a edición), Freeman, ISBN: 071673771X; Kierszenbaum (2001) Histology and Cell Biology, Mosby, ISBN: 0323016391; Weaver (2001) Molecular Biology (2.^a edición), McGraw-Hill, ISBN: 0072345179; Barker (1998) At the Bench: A Laboratory Navigator, CSH Laboratory, ISBN: 0879695234; Branden y Tooze (1999) Introduction to Protein Structure (2.^a edición), Garland Publishing; ISBN: 0815323050; Sambrook y Russell (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual (volume 3, 3.^a edición), CSH Lab. Press, ISBN: 0879695773; y Scopes (1994) Protein Purification: Principles and Practice (3.^a edición), Springer Verlag, ISBN: 0387940723.

45 D. Regulación transcripcional de la expresión de proteínas

- [0139]** La transcripción es un proceso por el que una secuencia de ADN, por ejemplo, de un vector, es copiada por una polimerasa de ARN para producir un ARN producto, por ejemplo, un ARN mensajero o ARNm. Para la expresión de proteínas o péptidos, la transcripción de ARNm es potencialmente una etapa regulada y por lo tanto, afecta en último término al nivel de expresión de una proteína o péptido recombinante.

- [0140]** La transcripción se inicia por la unión de la polimerasa de ARN a una región promotora en la secuencia de ADN. Un promotor es una región de regulación positiva para la expresión del ADN que está situada delante (en la región 5') del gen que ha de transcribirse. La transcripción también puede regularse de manera negativa, por ejemplo, mediante la unión de una proteína represora a secuencias de ADN represoras, situadas típicamente próximas a las secuencias promotoras.

- [0141]** Para regular la transcripción de proteínas recombinantes, un casete de expresión puede incluir múltiples promotores y también secuencias de regulación negativa, por ejemplo, sitios de unión a proteínas

represoras. De Boer y colaboradores (de Boer y col., PNAS 80: 21-25 (1983)) describen el promotor *tac*, que se considera un promotor fuerte. Hablando en general, se cree que el nivel de expresión del ácido nucleico aumenta al aumentar el número y la fuerza relativa de los promotores. Otros promotores que pueden usarse incluyen el promotor Tac. Otros promotores ejemplares incluyen, por ejemplo, un promotor de T7, un promotor de T5, el promotor P_R, el promotor P_L, el promotor *trp*, el promotor *lac*, el promotor *araB* y el promotor *gal*.

[0142] En algunas realizaciones de la presente invención se diseñan en el vector cualquier número y combinación de los promotores *lac* y *tac*.

10 E. Mutagénesis; de sitios específicos, al azar, *shuffling*

[0143] Sobre la base de las descripciones estructurales y funcionales proporcionadas en este documento, pueden aislarse o generarse homólogos y variantes que pueden optimizar las características preferidas. Por lo tanto, pueden encontrarse segmentos catalíticos adicionales para las funciones de transferencia de plásmidos, expresión de receptores, unión de fagos o destrucción del huésped por homología estructural o por evaluación de entidades encontradas en motivos de organización génica característicos. Los genes del plásmido, del receptor para el fago o del reconocimiento de la célula huésped se encuentran típicamente en disposiciones de genes concretas y otras entidades que se encuentren en las correspondientes disposiciones pueden determinarse mediante evaluación de la información de secuencias disponible, por ejemplo, por medios bioinformáticos. Estas pueden servir también como puntos de partida para el examen sistemático de variantes de estas estructuras, por ejemplo, por mutagénesis de tales estructuras y selección de las que presentan las características deseadas, por ejemplo, una transmisibilidad de plásmidos más amplia, una función receptora de fagos más amplia o una especificidad de dianas huésped más amplia. Pueden usarse procedimientos de mutagénesis estándar. Las tecnologías de *shuffling* de genes o dominios pueden ser aplicables para encontrar variantes apropiadas.

[0144] La compatibilidad de los plásmidos en las células huésped, los segmentos de los receptores de fagos o las funciones de destrucción de los fagos pueden identificarse de manera similar y así pueden identificarse motivos diana prevalentes o específicos para la optimización de los procedimientos descritos. Muchas de estas dianas pueden ser proteínas de alto grado de expresión, estructuras que contienen carbohidratos o lípidos que se encuentran en las diversas cepas diana potenciales. Las estructuras de los pelos sexuales que se encuentran en el exterior de la célula bacteriana pueden ser otras estructuras diana para la unión de proteínas. La mutagénesis puede ampliar la selectividad de unión o aumentar la estabilidad de los segmentos de la totalidad de la construcción, las estrategias de delección pueden eliminar los segmentos superfluos.

