

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 559 668**

51 Int. Cl.:

A01N 63/00 (2006.01)

C12N 7/00 (2006.01)

C12Q 1/70 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.09.2002 E 02776032 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.10.2015 EP 1435788**

54 Título: **Bacteriófagos deficientes en lisina, que tienen inmunogenicidad reducida**

30 Prioridad:

27.09.2001 US 325803 P

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

15.02.2016

73 Titular/es:

**GANGAGEN, INC. (100.0%)
3279 EMERSON STREET
PALO ALTO, CA 94306, US**

72 Inventor/es:

**RAMACHANDRAN, JANAKIRAMAN;
PADMANABHAN, SRIRAM y
SRIRAM, BHARATHI**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 559 668 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Bacteriófagos deficientes en lisina, que tienen inmunogenicidad reducida

5 Campo de la invención

La invención se refiere a bacteriófagos, particularmente a bacteriófagos que tienen inmunogenicidad reducida y sus usos.

10 Antecedentes de la invención

Los bacteriófagos son virus altamente específicos, que infectan a las bacterias. Después de infectar a la bacteria como la *E. coli* mediante un fago lítico, tal como el T4, se presenta un reacomodo profundo de toda la síntesis macromolecular. La polimerasa de ARN (RNAP) de la bacteria hospedadora enlaza los sitios de iniciación del genoma del fago conocido como los genes inmediatos, tempranos (IE por sus siglas en inglés) y los transcriben. Algunos de los productos del gen IE degradan al ADN hospedador (bacterial) que carece de la base modificada hidroxil metil citosina (HMC) mientras que el otro producto ADP-Ribosa, enlaza a las subunidades alfa del RNAP bacterial y se vuelve incapaz de reconocer a los promotores celulares bacterianos. Esto resulta en el cese de la transcripción de los genes hospedadores. Estos eventos se presentan en los primeros 3 o 5 minutos después de la infección.

En la siguiente etapa, el RNAP modificado, reconoce y enlaza a los denominados genes tempranos, retrasados (DE), eliminado así a la expresión adicional de los genes IE del fago. Los productos del gen DE se involucran en la replicación del genoma fago usando bases de ADN bacterianas degradadas. Uno de los productos de los genes DE es un nuevo factor sigma que provoca que el RNAP hospedador reconozca solo a los genes (L) tardíos que son los siguientes por transcribirse. Los genes tardíos están involucrados en la síntesis de nuevas proteínas de cápsida, extremos y fibras de extremos y ensamblan a todas las proteínas de montaje que son necesarias para ensamblar las partículas del fago progenitor. Finalmente, el gen de la lisosoma del fago se activa resultando en la lisis de la célula hospedadora bacterial y liberarla del fago progenitor.

En vista de su alto efecto lítico específico, los bacteriófagos que actúan en patógenos infecciosos han sido investigados desde su descubrimiento hasta la fecha debido a su potencial terapéutico. Luego, después su descubrimiento en 1915-17 (D'Herelle. Crit. Rev. Acad. Sci. Paris 165,373 (1917)), los bacteriófagos se usaron ampliamente tanto en los Estados Unidos como en Europa, para el tratamiento de la infección bacteriana. Se han descrito preparaciones de bacteriófagos para el tratamiento de infecciones bacterianas (ver, por ejemplo, la patente norteamericana No. 6,121,036) y en la inhibición de la caries dental (patente norteamericana No. 4,957,686). A pesar de ser altamente exitosa, la terapia con fagos es controversial debido a que carece de un control de calidad, procesos regulatorios y entendimientos inadecuados de la alta especificidad de los fagos para su hospedaje bacterial. La terapia con fagos se abandonó en el mundo occidental después del advenimiento de los antibióticos en los años cuarenta. Sin embargo, en vista de la aparición de antibióticos resistentes en años recientes, existe un interés renovado en el desarrollo de la terapia de fagos para tratar las infecciones (Sulakvelidze *et al.* Antimicrob Agents Chemotherap, 45,649, (2001)).

A pesar de que se reconoce ampliamente la terapia con fagos, existen varios problemas que necesitan ser atendidos antes de que se vuelvan agentes terapéuticos aceptables. Muchos de los problemas encontrados por los investigadores recientes, tales como la eliminación de la bacteria hospedadora y desechos bacterianos a partir de las preparaciones del fago terapéutico, se pueden superar por metodologías modernas que se han desarrollado en las pasadas décadas recientes. Las propiedades básicas de los fagos como la depuración rápida por el bazo, hígado y sistema retículo-endotelial, y el potencial para el desarrollo de anticuerpos en el hospedador humano durante el tratamiento sin embargo, requiere de soluciones novedosas si la terapia de fagos se convierte generalmente aplicable. Un método para atender el primer problema, nominalmente la depuración rápida, se describe por Merrill *et al* (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 3188 (1996); ver también patente de E.U.A No. 5,688,501) que involucra la selección de variantes de larga circulación de los fagos de tipo silvestre por el paso en serie en los animales.

La generación de anticuerpos neutralizantes después de la administración de los fagos a los humanos y animales, es una de las principales preocupaciones que obstaculizan el desarrollo de la terapia de fagos, especialmente para infecciones crónicas. Se ha reportado que los anticuerpos neutralizantes aparecen una cuantas semanas después de la administración de los fagos a los humanos o animales (Slopek *et al.* Arch. Immunol. Ther. Exp., 35, 553 (1987). La administración de dosis superiores de fagos se ha sugerido como una solución posible (Carlton, R. M., Arch. Immunol. Ther. Exp., 47, 267 (1999); sin embargo, esta no es la más atractiva de las alternativas. Por ejemplo, un método de alta dosificación requiere la producción de un número mucho mayor de fagos por cada dosis al ser administrada.

Muchos estudios de fagos potencialmente terapéuticos a la fecha, se han focalizado en el punto final lítico que libera el fago de la progenie que puede invadir a otros hospedadores bacterianos y destruirlos. Esta amplificación suministrada por la lisis del hospedador bacterial, es una característica atractiva de la terapia de fagos, ya que

facilita la producción de más fagos y el exterminio de bacterias infecciosas. Sin embargo, la amplificación de fagos y la liberación a través de la lisis también expone al sujeto que está en tratamiento a un bolo del bacteriófago. Esto plantea el riesgo de que el hospedador generará una respuesta inmune al fago, cuya respuesta inmune puede ser indeseable, facilita la depuración del fago o ambos.

5 Durante la década anterior, se han investigado los componentes claves esenciales para la lisis de hospedador por bacteriófagos. Se reconoce ahora que dos proteínas, una endolisina y una holina, son necesarias para que suceda la lisis del hospedador. Las endolisinas son enzimas muralíticas que se acumulan en el citosol, y las holinas son proteínas de membrana pequeñas que regulan el acceso de las endolisinas a la pared celular a través de la membrana citoplásmica (Wang *et al.* Ann. Rev. Microbiol. 54, 799-825 (2000)). La región de gen de lisis del bacteriófago lambda se clona en un plásmido multi-copia, pBH 20 bajo el control transcripcional del operador lac y la inducción de este "operón de lisis" conduce a un comportamiento lítico paralelo con aquel de las células infectadas por bacteriófagos (Garrett, J. *et al.* Mol. Gen. Genet. 182, 326 (1981)). Los dos genes de lisis *cph1* y *cpl1* del bacteriófago de *Streptococcal pneumoniae* Cp-1, que codifica la holina y la lisina respectivamente, se han clonado y expresado en *E. coli* (Martin *et al.* J. Bacteriol. 180, 210 (1998)). La expresión de la holina Cph1 resulta en una muerte celular bacteriana pero no en la lisis. La expresión concomitante de la holina y la lisina del fago Cp-1 en *E. coli* resulta en una lisis celular. Además, el gen *cph1* puede complementar una mutación lambda Sam (que lleva una mutación ámbar en el gen de holina) en la cepa no supresora *E. coli* HB101 para liberar la progenie de fagos. La expresión regulada de los genes S y R de la lisis de fagos lambda provoca una lisis dramática de las células de serovar Typhimurium del *Vibrio cholerae* y la *Salmonella enterica* (Jain *et al.* Infect Immun, 68.986 (2000)).

Existe una necesidad en el campo para métodos y composiciones que suministren un bacteriófago terapéutico que tenga inmunogenicidad reducida, y reduzca así la depuración en el hospedador. La presente invención atiende esta necesidad.

25 Sumario de la invención

La presente invención se expone en las reivindicaciones.

30 La presente invención caracteriza un bacteriófago terapéutico deficiente en la proteína de lisina (fago "Lys menos"). El bacteriófago defectuoso en lisis tiene un gen *lisina* suprimido o inactivado o gen *holina* suprimido o inactivado. El bacteriófago Lys menos es incapaz de facilitar la lisis eficiente del hospedador bacteriano ya que la actividad enzimática de la lisina del fago se necesita para romper la capa de péptidoglicano de la pared celular bacteriana. El bacteriófago Lys menos retiene la actividad en la invasión de su hospedador bacteriano adecuado, la destrucción del genoma bacteriano y la replicación, que son suficientes para inhibir el crecimiento y replicación bacterianos. Por lo tanto, el fago terapéutico Lys menos, detiene la distribución de la infección por un patógeno bacteriano sin la lisis de la bacteria. Este método es atractivo ya que también evita la liberación de la progenie del fago, reduciendo o eliminando así el potencial para la generación de respuestas inmunes contra el fago. El patógeno bacteriano incapacitado luego se separa por sistemas de defensa normales tales como fagocitos y macrófagos.

40 En un aspecto la invención se refiere a métodos para el tratamiento de una infección bacteriana en un sujeto infectado, el método comprende la administración al sujeto de un bacteriófago Lys menos específico para una bacteria infecciosa presente en el sujeto infectado, en donde el bacteriófago se administra en una cantidad efectiva para inhibir la replicación de las bacterias infecciosas, y para facilitar una reducción en la carga bacteriana. Las bacterias infecciosas pueden ser bacterias resistentes a fármacos. La infección bacteriana puede ser sistémica. Las bacterias infecciosas pueden ser de un género del grupo que consiste de *Mycobacteria*, *Staphylococci*, *Vibrio*, *Enterobacter*, *Enterococcus*, *Escherichia*, *Haemophilus*, *Neisseria*, *Pseudomonas*, *Shigella*, *Serratia*, *Salmonella*, *Streptococcus*, *Klebsiella* y *Yersinia* y en donde el bacteriófago inhibe el crecimiento de las bacterias infecciosas. Las bacterias infecciosas son bacterias patógenas.

50 En otro aspecto, la invención se refiere a un método para inhibir el crecimiento de bacterias en un sujeto infectado, el método comprende la administración al sujeto de un bacteriófago Lys menos específico para una bacteria infecciosa presente en el sujeto infectado, en donde el bacteriófago se administra en una cantidad efectiva para inhibir el crecimiento de las bacterias infecciosas. Las bacterias infecciosas pueden ser bacterias resistentes a fármacos. La infección bacteriana puede ser sistémica. Las bacterias infecciosas pueden ser de un género seleccionado del grupo que consiste de *Mycobacteria*, *Staphylococci*, *Vibrio*, *Enterobacter*, *Enterococcus*, *Escherichia*, *Haemophilus*, *Neisseria*, *Pseudomonas*, *Shigella*, *Serratia*, *Salmonella*, *Streptococcus*, *Klebsiella* y *Yersinia*, y en donde el bacteriófago inhibe el crecimiento de las bacterias infecciosas. La infección puede implicar una mezcla de al menos dos hospedadores bacterianos diferentes y al menos dos bacteriófagos diferentes Lys menos de una especificación diferente de células hospedadoras que se administran para tratar la infección mezclada. El bacteriófago Lys menos que es defectuoso en la lisis de bacterias infecciosas, no provoca una lisis importante de las bacterias infecciosas, con lo cual se reduce el número de bacteriófagos que se exponen a una respuesta inmune por un sujeto, y suministran así una depuración reducida del bacteriófago con relación a aquella asociada a un bacteriófago de tipo silvestre. Las bacterias infecciosas son bacterias patógenas.

En otro aspecto, la invención caracteriza una composición farmacéutica que comprende un bacteriófago aislado Lys menos y un portador farmacéuticamente aceptable, en donde al contacto con una célula hospedadora bacteriana, el bacteriófago Lys menos efectúa la inhibición de crecimiento de la célula hospedadora bacteriana, y es deficiente en la producción de una lisina funcional tal que el bacteriófago no afecte un nivel substancial de la lisis de células hospedadoras bacterianas. En modalidades específicas, el bacteriófago está en forma liofilizada. En una modalidad relativa, la composición farmacéutica comprende una mezcla del bacteriófago Lys menos definido en donde al menos 2 de los fagos en la composición tienen una especificidad diferente del hospedador bacteriano, y cuya mezcla de fagos se adapta para el tratamiento de una infección mezclada de bacterias diferentes. Las bacterias infecciosas son bacterias patógenas.

En otro aspecto, la invención se refiere a un método para el tratamiento de una infección bacteriana en un sujeto, con un bacteriófago terapéutico de manera de suministrar una depuración reducida de bacteriófagos por el sistema inmune del sujeto. Esto se logra al administrar a un sujeto que tiene una infección bacteriana, un bacteriófago Lys menos específico para las bacterias infecciosas presentes en el sujeto, en donde el bacteriófago se administra en una cantidad efectiva para proporcionar la infección de las bacterias infecciosas por el bacteriófago Lys menos y la inhibición de la replicación de las bacterias infecciosas. El bacteriófago Lys menos, que es defectuoso en la lisis de las bacterias infecciosas, no provoca una lisis importante de las bacterias infecciosas, con lo cual se reduce el número de bacteriófagos que se exponen a una respuesta inmune por el sujeto, y suministran así una depuración reducida del bacteriófago. Las bacterias infecciosas son bacterias patógenas con relación a aquella asociada a un bacteriófago de tipo silvestre.

Todavía en otro aspecto, la invención caracteriza un bacteriófago Lys menos, cuyo bacteriófago es defectuoso en la producción de una proteína de lisina funcional. Al poner en contacto el bacteriófago con una célula hospedadora bacteriana para la cual el bacteriófago es específico, resulta en una infección de la célula hospedadora bacteriana por el bacteriófago Lys menos, la replicación del bacteriófago Lys menos y la inhibición de la replicación de la célula hospedadora bacteriana, en donde el bacteriófago Lys menos no afecta la lisis de la célula hospedadora bacteriana en virtud de la acción del sistema de lisis del bacteriófago.

En otro aspecto, la invención caracteriza una composición farmacéutica que comprende un bacteriófago Lys menos y un portador farmacéuticamente aceptable. Al poner en contacto el bacteriófago Lys menos con una célula hospedadora bacteriana para la cual el bacteriófago es específico, resulta en la inhibición del crecimiento de la célula hospedadora bacteriana. El bacteriófago puede estar presente en la composición en forma liofilizada. En una modalidad relacionada, la composición farmacéutica comprende una mezcla de bacteriófagos Lys menos cuya composición tiene al menos dos bacteriófagos de especificidad de hospedador bacteriano diferente, cuya mezcla está particularmente adecuada para el tratamiento de una infección mezclada de bacterias diferentes.

Una característica de la invención, es que se refiere a un procedimiento general para eliminar o minimizar el desarrollo de una respuesta inmune contra el fago cuando se usa para el tratamiento de la infección bacteriana.

Otra característica de la invención, es que suministra bacteriófagos y composiciones para el tratamiento de infecciones bacterianas, particularmente infecciones por bacterias patogénicas resistentes a fármacos.

Una ventaja de la invención, es que el uso de los bacteriófagos Lys menos proporciona una depuración reducida del bacteriófago para permitir una terapia más efectiva, mientras que al mismo tiempo se evitan respuestas inmunes indeseables en el sujeto a ser tratado. La infección de un patógeno con un bacteriófago Lys menos resulta en el avance de todos los eventos del ciclo de replicación de fagos excepto la última etapa, nominalmente, la lisis del hospedador bacteriano. El patógeno bacteriano infectado con un fago Lys menos es incapaz de multiplicarse y distribuir la infección bacteriana en vista del daño provocado por el fago del genoma bacteriano. Así, el uso del bacteriófago Lys menos resulta en la contención y finalmente la eliminación del patógeno con una liberación reducida del fago al ambiente o el hospedador humano durante el tratamiento de la infección.

Otra ventaja de la invención, es que las bacterias infectadas con fagos, se hacen bacteriostáticas en una forma que no suministrará el reestablecimiento de la replicación bacteriana una vez que se finaliza la terapia.

Otra ventaja de la invención, es que las bacterias inactivadas con fagos sirven como vacunas in situ y una respuesta inmune contra el patógeno bacteriano incapacitado puede servir para proteger al paciente contra una infección futura por el patógeno.

Estos y otros objetivos, ventajas y características de la invención serán evidentes para aquellas personas expertas en la técnica con la lectura de los detalles de las composiciones y métodos de su uso como se describe más completamente a continuación.

Breve descripción de las figuras

La figura 1 es un esquema que muestra el uso de un hospedador bacteriano que tiene un plásmido con un gen de lisina mutante, para uso en la producción de un fago terapéutico de la invención.

La figura 2 ilustra el SDS-PAGE de los productos de genes producidos por los plásmidos pGMB011 y pGMB021 (pista 1: pGMB11, sin inducir; pista 2: pGMB011, inducido; pista 3: pGMB021, sin inducir; pista 4: pGMB021, inducido; pista 5: marcador 14-97 Kda).

La figura 3 es una fotografía que ilustra los resultados del PCR del constructo pGMB021 usado para experimentos de recombinación (pista 1: cebadores GMB1/GMB2; pista 2: cebadores GMB2/GMB5; pista 3: marcadores; pista 4: cebadores GMB5/GMB6).

La figura 4 es una fotografía que ilustra los resultados del PCR de las placas turbias producto del gen GFP (pistas 1-5, 7, 8, 17 y 18: acumulados positivos para los productos del gen GFP; pistas 6, 11-16; acumulados negativos para el producto del gen GFP; pistas 9, 19: control positivo; pistas 10, 20: marcador de PM).

La figura 5 es una fotografía que ilustra los resultados de PCR de placas turbias para el producto de gen lisina-GFP-lisina (pistas 1-6: placas turbias #1, 2, 3, 4, 7, 8; pista 7: control positivo para el producto lisina-GFP-lisina (ADN plásmido); pista 8: marcador PM; pista 9: control positivo para el producto de lisina (ADN plásmido); pista 10: control negativo).

La figura 6 ilustra lisados de fagos recombinantes manchados en una capa de *E. coli* que muestra niveles diferentes de contaminación con el fago de tipo silvestre o la ausencia total de placas silvestres (mancha #1: lisado #11 que muestra un número que se cuenta de placas silvestres; mancha #2: lisado que muestra un alto número de placas que lisan completamente las células; mancha #3: lisado que no muestra ninguna de las placas silvestres).

La figura 7 ilustra el fago recombinante que contiene los lisados manchados en una capa de *E. coli* que muestra la ausencia de placas.

La figura 8 ilustra lisados que contienen fagos recombinantes (RP) que conducen a la pérdida de viabilidad de las células *E. coli* infectadas (cuadrante #1: ~50 % de pérdida de viabilidad observada con el lisado RP #33; cuadrantes #2 & 4: pérdida total de viabilidad en el caso de los lisados RP #34 y #36; cuadrante #3: ninguna pérdida importante de viabilidad con el lisado RP #35).

Antes de que se describa la presente invención, se entenderá que esta invención, no está limitada a una metodología en particular, protocolos, bacteriófagos, patógenos bacterianos, especies o géneros animales, constructos y reactivos descritos como tal pueden por supuesto variar. También se entenderá, que la terminología usada en la presente es para el propósito de describir solamente modalidades particulares, y no se pretende que sea limitante ya que el alcance de la presente invención estará solamente limitado por las reivindicaciones anexas.