[0145] La pared celular de las bacterias grampositivas puede tener componentes en común con la pared celular de las bacterias gramnegativas o, posiblemente, con otras micobacterias y esporas. Sin embargo, en las bacterias gramnegativas puede haber capas de pared adicionales que pueden servir también como barreras adicionales al acceso de los fagos. Otras actividades derivadas de los fagos o de otro origen pueden combinarse para penetrar las estructuras más complejas de la pared celular de las bacterias gramnegativas. En particular, múltiples segmentos catalíticos pueden proporcionar múltiples actividades, que pueden funcionar sinérgicamente, dentro de una única construcción, o pueden proporcionar un efecto sinérgico cuando se combinan con otro producto terapéutico, por ejemplo un antibiótico o una sustancia antimicrobiana.

[0146] Una fracción de direccionamiento puede aumentar la concentración local de un fragmento catalítico, pero un enlazante de la longitud apropiada también puede aumentar localmente el número de eventos de degradación de la pared. Por lo tanto, los enlazantes compatibles con los motivos diana y catalíticos o de la longitud apropiada pueden ser útiles y aumentar la actividad catalítica de penetración que conduce a la estasis o destrucción de las bacterias diana.

[0147] Un experto en la materia reconocerá que pueden hacerse ciertas modificaciones en los dominios catalítico o funcional del polipéptido sin disminuir su actividad biológica. Pueden hacerse algunas modificaciones para facilitar la clonación, expresión o incorporación del dominio catalítico en un polipéptido de fusión. Tales modificaciones son bien conocidas por los expertos en la materia e incluyen, por ejemplo, la adición de codones a cualquiera de los extremos del polinucleótido que codifica el dominio catalítico, por ejemplo, una metionina añadida al extremo amino para proporcionar un sitio de iniciación o aminoácidos adicionales (por ejemplo, poli-His) colocados en cualquiera de los extremos para crear sitios para enzimas de restricción situados convenientemente o codones de terminación o secuencias de purificación.

[0148] Ha de señalarse que, según se usa en este documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas

singulares “un”, “uno/a” y “el/la” incluyen referentes en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por lo tanto, por ejemplo, la referencia a “un bacteriófago” incluye una pluralidad de tales bacteriófagos y la referencia a “una bacteria huésped” incluye la referencia a una o más bacterias huésped y equivalentes de las mismas conocidas por los expertos en la materia, y así sucesivamente.

5

EJEMPLOS

Ejemplo 1: factor de conjugación F

10 [0149] Los parámetros importantes que deben optimizarse para las condiciones de conjugación para un plásmido y un huésped específicos incluyen, por ejemplo, la fase logarítmica de las células donantes y receptoras, la temperatura de incubación para la conjugación y otras condiciones. Por lo tanto, los diversos componentes que pueden afectar a la frecuencia o eficiencia de la conjugación pueden incluir la temperatura y pueden valorarse en el intervalo apropiado. Para un uso terapéutico en animales de sangre caliente, probablemente entre aproximadamente

15 25 y 45 °C, mientras que para situaciones del entorno, el intervalo de temperatura puede ser un intervalo de 20 grados por encima o por debajo de la temperatura ambiente. También pueden optimizarse los aspectos del mezclado, la agitación, la fuerza iónica, la concentración iónica y similares. La optimización se probará para una relación molar entre huéspedes F+ y F- y similares.

20 [0150] En ciertas situaciones, puede ser que la conjugación no requiera de hecho la expresión de pelos sexuales o tales estructuras. La conjugación puede depender de otra biología “relacionada con la conjugación” y puede haber elementos alternativos en el proceso que pueden no ser dependientes de los pelos sexuales. Esto puede investigarse usando la tecnología y los procedimientos actuales.