En donde se suministra un intervalo de valores se entiende que cada valor en intervención, hasta una décima de la unidad del límite inferior a menos que el contexto lo dicte claramente de otra manera, entre los límites superior e inferior de ese intervalo también se describe específicamente. Cada intervalo más pequeño entre cualquier valor declarado o valor en intervención, en un intervalo establecido, y cualquier otro valor declarado o de intervención en ese intervalo establecido se abarca dentro de la invención. Los límites superior e inferior de estos intervalos más pequeños, se pueden incluir independientemente o excluir en el intervalo, y cada intervalo en donde alguno, ninguno o ambos límites se incluyen en los intervalos más pequeños también se abarca dentro de la invención, sujeto a cualquier límite específicamente excluido en el intervalo establecido. En donde el intervalo establecido incluye uno o ambos de los límites, los intervalos que excluyen cualquiera o ambos de esos límites incluidos también se incluyen en la invención.

A menos que se defina de otra manera, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente, tienen el mismo significado como se entiende comúnmente por alguien experto ordinario en la técnica a quien pertenece esta invención. Aunque se pueden usar algunos métodos y materiales similares equivalentes a aquellos aquí descritos, en la práctica o prueba de la presente invención se describen ahora los métodos y materiales preferidos.

Se debe observar que como se usa en la presente y en la reivindicaciones anexas, las formas singulares “un”, “y”, y “los”, incluyen los referentes en plural al menos que el contexto claramente lo dicte de otra manera. Así, por ejemplo la referencia a “un bacteriófago” incluye una pluralidad de tales bacteriófagos y la referencia a la célula hospedadora, incluye la referencia a una o más células hospedadoras y equivalentes de las mismas conocidos por aquellos expertos en la técnica y así sucesivamente.

Las publicaciones aquí discutidas, se suministran únicamente para su divulgación previo a la fecha de presentación de la solicitud actual. Nada en la presente se constituye como una admisión de que la presente invención no está acreditada por ser anterior a tal publicación en virtud de la invención previa. Además, las fechas de publicación suministradas pueden ser diferentes de las fechas de publicación actuales que se pueden necesitar para confirmarse independientemente.

Descripción detallada de la invención

Aunque se reconoce generalmente el potencial de la terapia de fagos para el tratamiento de la resistencia a los antibióticos, el desarrollo de la terapia de fagos se ha retrasado debido a la controversia que rodea el uso de fagos en los años 1920 y 1930, así como la preocupaciones acerca del potencial para las respuestas inmunes contra los fagos terapéuticos. La producción de un fago bien definido o bien caracterizado usando tecnologías modernas y estándares actuales del control de calidad, han atendido las cuestiones que conducen a controversias acerca de la

terapia de fagos en el pasado. Sin embargo el potencial para la generación de respuestas inmunes es una propiedad fundamental de los bacteriófagos y la prevención de la respuesta inmune o la reducción de este potencial es importante para la aplicación efectiva de la terapia de fagos. El uso de bacteriófagos terapéuticos en el tratamiento de la infección bacteriana es en algunos casos, una carrera entre el bacteriófago cuando infecta las bacterias de la infección del sujeto y la respuesta inmune cuando reconoce al bacteriófago como un extraño, e intenta depurar al bacteriófago del cuerpo. El objetivo de esta invención es proporcionar un procedimiento para retrasar, minimizar o eliminar (evitar) el desarrollo de una respuesta inmune contra el fago cuando se usa para el tratamiento de la infección bacteriana.

La presente invención alcanza este objetivo al suministrar fagos Lys menos (Lys⁻) que pueden infectar bacterias e inhibir el crecimiento bacteriano, pero cuyos fagos no pueden efectuar la lisis de las bacterias infectadas. Los bacteriófagos de la invención en esencia, actúan como agentes antimicrobianos e inhiben la replicación bacteriana sin efectuar la lisis del hospedador bacteriano. Al reducir el número de bacteriófagos al cual se expone el sujeto que se somete a terapia, será menos firme la respuesta inmune del hospedador contra el bacteriófago terapéutico, reduciendo así la tasa de depuración del fago terapéutico.

Los antibióticos ejercen su acción al exterminar las bacterias (bactericidas) o al inhibir el crecimiento de las bacterias (bacteriostáticos). Aunque los agentes bactericidas se prefieren, también han sido benéficos los agentes bacteriostáticos ya que las defensas normales del hospedador pueden luego destruir las bacterias debilitadas. La invasión específica de un patógeno bacteriano por un bacteriófago genéticamente modificado propuesto en esta invención, incapacita el patógeno cuyo patógeno luego se elimina por mecanismos de defensa normales del hospedador. En contraste con los agentes microbianos bacteriostáticos, en los cuales el retiro de la terapia puede conducir al reinicio de la infección, las bacterias inactivadas con fagos que permanecen no viables no pueden reiniciar la infección.

El fago Lys menos de la invención se puede usar para inactivar algún hospedador bacteriano específico, y por lo tanto se puede desarrollar como un agente terapéutico para el tratamiento de cualquier infección bacteriana. La presente invención aplica así a todos los bacteriófagos.

Los aspectos específicos de la invención se describirán ahora con mayor detalle.

Definiciones

Por "bacteriófago" y "fago", términos los cuales se usan indistintamente en la presente, significa cualquiera de diversos virus que tiene una afinidad específica e infectan bacterias. Estas incluyen así, colifagos, que infectan *Escherichia coli* (por ejemplo, el fago lambda y los fagos uniformes T, T2, T4, y T6). Los fagos comprenden un recubrimiento de proteína o cápsida que encierra al material genético, ADN o ARN, que se inyecta en la bacteria con la infección. En el caso de los fagos virulentos, todas las síntesis del ADN, ARN hospedador y proteínas se suspende y se usa el genoma del fago para dirigir la síntesis de los ácidos nucleicos de fagos y las proteínas que utilizan el aparato de traducción y de transcripción del hospedador. Estos componentes del fago luego se autoensamblan para formar nuevas partículas de fago. La síntesis de la lisozima de fago conduce a la ruptura de una pared celular bacteriana que libera normalmente una progenie de 100-200 fagos. Los fagos templados, tales como lambda, pueden también mostrar este ciclo lítico cuando infectan una célula, pero más frecuentemente inducen la lisogenie en la cual el fago se integra en el ADN del hospedador bacteriano para persistir como un profago. En general el bacteriófago de interés en la invención son fagos líticos más que fagos templados.

Por "fago Lys menos" o "bacteriófago Lys menos", cuyos términos se usan intercambiamente, significa un fago deficiente en la proteína de lisina. Los bacteriófagos Lys menos son incapaces de facilitar una lisis eficiente del hospedador bacteriano ya que la actividad enzimática de la lisina del fago se necesita para la degradación enzimática de la capa de péptidoglicano de la pared celular bacteriana. El bacteriófago Lys menos mantiene una actividad en la infección de su hospedador bacteriano apropiado, destrucción del genoma bacteriano, y replicación, que son suficientes para inhibir el crecimiento bacteriano y la replicación. El fago Lys menos incluye aquellos generados por mutación o eliminación del gen que codifica la lisina del sistema de lisis de fago. El fago Lys menos, abarca el fago defectuoso en la lisina debido a la eliminación de todo o una porción del ácido nucleico que codifica la lisina, de manera que se produce lisina no detectable, o una forma truncada se produce, lo que tiene una actividad reducida para facilitar la lisis (por ejemplo, la lisina truncada no es efectiva para promover una lisis eficiente del hospedador bacteriano o no facilita ninguna actividad de lisis mediada por lisina de tipo silvestre detectable). El fago Lys menos también incluye aquellos en los cuales un ácido nucleico que codifica la lisina se enlaza de manera operativa a un promotor inducible de manera que se presenta la producción de lisina a un nivel efectivo para inducir la lisis sólo cuando está en presencia de un agente que activa el promotor inducible. Preferiblemente, el agente inductor es uno que normalmente no se encuentra en el hospedador a tratarse usando el fago, por ejemplo, el inductor es un agente que es endógeno al hospedador a tratarse.

El fago Lys menos, también incluye un fago que produce la proteína de lisina modificada cuya lisina es defectuosa para promover la lisis bacteriana debido a la presencia de una o más mutaciones. Tales mutaciones incluyen al menos una, o una combinación de una o más, eliminaciones, sustituciones, adiciones o inserciones de ácido nucleico, que

resultan en una alteración en la correspondiente secuencia de aminoácido de la proteína de lisina codificada.

Por "aislados" significa que el material es al menos 60 %, en peso libre de las proteínas y las moléculas orgánicas que se presentan naturalmente con las cuales se asocia de manera natural. Preferiblemente el material es al menos 75 %, más preferiblemente al menos 90 %, y más preferiblemente al menos 99 %, en peso de material de interés. "Aislado" abarca de esta manera preparaciones que se enriquecen del material deseado.

Los términos "polinucleótidos" y "ácido nucleico", usados intercambiamente en la presente, se refieren a formas poliméricas de nucleótidos de cualquier longitud, ya sea ribonucleótidos o desoxinucleótidos. De esta manera, los términos incluyen pero no se limitan a, ADN o ARN de hebra múltiple, doble o sencilla, híbridos de ADN-ARN, ADNc, ADN genómico, o un polímero que comprende purina y bases de pirimidina u otras bases de nucleótido derivados, no naturales, químicamente o bioquímicamente modificadas, o naturales.

Los términos "polipéptidos" y "proteína", usados intercambiamente en la presente, se refieren a una forma polimérica de aminoácidos de cualquier longitud, que pueden incluir aminoácidos codificados y no codificados, modificados químicamente o bioquímicamente (por ejemplo, modificación post-traducciona tal como glicosilación), o aminoácidos derivados, polipéptidos poliméricos, y polipéptidos que tienen estructuras de péptidos modificados. El término incluye proteínas de fusión, incluyendo pero no limitándose a, proteínas de fusión con una secuencia de aminoácidos heterólogos, fusiones con secuencias líderes heterólogas y homólogas, con o sin residuos de metionina de terminal N; proteínas etiquetadas inmunológicamente y similares.

El término "polinucleótido recombinante" como se usa en la presente, pretende un polinucleótido de un origen genómico, ADNc, semisintético, o sintético el cual en virtud de su origen, o manipulación: (1) no está asociado a una o una porción del polinucleótido con el cual se asocia en la naturaleza, (2) se enlaza a un polinucleótido diferente al cual se enlaza a la naturaleza, o (3) no se presenta en la naturaleza.

"Células hospedadoras recombinantes", "células hospedadoras", "células", "líneas celulares", "cultivos celulares", y otros términos denotan microorganismos o células eucarióticas superiores cultivadas como identidades celulares con referencia a las células a las cuales pueden, o tienen, que usarse como receptores para el vector recombinante u otro ADN de transferencia e incluye la progenie de la célula original que se ha transfectado. Se entenderá que la progenie de una célula familiar sencilla puede no necesariamente ser completamente idéntica en morfología, o el complemento de ADN genómico o total, como su precursor original, debido a la naturaleza, mutación deliberada o accidental.

"Enlazado operablemente" se refiere a una yuxtaposición en donde los componentes de esta manera descritos están en una relación que permite que funcionen en su manera pretendida. Una secuencia de "control enlazado operablemente" a una secuencia de codificación se liga de tal manera que la expresión de la secuencia de codificación se realiza bajo condiciones compatibles con la secuencia de control.

Un "marco de lectura abierto" (ORF por sus siglas en inglés) es una región de una secuencia de polinucleótido que codifica un polipéptido; esta región puede representar una porción de la secuencia de codificación o una secuencia de codificación total.

Una "secuencia de codificación" es una secuencia de polinucleótido que se transcribe en ARNm y/o se traduce en un polipéptido cuando se coloca bajo el control de secuencias reguladoras apropiadas. Los límites de la secuencia de codificación se determinan por el codón de inicio de traducción en la terminación 5' y un codón de detención de traducción en la terminación 3'. Una secuencia de codificación puede incluir pero no se limita a ARNm, ADNc y secuencia de polinucleótido recombinantes.

"Heterólogos" significa que los materiales se derivan de diferente fuente (por ejemplo, de diferentes genes, diferentes especies etc).

"Transformación", como se usa en la presente se refiere a la inserción de un polinucleótido exógeno en una célula hospedadora, sin tener en cuenta el método usado para la inserción, por ejemplo, absorción directa, transducción, marcado F o electroporación. El polinucleótido exógeno puede mantenerse como un vector no integrado, por ejemplo, un plásmido o alternativamente, puede integrarse en el genoma hospedador.

Los términos "individual", "sujeto", "hospedador", y "paciente", se usan intercambiamente en la presente y se refiere a cualquier sujeto que tiene una infección bacteriana que se puede tratar usando el bacteriófago terapéutico de la invención, y del cual se desea el tratamiento o terapia. Los sujetos mamíferos y pacientes, particularmente sujetos o pacientes humanos son de interés particular. Otros sujetos pueden incluir ganado perros, gatos, conejillos de indias, conejos, ratas, ratones, caballos y demás.

Los términos "Tratamiento", "tratado" y "tratar" y similares, se usan en la presente para referirse generalmente a obtener un efecto farmacológico y/o fisiológico deseado. El efecto puede ser profiláctico en términos de prevenir completamente o parcialmente una enfermedad o síntoma del mismo, y/o puede ser terapéutico en términos de una

estabilización parcial o completa o cura para una enfermedad y/o efecto o adverso atribuible a la enfermedad (por ejemplo, eliminar una infección, reducir la severidad de una infección reducida la carga bacteriana, inhibir el crecimiento de la bacteria). "Tratamiento", como se usa en la presente cubre cualquier tratamiento de una enfermedad de un sujeto, particularmente un sujeto mamífero, más particularmente un humano e incluye, (a) prevenir la enfermedad o síntoma de que suceda en un sujeto, que puede estar predispuesto a la enfermedad o síntoma pero que no se ha diagnosticado todavía por tenerlo; (b) inhibir el síntoma de la enfermedad, esto es, suspender su desarrollo, a aliviar el síntoma de la enfermedad, esto es, provocar el regreso de la enfermedad o síntoma.

Por "bacteria infecciosa" significa una bacteria que tiene una infección establecida en el hospedador, y que se puede asociar a una enfermedad o un síntoma indeseable como resultado. Generalmente las bacterias infecciosas son bacterias patogénicas.

Por "bacterias resistentes a fármacos" o "bacterias resistentes a antibióticos" significa una cepa bacteriana que es resistente a inhibición el crecimiento o al exterminio por un antibiótico. Las bacterias resistentes a multifármacos son resistentes a dos o más antibióticos. La resistencia a fármacos puede abarcar por ejemplo, un exterminio ineficaz de la bacteria infecciosa, tal que al menos permanece una dosis infecciosa del sujeto y continua la infección, resultando en síntomas continuos de la enfermedad infecciosa asociada o una evidencia posterior de tales síntomas. También puede abarcar la resistencia a fármacos la inhibición del crecimiento de bacterias resistentes a fármacos hasta que tal terapia de tiempo se descontinúa, después de lo cual las bacterias comienzan a replicarse y además la enfermedad infecciosa.

Por "inhibición de un crecimiento bacteriano" en el contexto de la infección de una célula bacteriana con un bacteriófago Lys menos, significa que después de la infección de las bacterias el bacteriófago inhibe o interfiere con los mecanismos de traducción y/o transcripción normales de la célula hospedadora bacteriana, tal que las bacterias infectadas no se someten a una división substancial celular (replicación) y se provoca que entre a un estado de bacteriostasis.

Bacteriófago para la producción del bacteriófago Lys menos

Un fago Lys menos de la invención se puede generar a partir de cualquier bacteriófago de tipo silvestre, preferiblemente de un fago lítico. Así, se pueden aplicar los bacteriófagos y composiciones de la invención al desarrollo de cualquiera de diversos bacteriófagos Lys menos que son específicos para cualquiera de una diversidad de bacterias, y son útiles en el tratamiento de una amplia variedad de infecciones bacterianas. Aunque se contempla que la presente invención se puede usar para tratar cualquier infección bacteriana en un animal, la invención encuentra un uso particular en terapia (adjunta o autosostenida) para infecciones provocadas por bacterias resistentes a fármacos. Las especies bacterianas clínicamente importantes, resistentes a fármacos ejemplares y cepas se enlistan a continuación. El número de acceso de American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, MD) para un bacteriófago ejemplar de tipo silvestre que infecta las cepas clínicamente relevantes correspondientes se suministra después de la cepa que infecta. Tal fago es ejemplar de aquellos que se puede modificar para hacer Lys menos para suministrar el bacteriófago terapéutico de acuerdo con la invención. La lista es como sigue.

1. Todos los miembros clínicamente importantes de la familia *Enterobacteriaceae*, incluido pero no limitado a:

- a. Todas las cepas clínicamente importantes de *Escherichia*, con *E.coli* siendo de interés particular (ATCC fago #23723-B2);
- b. Todas las cepas clínicamente importantes de *Klebsiella*, con *K. pneumoniae* (ATCC fago # 23356-B1) que es de particular interés;
- c. Todas las cepas clínicamente importantes de *Shigella*, con *S. dysenteriae* que son de particular interés (ATCC fago #11456a-B1);
- d. Todas las cepas clínicamente importantes de *Salmonella* incluyendo *S. abortus-equi* (ATCC fago #9842-B1), *S. typhi* (ATCC fago #19937-B1), *S. typhimurium* (ATCC fago #19585-B1), *S. newport* (ATCC fago #27869-B1), *S. paratyphi-A* (ATCC fago #12176-B1), *S. paratyphi-B* (ATCC fago #19940-B1), *S. potsdam* (ATCC fago #259578-B2), y *S. pollurum* (ATCC fago #19945-B1) ;
- e. Todas las cepas clínicamente importantes de *Serratia*, más notablemente *S. marcescens* (Fago ATCC #14764-B1)
- f. Todas las cepas clínicamente importantes de *Yersinia*, más notablemente *Y. pestis* (Fago ATCC #11953-B1)
- g. Todas las cepas clínicamente importantes de *Enterobacter*, más notablemente *E. cloacae* (Fago ATCC #23355-B1);

2. Todas las clínicamente importantes de *Enterococci*, más notablemente *E. faecalis* (Fago ATCC #19948-B1) y *E. faecium* (Fago ATCC #19953-B1)

3. Todas las cepas clínicamente importantes de *Haemophilus*, más notablemente *H. influenzae* (el fago ejemplar se puede obtener de la Organización Mundial de la Salud (OMS) o de otros laboratorios que los hagan disponibles de forma pública);

4. Todos los *Mycobacteria* clínicamente importantes, más notablemente *M. tuberculosis* (Fago ATCC #25618-B1), *M. avium-intracellulare*, *M. bovis*, y *M. leprae*. (fago ejemplar comercialmente disponible de la OMS, por medio del Instituto Nacional de Salud Pública y Protección Ambiental, Bilthoven, Países Bajos);
5. *Neisseria gonorrhoeae* y *N. meningitidis* (fago ejemplar que se puede obtener de manera pública de la OMS y de otras fuentes);
6. Todas las *Pseudomonads*, clínicamente importantes con *P. aeruginosa* siendo de interés en particular (Fago ATCC #14203-B1);
7. Todos los *Staphylococci*, clínicamente importantes con *S. aureus* (Fago ATCC#27690-B1) y *S. epidermidis* (fago ejemplar públicamente disponible a través de la OMS, por medio del instituto Colindale en Londres) que es de interés en particular;
8. Todos los *Streptococci*, clínicamente importantes siendo de particular interés *S. pneumoniae* (fago ejemplar que se puede obtener públicamente de la OMS o de otras fuentes); y
9. *Vibrio cholera* (fago #14100-B1).