25 Ejemplo 2: transferencia de plásmidos / conversión de células F- en F+

[0151] La demostración de la conversión de huéspedes F- en huéspedes F+ puede llevarse a cabo usando experimentos de conjugación estándar. Véanse, por ejemplo, Paranchych y Frost (1988) "The Physiology and Biochemistry of Pili", *Advances in Microbial Physiology* 29: 53-114; Low y Porter (1978) "Modes of Gene Transfer and Recombination in Bacteria", *Ann. Rev. Genetics* 12: 249-287; Rowbury (1977) "Bacterial Plasmids with Particular Reference to their Replication and Transfer Properties", *Progress in Biophysics & Molecular Biology* 31: 271-317; Simon y col. (1983) "A Broad Host Range Mobilization System for In Vivo Genetic Engineering: Transposon Mutagenesis in Gram Negative Bacteria", *Nature Biotechnology* 1: 784-791; Clewell y col. (1993) *Bacterial Conjugation*, Plenum Press, New York, ISBN 0-306-44376-7; Grohmann y col. (2003) "Conjugative Plasmid Transfer in Gram-Positive Bacteria", *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 67(2): 277-301. Es posible evaluar las

30 eficiencias, las tasas de transferencia, la optimización de las condiciones para plásmidos y huéspedes concretos y similares.

[0152] Por ejemplo, la metodología puede seguir a lo largo de las líneas de crecimiento un volumen, por ejemplo, de 5 ml de células donantes y receptoras hasta una DO de 0,5-0,7. A partir de estos cultivos, se mezcla un pequeño volumen, por ejemplo, 100 µl, de los cultivos del donante y el receptor. (Controles: 100 µl de células donantes y receptoras solamente). Típicamente, hay un lavado mediante centrifugado y se lava, por ejemplo, dos veces con disolución salina al 0,85 %. El sedimento se resuspende, por ejemplo, en 20 µl de disolución salina y se deposita en una placa de Petri bien seca, por ejemplo, en LB. La placa se deja secar y se incuba durante la noche,

45 por ejemplo, a 30 °C.

[0153] Después del periodo de crecimiento, el cultivo se recoge por raspado y se añade a un medio, por ejemplo, 500 µl de disolución salina, y se agita en vórtex para separar las parejas de apareamiento. La suspensión se siembra en las diluciones apropiadas en las placas de selección respectivas, por ejemplo, placas con dos

50 antibióticos. Alternativamente, pueden usarse marcadores detectables (GFP o similares) para evitar el uso de antibióticos. Típicamente, la conjugación en las colonias apropiadas se confirma, por ejemplo, mediante PCR para detectar la presencia del plásmido conjugativo.

Ejemplo 3: marcador incorporado en el plásmido

55

[0154] Se selecciona un marcador apropiado que preferentemente sea fácil de detectar. Aunque los marcadores de virulencia o resistencia serán generalmente de mayor interés en las realizaciones terapéuticas o de salud pública, los marcadores más fáciles de detectar serán útiles para establecer que la metodología funciona realmente. Por lo tanto, puede usarse un marcador fluorescente, por ejemplo, GFP, para demostrar que el marcador

se transfiere en un nivel detectable y optimizado para el sistema deseado.

[0155] El marcador se amplifica por PCR y se clona en un sitio de restricción adecuado en un plásmido. Pueden determinarse la tasa y las condiciones óptimas para una transferencia eficiente entre los plásmidos y los huéspedes de interés. Estas pueden incluir aspectos del plásmido, las condiciones de transfección, las condiciones de conjugación, la cinética, la temperatura y similares. La evaluación de las tasas de absorción y expresión pueden hacer uso, por ejemplo, de la separación celular activada por fluorescencia o metodologías similares.

Ejemplo 4: selección; eliminación de células que carecen del marcador

10

[0156] Para la selección de las células que han adquirido el plásmido, el uso de un antibiótico u otro marcador seleccionable en el plásmido sería ideal, dado que la siembra de las células en una placa con el antibiótico seleccionará solo aquellas células que hayan adquirido el plásmido. El marcador de selección puede estar ligado al marcador deseado, de modo que, las condiciones de selección preferentemente seleccionarán casi directamente el marcador. Si el marcador puede usarse como diana, por ejemplo, por un fago, las células que hayan sobrevivido a la selección serán sensibles a los procesos de infección por el fago mediados por el receptor

Ejemplo 5: ligamiento del marcador receptor para el fago al marcador de selección

[0157] Los genes que codifican el receptor para el fago y el marcador de selección estarán en el mismo plásmido y preferentemente estrechamente ligados. Pueden incorporarse medios para minimizar la probabilidad de que los genes que codifican el receptor y el marcador puedan separarse fácilmente. Estos marcadores pueden estar estrechamente ligados al origen de replicación del plásmido apropiado.