Los patógenos bacterianos adicionales, demasiado numerosos para mencionarse aquí particularmente aquellos en los cuales se ha desarrollado una resistencia a fármacos, también pueden ser susceptibles a terapia de acuerdo con la presente invención. En resumen, todas las infecciones bacterianas provocadas por bacterias para las cuales hay un fago correspondiente actualmente disponible, o por la cual se puede identificar el fago, se pueden tratar usando la presente invención al hacer el fago correspondiente Lys menos, y poner en contacto las bacterias con el fago Lys menos.

También se puede usar un fago novedoso en la presente invención. Tales fagos novedosos se aíslan continuamente de desechos de hospitales y de otras fuentes por procedimientos estándar. Normalmente, 9 ml de una muestra de desechos se mezclan con un 1 ml de caldo 10X LB, 0,1 ml de caldo LB durante la noche, se agita el crecimiento del cultivo de una cepa bacteriana objetivo se agrega y se incuba durante la noche a 37 °C. Se agrega cloroformo (0,1 ml) y se incuba a 37 °C por 15 minutos con agitación a 300 rpm. Esto luego se centrifuga a 14,000 rpm por 20 minutos @4C y el sobrenadante se almacena en tubos estériles Eppendorf. Estas preparaciones crudas de fagos se purifican y caracterizan además como se necesiten.

Lisinas de fagos

La lisis de la célula bacteriana del hospedador por muchos tipos de bacteriófagos, depende de al menos 2 diferentes tipos de proteínas (Young *et al.* Microbiol. Rev. 56,430 (1992)). La degradación de la pared celular bacteriana se logra por las lisinas. Los ejemplos mejor estudiados son el producto de gen T4 e, una lisozima (Tsugita *et al.* J. Biol. Chem. 243,391 (1968)) y la proteína lambda R, una transglicosilasa (Garrett *et al.* Mol. Gen. Genet. 182,326 (1981)). Se han identificado los genes de lisina de un gran número de bacteriófagos y se han caracterizado en la década pasada. Estos incluyen las lisinas del bacteriófago T7 (Inouye *et al.* Biol. Chem. 248,7247 (1973), gp 19 del fago P22 de *Salmonella typhimurium* (Rennell *et al.* Virol. 143,280 (1985), phi 29 gp 15 de 2 fagos de las bacterias gram-positivo *Lactococcus lactis* y *Bacillus subtilis* (Garvey *et al.* Nucleic Acids Res. 14,10001 (1986)), el bacteriófago del pneumococo Cp-1 (Garcia *et al.* J. Virol. 61, 2573 (1987)), el fago f6 de pseudomonas (Caldentey *et al.* Biochim. Biophys. Acta 1159,44 (1992)), el gen K del bacteriófago P2 (Ziermann *et al.* J. Bacteriol. 176, 4974 (1994)), el gen 17 del bacteriófago P1 (Schmidt *et al.* Bacteriol. 178,1099 (1996)), las lisinas del bacteriófago de *Listeria monocytogenes*, Ply 511 y Ply 518 (Gaeng *et al.* Appl. Environ. Microbiol. 66,2951 (2000)) así como diversos fagos que infectan a los lactobacilos (Shearman *et al.* Appl. Environ. Microbiol. 60,3063 (1994)); Henrich *et al.* J. Bacteriol. 177,723 (1995)).

Las lisinas adicionales de fagos reportadas en la literatura se dan a continuación.

Ackermann (1998) Tailed bacteriophages: the order caudovirales. Adv Virus Res, 51: 135-201.

Arendt *et al.* (1994) Molecular characterization of lactococcal bacteriophage Tuc2009 and identification and analysis of genes encoding lysin, a putative holin, and two structural proteins. Appl Environ Microbiol, 60: 1875-1883.

Auad *et al.* (1999) Physical mapping and partial genetic characterization of the *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* bacteriophage 1b539. Arch Virol, 144: 1503-1512.

Boizet *et al.* (1990) Cloning, expression and sequence analysis of an endolysin-encoding gene of *Lactobacillus bulgaricus* bacteriophage mv1. Gene, 94: 61-67.

Calandra *et al.* (1980) Lysis and protoplast formation of group B streptococci by mutanolysin. Infect Immun, 28: 1033-1037.

Calandra *et al.* (1975) Cellular streptolysin S-related hemolysins of group A *Streptococcus* C203S. Infect Immun, 12: 13-28.

Chandry *et al.* (1997) Analysis of the DNA sequence, gene expression, origin of replication and modular structure of

- the *Lactococcus lactis* lytic bacteriophage sk1. *Mol Microbiol*, 26: 49-64.
- Cohen *et al.* (1975) Simple procedure for production by group C streptococci of phage-associated lysin active against group A streptococci. *Appl Microbiol*, 29: 175-178.
- 5 Coleman *et al.* (1986) Cloning and expression in *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* of the beta-lysin determinant from *Staphylococcus aureus*: evidence that bacteriophage conversion of beta-lysin activity is caused by insertional inactivation of the beta-lysin determinant. *Microb Pathog*, 1: 549-564.
- 10 Coleman *et al.* (1989) *Staphylococcus aureus* bacteriophages mediating the simultaneous lysogenic conversion of beta-lysin, staphylokinase and enterotoxin A: molecular mechanism of triple conversion. *J Gen Microbiol*, 135: 1679-1697.
- 15 Cooney *et al.* (1988) Molecular cloning and genetic analysis of the determinant for gamma-lysin, a two-component toxin of *Staphylococcus aureus*. *J Gen Microbiol*, 134: 2179-2188.
- de Ruyter *et al.* (1997) Food-grade controlled lysis of *Lactococcus lactis* for accelerated cheese ripening. *Nat Biotechnol*, 15: 976-979.
- 20 Diaz *et al.* (1996) The two-step lysis system of pneumococcal bacteriophage EJ-1 is functional in gram-negative bacteria: triggering of the major pneumococcal autolysin in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, 19: 667-681.
- Dietrich *et al.* (1998) Delivery of antigen-encoding plasmid DNA into the cytosol of macrophages by attenuated suicide *Listeria monocytogenes*. *Nat Biotechnol*, 16 : 181-185.
- 25 Elias *et al.* (1980) *Staphylococcus aureus* haemolysins: their use in strain typing. *Acta Microbiol Acad Sci Hung*, 27: 183-190.
- Fischetti *et al.* (1971) Purification and physical properties of group C streptococcal phage-associated lysin. *J Exp Med*, 133: 1105-1117.
- 30 Garcia *et al.* (1987) Cloning, purification, and biochemical characterization of the pneumococcal bacteriophage Cp-1 lysin. *J Virol*, 61: 2573-2580.
- 35 Garcia *et al.* (1983) Mechanism of phage-induced lysis in pneumococci. *J Gen Microbiol*, 129: 479-487.
- Garcia *et al.* (1984) Biochemical characterization of a murein hydrolase induced by bacteriophage Dp-1 in *Streptococcus pneumoniae*: comparative study between bacteriophage-associated lysin and the host amidase. *J Bacteriol*, 159: 793-796.
- 40 Gindreau *et al.* (1999) Molecular analysis of the region encoding the lytic system from *Oenococcus oeni* temperate bacteriophage phi 10MC. *FEMS Microbiol Lett*, 171: 231-238.
- 45 Henrich *et al.* (1995) Primary structure and functional analysis of the lysis genes of *Lactobacillus gasseri* bacteriophage phi adh. *J Bacteriol*, 177: 723-732.
- Hill *et al.* (1981) Identification of a lysin associated with a bacteriophage (A25) virulent for group A streptococci. *J Bacteriol*, 145: 696-703.
- 50 Kaneko *et al.* (1998) Complete nucleotide sequence and molecular characterization of the temperate staphylococcal bacteriophage phiPVL carrying panton-valentine leukocidin genes. *Gene*, 215: 57-67.
- Kuhnemund (1972) studies on the lysis of streptococcus pyogenes (group A, type 1) by phage-associated lysin (author's transl). *Z Immunitatsforsch Exp Klin Immunol*, 143: 184-191.
- 55 Loessner *et al.* (1996) Modified *Listeria* bacteriophage lysin genes (ply) allow efficient overexpression and one-step purification of biochemically active fusion proteins. *Appl Environ Microbiol*, 62: 3057-3060.
- 60 Loessner *et al.* (1995) Heterogeneous endolysins in *Listeria monocytogenes* bacteriophages: a new class of enzymes and evidence for conserved holin genes within the siphoviral lysis cassettes. *Mol Microbiol*, 16: 1231-1241.
- Martin *et al.* (1998) Functional analysis of the two-gene lysis system of the pneumococcal phage Cp-1 in homologous and heterologous host cells. *J. Bacteriol*, 180: 210- 217.

- Mindich *et al.* (1979) Cell wall lysin as a component of the bacteriophage phi 6 virion. *J Virol*, 30: 489-496.
- Mullan *et al.* (1985) Lysin production by phi C2(W), a prolate phage for *Streptococcus lactis* C2. *J Dairy Res*, 52: 113-121.
- 5 Mullan *et al.* (1985) Partial purification and some properties of phi C2(W) lysin, a lytic enzyme produced by phage-infected cells of *Streptococcus lactis* C2. *J Dairy Res*, 52: 123-138.
- 10 Nelson *et al.* (2001) Prevention and elimination of upper respiratory colonization of mice by group A streptococci by using a bacteriophage lytic enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98: 4107-4112.
- Oki *et al.* (1996) Cloning, sequence analysis, and expression of the genes encoding lytic functions of Bacteriophage phi g1e. *Gene*, 176: 215-223.
- 15 Payne *et al.* (1996) Exploitation of a chromosomally integrated lactose operon for controlled gene expression in *Lactococcus lactis*. *FEMS Microbiol Lett*, 136: 19-24.
- Raina (1981) Purification of *Streptococcus* group C bacteriophage lysin. *J Bacteriol*, 145: 661-663.
- 20 Sable *et al.* (1995) The lysins of bacteriophages infecting lactic acid bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol*, 43: 1-6.
- Sanders *et al.* (1997) A chloride-inducible gene expression cassette and its use in induced lysis of *Lactococcus lactis*. *Appl Environ Microbiol*, 63: 4877-4882.
- 25 Shearman *et al.* (1989) Cloning and DNA sequence analysis of a lactococcus bacteriophage lysin gene. *Mol Gen Genet*, 218: 214-221.
- Shearman *et al.* (1994) Controlled expression and structural organization of a lactococcus lactis bacteriophage lysin encoded by two overlapping genes. *Appl Environ Microbiol*, 60: 3063-3073.
- 30 Sheehan *et al.* (1996) Analysis of the catalytic domain of the lysin of the lactococcal bacteriophage Tuc2009 by chimeric gene assembling. *FEMS Microbiol Lett*, 140: 23-28.
- 35 Sheehan *et al.* (1997) The lytic enzyme of the pneumococcal phage Dp-1: a chimeric lysin of intergeneric origin. *Mol Microbiol*, 25: 717-725.
- Sheehan *et al.* (1999) Identification and characterization of a lysis module present in a large proportion of bacteriophages infecting *Streptococcus thermophilus*. *Appl Environ Microbiol*, 65: 569-577.
- 40 Sonstein *et al.* (1971) Staphylococcal bacteriophage-associated lysin: a lytic agent active against *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*, 107: 499-504.
- Tourville *et al.* (1966) Lactic streptococcal phage-associated lysin. I. Lysis of heterologous lactic streptococci by a phage-induced lysin. *J Dairy Sci*, 49: 158-162.
- 45 van der Vijver *et al.* (1975) Induction of mutation in *Staphylococcus aureus* by ethylmethane sulphonate. *J Med Microbiol*, 8: 265-277.
- 50 van Sinderen *et al.* (1996) Sequence analysis and molecular characterization of the temperate lactococcal bacteriophage r1t. *Mol Microbiol*, 19: 1343-1355.
- Ward *et al.* (1993) Sequence analysis of the lysin gene region of the prolate lactococcal bacteriophage c2. *Can J Microbiol*, 39: 767-774.
- 55 Wheeler *et al.* (1980) Production of group C streptococcus phage-associated lysin and the preparation of streptococcus pyogenes protoplast membranes. *J Gen Microbiol*, 120: 27-33.
- Yoon *et al.* (2001) Characterization of a lytic *Lactobacillus plantarum* bacteriophage and molecular cloning of a lysin gene in *Escherichia coli*. *Int J Food Microbiol*, 65 : 63-74.
- 60 Young (1992) Bacteriophage lysis: mechanism and regulation. *Microbiol Rev*, 56: 430-481.
- En donde el gen de lisina de un bacteriófago de interés no ha sido todavía identificado, se puede lograr tal identificación usando métodos de rutina en el arte. Los genes de lisina de bacteriófagos se pueden identificar mediante por ejemplo, métodos basados en la formación de secuencias del genoma de bacteriófagos, y la comparación de la secuencia con aquellas del bacteriófago en la cual se ha descrito el gen de lisina. La
- 65

comparación de las secuencias de aminoácidos de las lisinas descritas a la fecha, revela 3 regiones conservadas (Schmidt *et al.* J Bacteriol. 178, 1099 (1996)). La primera región conservada contiene el sitio catalítico con la secuencia EG y la hendidura del sitio activo. Los genes de lisina de los bacteriófagos recientemente aislados, o bacteriófagos en los cuales no ha sido todavía descrito el gen de lisina, se pueden identificar y aislar por técnicas de amplificación de ácido nucleico (e.g., PCR) usando cebadores que corresponden a la secuencia de nucleótidos de las regiones conservadas de los genes de lisina conocidos. Al usar las partes conservadas del gen de lisina, los genes de lisina de cualquier fago se pueden aislar usando oligos degenerados, homólogos con cualquiera de 2 de 3 regiones conservadas. Una vez que se forma la secuencia de este producto de PCR, se pueden diseñar nuevos cebadores para la secuencia de las regiones en la dirección ascendente y en la dirección descendente de los genes de lisina, usando como plantilla el ADN del fago para la formación de secuencias.

Generación de los fagos mutantes Lys Menos

El fago Lys menos se pueden generar en cualquiera de una diversidad de formas consistentes con el suministro de un fago defectuoso en la lisis de conformidad con la invención. Preferiblemente, el fago Lys menos se genera al modificar el genoma del bacteriófago de manera que el bacteriófago es deficiente en la proteína de lisina de tipo silvestre (Lys) o de manera que el bacteriófago contiene un gen de lisina funcional ligado operativamente a un promotor inducible. Alternativamente, el bacteriófago tiene niveles reducidos de lisina, y así velocidades reducidas de lisis, se puede seleccionar al separar por exclusión el fago que infecta las bacterias e inhibe la aplicación del hospedador bacteriano, pero que tiene tasas reducidas de lisis, por ejemplo, el bacteriófago actúa como agente bacteriostático del hospedador bacteriano, pero no lisa la célula hospedadora bacteriana a un velocidad o nivel asociado a un fago de tipo silvestre que no es deficiente en el sistema de lisis de fagos.

Los bacteriófagos deficientes en la proteína de lisina (fagos "Lys menos"), incluyen aquellos generados por la mutación o eliminación del gen que codifica la lisina del sistema de lisis de fagos. El fago "Lys menos" abarca fagos defectuosos en lisina debido a la eliminación de toda o de una porción del ácido nucleico que codifica la lisina, de manera que no se produce ninguna lisina detectable, o se produce una forma truncada de lisina que tiene una actividad disminuida al facilitar la lisis (por ejemplo, la lisina truncada es ineficiente en promover una lisis eficiente del hospedador bacteriano, o no facilita ninguna actividad de lisis mediada por la lisina de tipo silvestre detectable). El fago "Lys menos" también incluye el fago que produce una proteína de lisina modificada, cuya lisina es defectuosa en la promoción de la lisis bacteriana debido a la presencia de una o más mutaciones. Tales mutaciones incluyen al menos una, o alguna combinación de una o más eliminaciones, sustituciones, adiciones o inserciones de ácidos nucleicos, que resultan en una alteración en la secuencia correspondiente de aminoácidos de la proteína codificada de lisina.

El fago Lys menos también incluye aquellos en los cuales el gen que codifica la lisina se ha codificado de manera tal que el gen se liga operativamente a un promotor inducible de manera que la lisina se produce solamente cuando el fago se hace contacto con un agente que activa al promotor inducible. Tal fago Lys menos puede producirse al modificar el gen de lisina de tipo silvestre, para que incluye un promotor inducible, al reemplazar el gen de lisina con un ácido nucleico codificador de lisina, ligado operativamente a un promotor de inducción, o al mutar o eliminar el gen que codifica lisina e insertarlo en el fago un ácido nucleico que codifica lisina, ligado operativamente a un promotor de inducción.

Se puede generar el bacteriófago que tiene una lisina defectuosa usando métodos microbiológicos clásicos, tales como ensayos de morfología de placas (ver por ejemplo, Streisinger *et al.* Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 26,25 (1961)).

También se puede generar el fago Lys menos, usando técnicas recombinantes tal como la mutagénesis dirigida al sitio (Smith Ann. Rev. Genet. 19, 423 (1985)), por ejemplo, usando técnicas de amplificación de ácido nucleico tal como PCR (Zhao *et al.* Methods Enzymol. 217,218(1993)) para introducir eliminaciones sencillas, inserciones y mutaciones de punto. Otros métodos para la mutagénesis de eliminación involucran por ejemplo el uso de la nucleasa BAL31, que acorta progresivamente un fragmento de ADN de hebra doble desde las terminaciones 5' y 3', o la exonucleasa III, que digiere el ADN objetivo de la terminación 3' (ver por ejemplo, Henikoff Gene 28,351 (1984)). El grado de digestión en ambos casos, está controlado por el tiempo de incubación o la temperatura de reacción o ambos. Se pueden introducir mutaciones de punto por el tratamiento con mutágenos tal como bisulfito de sodio, que desamina la desoxicitidina a desoxiuridina lo que resulta en la sustitución de un par base A:T por un par base G:C en aproximadamente 50 % de las molécula de plantilla después de una ronda de replicación (Botstein *et al.* Science 229,1193 (1985)).

Otros métodos ejemplares para introducir mutaciones de punto, involucran la incorporación enzimática de análogos de nucleótido o la mala incorporación de nucleótidos normales o alfa-tionucleótidos por polimerasa de ADN (Shortle *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79,1588 (1982)). En la mutagénesis dirigida a oligonucleótidos, se clona el ADN objetivo en un vector M13 para producir una plantilla de ADN de tipo silvestre de hebra sencilla, a la cual se combinan los pares bases, del mutágeno oligo. Esto produce una región no complementaria (en circuito) en el cebador oligo o sobre la plantilla, lo que resulta en una inserción o eliminación respectivamente. La no coincidencia de pares base entre la plantilla y el cebador resulta en una mutagénesis de punto. Los métodos de mutagénesis

basados en PCR (u otros métodos de mutagénesis basados en técnicas de amplificación de ácidos nucleicos), se prefieren generalmente ya que son simples y más rápidos que las técnicas clásicas antes descritas (Higuchi *et al.* Nucleic Acids Res. 16, 7351(1988); Vallette *et al.* Nucleic Acids Res. 17, 723(1989)).

5 Se pueden identificar bacteriófagos defectuosos en lisinas, al separar por exclusión un fago candidato mediante por ejemplo, la comparación de la capacidad del fago candidato para lisar un hospedador bacteriano de tipo silvestre, a la capacidad del fago candidato para lisar un hospedador bacteriano recombinante, modificado para expresar la proteína de lisina (por ejemplo, por un fago de ayuda, a partir de un plásmido de ayuda introducido que codifique la lisina del fago, o a partir de una secuencia codificadora de lisina de una fago recombinante, integrado en el genoma del hospedador bacteriano). El fago candidato que lisa el hospedador bacteriano que expresa la lisina, pero que falla al efectuar o no efectúa eficientemente, la lisis del hospedador bacteriano de tipo silvestre, representa un fago ejemplar Lys menos adecuado para su uso en la invención.