Ejemplo 6: delección de secuencias superfluas de los factores F

[0158] Pueden aplicarse procedimientos para identificar la región que codifica el receptor en el plásmido que contiene la sensibilidad al fago generando mutantes de delección de genes individuales y comprobando la sensibilidad a tectivirus. Mediante procedimientos de biología molecular, secuenciación y análisis bioinformático y procedimientos de manipulación, pueden identificarse las regiones del plásmido que son necesarias para la transferencia funcional de la sensibilidad al fago.

[0159] Las regiones identificadas pueden evaluarse posteriormente mediante la complementación en *trans* de los productos de los genes mutados y comprobación de la sensibilidad a tectivirus. A continuación, pueden usarse procedimientos para eliminar las porciones superfluas del plásmido para obtener solamente la región que codifica el receptor ligada a los segmentos críticos para la conjugación del plásmido.

Ejemplo 7: diversos marcadores de selección

[0160] Adecuados marcadores de selección para estas estrategias serán β -galactosidasa, luciferasa, GFP, ampicilina, kanamicina, cloranfenicol, tetraciclina, estreptomycin, etc. Los medios de selección o detección son bien conocidos y están fácilmente disponibles.

Ejemplo 8: transferencia de un plásmido conjugativo de una célula bacteriana de *Salmonella* a una célula bacteriana de *Xanthomonas*

45

[0161] Cultivos de 5 ml de la bacteria donante (*S. typhimurium* LT2(pLM2), obtenida del Centro de Referencia para Virus Bacterianos Felix d'Hérelle, Laval, Canadá) y la bacteria receptora (*X. campestris* HER1103, obtenida del Centro de Referencia para Virus Bacterianos Felix d'Hérelle, Laval, Canadá) se incubaron en caldo LB a 37 °C y 30 °C, con agitación a 200 rpm. La DO600 final de los cultivos fue de entre 0,5 y 0,7.

[0162] Cantidades de 100 μ l de los cultivos del donante y el receptor se mezclaron entre sí. También se prepararon muestras de control: 100 μ l de células donantes solamente y 100 μ l de células receptoras solamente. Las células se sedimentaron por centrifugación y se lavaron dos veces con una disolución salina al 0,85 %. Los sedimentos se resuspendieron en 20 μ l de disolución salina y se depositaron sobre una placa bien seca de LB. La placa se dejó secar al aire y después se incubó a 30 °C durante la noche.

[0163] Al día siguiente, los cultivos se recogieron por raspado y se añadieron a 500 μ l de disolución salina. Las parejas de apareamiento se separaron mediante agitación en vórtex. Se añadieron 500 μ l adicionales de

disolución salina. Muestras sin diluir y diluidas serialmente se sembraron en placas con dos antibióticos, es decir, LB con 25 µg/ml de kanamicina y 100 µg/ml de estreptomina. Dado que *S. typhimurium* LT2(pLM20) es resistente a kanamicina y *X. campestris* HER1103 es resistente a estreptomina, solo las células de *X. campestris* HER1103 que hayan recibido el plásmido pLM2 y el gen de resistencia a kanamicina crecen en las placas con los dos antibióticos.

- 5 Se usó PCR para examinar sistemáticamente las bacterias que crecían en las placas con los dos antibióticos por la presencia del plásmido conjugativo. Para este examen sistemático se usaron cebadores oligonucleotídicos específicos del plásmido. Colonias individuales de *X. campestris* transfectadas con el plásmido conjugativo se inocularon en caldo LB que contenía kanamicina y estreptomina y se incubaron a 30 °C con agitación a 200 rpm hasta una DO600 final de 0,5-0,7. Se sembró un tapiz de bacterias en una placa de LB y se depositaron 2 µl del fago PRD1 sobre dicho tapiz bacteriano. Las placas se incubaron a 30 °C durante la noche y al día siguiente se confirmó la presencia de placas víricas, indicativas de la muerte o la reducción del crecimiento de las bacterias que contenían el plásmido después de la infección por el fago PRD1.