15 Un método de particular interés para generar los fagos Lys menos que carecen totalmente de la actividad de lisozima del gen de lisina, es eliminar la primera región conservada que contiene el sitio catalítico y la hendidura del sitio activo. Con base en la secuencia de nucleótidos de la lisina, los productos pos PCR de la región conservada I, se generan y transforman en el hospedador bacteriano adecuado junto con el fago de tipo silvestre. Un marcador de selección, tal como la proteína fluorescente verde de medusas (GFP; Chalfie, M. *et al.*, Science 263, 802, 1994), se puede usar en lugar de un marcador de resistencia al antibiótico. Los marcadores de resistencia al antibiótico pueden ser indeseables en donde el fago se va a usar en terapia, particularmente en donde la terapia de fago se va a suministrar en combinación con los antibióticos. Las réplicas de las bacterias de resistencia (para evitar la mutagénesis UV) luego se separan por exclusión bajo luz UV para aquellas que expresan GFP.

Producción de los fagos Lys menos usando técnicas de rescate del marcador

25 En otra modalidad, el fago Lys menos que tiene un efecto deseado en el gen de lisina, se genera usando técnicas de rescate del marcador. La técnica de rescate del marcador se ha utilizado ampliamente para mapear mutaciones en los fagos, y para transferir mutaciones generadas artificialmente de los genes de los fagos clonados en un plásmido al genoma de los fagos (Volker *et al.* Mol. Gen. Genet. 177,447(1980)). Un ejemplo del uso de esta técnica, es la aplicación para identificar genes involucrados en el ensamble y maduración del fago T4. Específicamente, los fragmentos de restricción que contienen el ensamble del fago T4 y los genes de maduración 20 a 22 se clonaron en plásmidos, hicieron mutagénesis y luego se recombinaron las mutaciones de vuelta en el genoma del fago por infección de *E. coli* que lleva el plásmido con un mutante doble T4 20/21 am (ámbar) (Volker, supra, 1980). La progenie del fago que se había sometido a la recombinación con el plásmido, se seleccionó por formación de placas en un hospedador su⁻ (que carece de un supresor ámbar) permitiendo la selección del fago recombinante. Estos fagos am⁺ luego se separaron por exclusión de forma no selectiva para la mutaciones sensibles a temperaturas deseadas en los genes 20 y 21.

40 Se puede emplear una estrategia similar para el gen de lisina. El gen de lisina mutante (ya sea un gen de lisina no funcional o un gen de lisina funcional ligado operativamente a un promotor inducible), que se puede generar usando técnicas recombinantes antes descritas, se clonan en un plásmido que tiene un marcador de selección, por ejemplo de resistencia a ampicilina. Dos tipos de hospedadores bacterianos que contienen plásmidos con genes de lisina mutante o de tipo silvestre (hospedador de lisina WT) (hospedador de lisina mutante) se usan. Se usa la cepa anterior que contiene el gen de lisina de tipo silvestre, como la cepa de ayuda para producción a gran escala del fago mutante Lys menos, en donde el fago Lys menos es uno que carece de un gen de lisina de inducción. La cepa posterior que contiene el gen de lisina mutante, se usa para introducir la mutaciones Lys en el fago de tipo silvestre. La figura1 proporciona una esquema de una célula hospedadora bacteriana que tiene un gen de lisina mutante útil para la generación del fago Lys menos de la invención.

50 Los hospedadores bacterianos que expresan la lisina mutante recombinante, para la producción de los fagos Lys menos (como se ilustra en la figura 1) se pueden generar por el uso de métodos bien conocidos en el arte. Por ejemplo, las secuencias de la regiones que flanquean el gen de lisina (alrededor de 100 pares base en cada lado) en cada uno de los fagos a ser mutados se aíslan. Generalmente, al menos alrededor de una homología de 50 pb se suministra a cada lado, flanqueando la región de interés que codifica el gen de lisina de fagos (Singer (1982) Cell, 31: 25-33). Los ADN que corresponden a la regiones en dirección ascendente y descendente de cada gen del fago de lisina se aíslan por amplificación de ácidos nucleicos (por ejemplo, PCR) y se clonan en un plásmido que tiene un primer marcador de selección (por ejemplo, resistencia a ampicilina) con un sitio de restricción adecuado entre las dos regiones para la inserción de un casete de ADN en el cual un marcador de selección segundo (por ejemplo GFP) se expresa de un promotor temprano del mismo fago. Este plásmido se introduce en células hospedadoras bacterianas adecuadas por transformación y selección del primer marcador de selección (ejemplificado aquí por la resistencia ampicilina). Se muestra un plásmido ejemplar con un gen de lisina mutante útil en esta técnica en la figura 1. Alternativamente el constructo del plásmido se puede integrar genómicamente en el ADN genómico del hospedador bacteriano.

65 El hospedador bacteriano que aloja al gen de lisina mutante, se infecta con un fago de tipo silvestre a una baja multiplicidad de infección. Cuando se replica el fago, alguno de los fagos se recombinan por un evento doble de

cruce con el gen de lisina mutante en el hospedador bacteriano, para producir el fago Lys menos. Ya que es probable que la recombinación en cualquier célula no se ha 100 % eficiente, puede haber un fago de tipo silvestre en las mismas células como en el fago Lys menos. El virus de tipo silvestre actuará como un virus de ayuda para provocar la lisis de las células infectadas ya sea que suceda o no la recombinación.

5 Los dos tipos de virus se recolectan al lisar las células bacterianas con cloroformo, y el fago Lys menos se purifica del virus del tipo silvestre por purificación de placas. El virus de cada placa luego se prueba para ver si es de tipo silvestre o de Lys menos. La prueba para identificar el fago Lys menos se puede lograr mediante por ejemplo, examinar la capacidad del fago de cada placa para infectar y exterminar dos tipos de células hospedadoras cuando se detectan por la formación de placas. Un tipo de célula hospedadora es la bacteria hospedadora normal (de tipo silvestre), el otro es la bacteria hospedadora de lisina de tipo silvestre antes descrita. El fago de tipo silvestre lisará efectivamente y exterminará ambos tipos de hospedadores, mientras que el fago Lys menos extermina solamente las células hospedadoras que expresan lisina.

15 En donde el fago Lys menos expresa un marcador de detección (por ejemplo, GFP), y particularmente en donde el marcador de selección se expresa a partir de un promotor temprano viral, se pueden visualizar directamente las placas fluorescentes que representan el fago Lys menos durante la purificación de placas. El fenotipo Lys menos de estos fagos puede luego confirmarse mediante separación por exclusión como se describe arriba.

20 **Generación de la lisina de tipo silvestre en el hospedador para producción de escalamiento del fago Lys menos**

25 Los fagos LYS menos se pueden replicar y ensamblar en sus bacterias hospedadoras pero por definición, no podrán lisar al hospedador y liberar de manera eficiente los fagos de la progenie. Para la producción de los fagos terapéuticos Lys menos, es esencial la liberación de los fagos modificados del hospedador bacteriano. En donde el fago Lys menos es uno en el cual gen de lisina está bajo control de un promotor inducible, se puede lograr la lisis del hospedador bacteriano al poner en contacto el fago con un agente o condición ambiental que active al promotor de inducción, con lo cual se induce la producción de lisina y la lisis consecuente de la células de bacteria del hospedador.

30 La lisis de las bacterias del hospedador y la liberación del fago Lys menos también se puede lograr al introducir un plásmido de ayuda que lleve un gen de lisina bajo un promotor de inducción en un hospedador bacteriano. Los estudios previos han demostrado que la expresión de los genes de lisis del fago lambda en *E.coli* resultan en una lisis uniformemente definida (Garrett *et al.* Mol. Gen. Genet. 182, 326,1981). Recientemente los productos del gen S y R de fago lambda (holina y lisina respectivamente) se ha usado en un sistema de lisis inducible (Jain *et al.* Infection & Immunity 68, 986, 2000). Así se pueden producir grandes cantidades de los fagos Lys menos en hospedadores adecuados que contiene un plásmido de ayuda que lleva un gen de lisina que codifica la lisosima altamente potente (por ejemplo, la lisosima T4) bajo un promotor de inducción.

40 Los genes de lisina de cualquiera de los fagos formados en secuencia se pueden aislar por técnicas de amplificación de ácidos nucleicos (por ejemplo, PCR) y clonarse en un plásmido que tiene marcador de selección (por ejemplo, resistencia a antibióticos tal como resistencia a la ampicilina) de manera que se expresa a partir de un promotor de inducción utilizando procedimientos estándar de ADN recombinantes. El gen de lisina escogido será al menos con la menor cantidad de homología con el gen de lisina del fago, para evitar la recombinación entre el fago Lys menos y el gen de lisina en la cepa del hospedador para producir recombinantes de tipo silvestre. La eficacia de la producción de solamente los fagos Lys menos se prueba y confirma que el inventario de fagos Lys menos no produce placas en una cepa del hospedador que carece del gen de lisina. Si es necesario, se puede usar una diversidad de cepas de hospedador ayuda que expresa lisina de fuentes diferentes y promotores de inducción, para encontrar empíricamente la cepa hospedadora adecuada que produce el nivel más bajo de recombinantes de tipo silvestre.

50 **Estrategias preventivas para Evitar o Prevenir la Respuesta Inmune contra los Bacteriófagos Terapéuticos.**

55 Los bacteriófagos defectuosos en la lisis de la invención, abarcan no solamente el fago que tiene un gen de lisina defectuoso, sino también el fago que es defectuoso en la maquinaria de lisis debido a defectos diferentes al gen Lys o además del gen Lys. Por ejemplo, más que ser defectuoso solamente en el gen de lisina, se pueden eliminar o alterar el gen de lisina y el gen de holina para no ser funcionales en el fago y el sistema de lisis. Tales fagos defectuosos se puede producir para expresar los componentes faltantes o defectuosos de lisis en un plásmido de ayuda en un hospedador bacteriano. Martin *et al.* (J. Bacteriol. 180,210 (1998) ha demostrado que la expresión concomitante de holina y lisina del fago de neumococos Cp-1 en *E. coli* resulta en una lisis celular. Se pueden usar estrategias similares antes descritas para evitar la generación del fago de tipo silvestre por recombinación durante la fase de producción.