Ejemplo 9: emparejamiento de diversos plásmidos con el fago apropiado

- 15 **[0164]** La descripción anterior proporciona exposiciones de tipos ejemplares de fagos dependientes de plásmidos y ejemplos específicos de fagos dentro de esas categorías. Se describen diversas especies diana y algunos de los plásmidos son específicos de especies o algo menos específicos (quizás de agrupamientos de especies relacionadas). Los plásmidos apropiados pueden introducirse en una especie diana, ya sea por
- 20 conjugación u otra metodología, incluida la transformación o la electroporación. Una vez que el plásmido se ha internalizado y se han encontrado las condiciones apropiadas para su expresión, la sensibilidad al fago se comprueba fácilmente por procedimientos estándar. Los ensayos pueden hacerse a menudo en cultivos líquidos o en placa, según sea apropiado para las evaluaciones deseadas. Por lo tanto, el estudio de diversos tipos de plásmidos, por ejemplo, plásmidos IncD con fagos D y otros, pueden confirmarse o examinarse sistemáticamente a
- 25 medida que se describen o prueban nuevos emparejamientos. Las condiciones de cultivo que mejoran la expresión de los receptores deseados o la eficiencia de los efectos de los fagos pueden examinarse sistemáticamente.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento *ex vivo* para producir la muerte de células bacterianas que comprende:
- 5 (a) la exposición de una célula bacteriana donante en un cultivo bacteriano heterogéneo a condiciones en las que un elemento genético movilizable que codifica un componente receptor para un fago puede transferirse de dicha célula donante a una célula receptora que no es sensible a la unión del fago, con lo que dicho elemento movilizable se transfiere a la célula receptora y le confiere a dicha célula receptora sensibilidad a la unión del fago; y
- 10 (b) la administración del fago para infectar las células que expresan el receptor, donde dicha infección resulta en la muerte de las células sensibles.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, donde dicho cultivo bacteriano:
- 15 (a) es un lactobacilo o un cultivo del procesamiento de un producto lácteo;
- (b) está en una instalación de tratamiento de aguas;
- (c) está en un cultivo celular eucariota;
- 20 (d) está en un ámbito hospitalario; o
- (e) está en un ámbito de procesamiento de alimentos.
- 25 3. El procedimiento de la reivindicación 1, donde dicho fago se selecciona del grupo de fagos denominados PRD1, PRR1, PR3, PR4, PR5, L17, PR772, pGIL01, BAM35, GIL16, AP50, NS11 y P37-14.
4. El procedimiento de la reivindicación 1, donde dicho elemento genético movilizable es un plásmido seleccionado de los grupos de incompatibilidad N, P y W.
- 30 5. El procedimiento de la reivindicación 1, donde dicho elemento genético movilizable es un plásmido seleccionado entre F, R386, R1, Col B-K99, Col B-KI66, R124, R62, R64, R483, R391, R46, R724, RP4, RK2, R751, RSF1010, R401, R388 y S-a.
- 35 6. El procedimiento de la reivindicación 1, donde dicho elemento genético movilizable es un plásmido seleccionado de los grupos Inc D, M, X, PI, U, W, C y J.
7. El procedimiento de la reivindicación 1, donde dicha célula donante es de un género seleccionado entre *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Proteus*, *Vibrio*, *Acinetobacter*, *Bacillus* y *Micrococcus*.
- 40 8. El procedimiento de la reivindicación 1, donde dicha célula receptora es de un género seleccionado entre *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Proteus*, *Vibrio*, *Acinetobacter*, *Bacillus* y *Micrococcus*.
9. El procedimiento de la reivindicación 1, donde la expresión del receptor para el fago está dirigida por un promotor heterólogo fuerte que es funcional en la célula receptora.
- 45 10. Un fago para uso en un procedimiento terapéutico para producir la muerte de células bacterianas que comprende:
- 50 (a) la exposición de una célula bacteriana donante en un cultivo bacteriano heterogéneo a condiciones en las que un elemento genético movilizable que codifica un componente receptor para un fago puede transferirse de dicha célula donante a una célula receptora que no es sensible a la unión del fago, con lo que dicho elemento movilizable se transfiere a la célula receptora y le confiere a dicha célula receptora sensibilidad a la unión del fago; y
- 55 (b) la administración del fago para infectar las células que expresan el receptor, donde dicha infección resulta en la muerte de las células sensibles.