65 Ya que las holinas son las proteínas que cubren membranas que permiten que las lisinas de fagos tengan acceso a la mureína de pared celular bacteriana, la eliminación o activación del gen de holina solo, también es suficiente para generar los bacteriófagos terapéuticos que carecen de un potencial de respuesta inmune. Dependiendo de la estructura y propiedades del fago específico, la eliminación o inactivación del gen de lisina, el gen de holina o ambos

se puede emplear para generar el fago terapéutico deseado.

Cualquier cepa de fago que pueda facilitar un daño directo o indirecto a bacterias (o a otros patógenos) (por ejemplo al inhibir o interferir con la transcripción y/o traducción del ADN bacteriano (por ejemplo a través de la competencia del ADN de fago para la misma maquinaria de células hospedadoras), que inhibe la replicación bacteriana y similares) se contempla como útil en la presente invención. Estos fagos que son líticos y los fagos que son lisogénicos pero pueden después convertirse en líticos se pueden adaptar para su uso en la presente invención.

Infecciones Bacterianas Afines a la Terapia de Bacteriófagos

Se puede tratar cualesquiera de diversas infecciones bacterianas usando un bacteriófago terapéutico de conformidad con la invención. La infección bacteriana se puede localizar (por ejemplo, contenida dentro de un órgano, en un sitio de herida quirúrgica o de otra herida dentro de un absceso), o puede ser sistémica (por ejemplo el sujeto es bacterémico, por ejemplo, padece de sepsis).

El sujeto a tratarse por los bacteriófagos de la presente invención, incluyen pero no se limitan al hombre, sus mascotas domésticas, ganado, peces y animales en zoológicos y parques acuáticos (tales como ballenas y delfines).

El bacteriófago genéticamente modificado Lys menos de la presente invención, se puede utilizar como una terapia autoportada o como una terapia adjunta para el tratamiento de infecciones bacterianas. Se conocen agentes antimicrobianos numerosos (incluyendo antibióticos y agentes quimioterapéuticos) que serían útiles en combinación con el bacteriófago Lys menos para el tratamiento de infecciones bacterianas. Los ejemplos de los agentes antimicrobianos adecuados y las infecciones bacterianas que se pueden tratar con los agentes antimicrobianos específicos se enlistan a continuación. Sin embargo, la presente invención no se limita a los agentes antimicrobianos enlistados a continuación como puede fácilmente determinar alguien experto en la técnica otros agentes antimicrobianos útiles en combinación con el bacteriófago Lys menos.

Patógeno	Anti-microbiano o grupo anti-microbiano
<i>E. coli</i> (infección del tracto urinario sin complicar)	Trimetoprim-sulfametoxazol (abrev. TMO-SMO), o ampicilina; cefalosporinas o ciprofloxacino de primera generación
Infección sistémica por <i>E. coli</i>	Ampicilina, o una cefalosporina de 3ra generación, aminoglicósidos, aztreonam, o un inhibidor de la penicilinas de la penicilina +a
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Cefalosporinas de 1ra generación; cefalosporinas de 3ra generación, cefotaxima, moxalactam, amikacina, cloranfenicol
<i>Shigella</i> (diversos)	Ciprofloxacina; TMO-SMO, ampicilina, cloranfenicol
<i>Salmonella typhi</i>	Cloranfenicol; ampicilina o TMO-SMO
Especies no tíficas de <i>Salmonella</i>	Ampicilina; cloranfenicol, TMO-SMO, ciprofloxacina
<i>Yersinia pestis</i>	Estreptomicina; tetraciclina, cloranfenicol
<i>Enterobacter cloacae</i>	Cefalosporinas de 3ra generación, gentamicina, o tobramicina; carbenicilina, amikacina, aztreonam, imipenem
<i>Haemophilus influenzae</i> – meningitis	Cloranfenicol o cefalosporinas de 3ra generación; ampicilina
<i>Haemophilus influenzae</i> – otras infecciones de <i>H. influenza</i>	Ampicilina; TMO-SMO, cefaclor, cefuroxima, ciprofloxacino
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> y <i>M. avium-intracellulare</i>	Isoniazid (INH) + rifampin o rifabutin, los anteriores se dan junto con pirazinamida +/- etambutol
<i>Neisseria meningitides</i>	Penicilina G; cloranfenicol, o una sulfonamida
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> : sensible a la penicilina	Penicilina G; espectinomicina, ceftriaxona
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> : resistente a la penicilina	Ceftriaxona; espectinomicina, cefuroxima o ceftioxima, ciprofloxacina
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Tobramicina o gentamicina (+/- carbenicilina, aminoglicosidas; amikacina, ceftazidima, aztreonem, imipenem
<i>Staphylococcus aureus</i> : no productor de penicilinas	Penicilina G; cefalosporinas de 1ra generación, vancomicina, imipenem, eritromicina
<i>Staphylococcus aureus</i> : productor de penicilinas	Una penicilina que resiste a penicilinas; cefalosporinas de 1ra generación, vancomicina, imipenem, eritromicina
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Penicilina G; cefalosporinas de 1ra generación, eritromicina, cloranfenicol
<i>Vibrio cholera</i>	Tetraciclina; TMO-SMO

Los bacteriófagos adecuados para su uso en el tratamiento de un sujeto, se pueden seleccionar con base en el patógeno bacteriano sospechoso que infecte al sujeto. Son bien conocidos en el arte los métodos para el diagnóstico de infecciones bacterianas. En donde tal diagnóstico involucra el cultivo de una muestra biológica del sujeto, el médico puede al mismo tiempo probar la susceptibilidad del patógeno infeccioso para inhibir el crecimiento por uno o más fagos terapéuticos que son candidatos para una terapia posterior.

El bacteriófago de la invención se puede primero evaluar para producir las bacterias objetivo bacterioestáticas en un modelo adecuado in vitro o in vivo de infección, por ejemplo, un modelo animal no humano de infección, por ejemplo, modelos de infección usando roedores (por ejemplo, ratas, ratones, hámsteres y similares), lagomorfos, caninos, bovinos, y similares. Los modelos de infección adecuados in vitro e in vivo, así como la selección de tales modelos que son adecuados son bien conocidos en el arte.

La eficacia de la terapia de bacteriófagos se puede observar de acuerdo con los métodos bien conocidos en el arte. En general, el tratamiento exitoso es aquel que resulta en la inhibición del crecimiento bacteriano, de manera de permitir que el sistema inmune del hospedador infectado facilite la depuración de las bacterias infecciosas con lo cual se reduce la carga bacteriana en el hospedador.

Además de sus usos terapéuticos in vivo, el bacteriófago de la invención también se puede usar para generar una composición inmunogénica bacteriana de célula completa incapacitada, que se puede usar como, por ejemplo, una vacuna, como se describe en la solicitud provisional de E.U. comúnmente propiedad número de serie 60/325,796 titulada "Vacunas bacterianas de células enteras incapacitadas" presentada en 27 de Septiembre de 2001, y como se describe en la solicitud de E.U. co-pendiente comúnmente en propiedad titulada "Composiciones inmunogénicas bacterianas de célula entera incapacitada", presentadas en la misma fecha con la presente y que reclaman prioridad con la solicitud provisional antes mencionada, archivo del abogado No. GANG-002. Por "incapacitado" significa que la célula bacteriana esta en un estado de bacteriostasis irreversible. Aunque la bacteria conserve su estructura, y conserve así la inmunogenicidad, antigenicidad e interacciones ligando receptor asociadas a una bacteria de tipo silvestre, no puede replicarse debido a la presencia de un fago infeccioso con una célula bacteriana. Tales vacunas son útiles en la obtención de una respuesta inmune terapéutica o profiláctica contra el patógeno bacteriano a partir del cual se hace la vacuna.

Formulaciones, Vías de Administración y Dosis

El bacteriófago de la invención se puede formular de cualquier forma adecuada que suministre la administración del bacteriófago al sitio de la infección, y que mantenga la capacidad del fago para infectar e inhibir la replicación de la célula hospedadora bacteriana.

Formulaciones y composiciones farmacéuticas

La invención contempla además composiciones farmacéuticas que comprenden al menos un bacteriófago de la invención, suministrado en un excipiente farmacéuticamente aceptable. Las formulaciones y composiciones farmacéuticas de la invención, contemplan así formulaciones que comprenden un bacteriófago aislado específico para un hospedador bacteriano; una mezcla de dos, tres, cinco, diez, veinte o más bacteriófagos que infectan al mismo hospedador bacteriano; y una mezcla de dos, tres, cinco, diez o veinte o más bacteriófagos que infectan hospedadores bacterianos diferentes o cepas diferentes del mismo hospedador bacteriano (por ejemplo, una mezcla de un bacteriófago que infecta colectivamente e inhibe el crecimiento de cepas múltiples de *Staphylococcus aureus*). De esta manera, las composiciones de la invención se pueden diseñar a las necesidades del paciente.

Diversos excipientes farmacéuticamente aceptables son bien conocidos en el arte. Como se usa en la presente, "excipiente farmacéuticamente aceptable", incluye cualquier material el cual cuando se combina con un ingrediente activo de una composición, permite que el ingrediente conserve su actividad biológica y sin provocar reacciones de disrupción con el sistema inmune del sujeto.

Los portadores farmacéuticamente ejemplares incluyen soluciones, suspensiones y emulsiones acuosas o no acuosas. Los ejemplos incluyen pero no se limitan a, alguno de los excipientes farmacéuticos estándar tales como solución salina amortiguada de fosfato, agua, emulsiones tal como emulsión de aceite/agua y diversos tipos de agentes humectantes. Los ejemplos de los solventes no acuosos son propilen glicol, polietilen glicol, aceites vegetales, tales como aceite de olivo y ésteres orgánicos inyectables tales como el oleato de etilo. Los portadores acuosos incluyen soluciones acuosas/alcohólicas, agua, emulsiones o suspensiones, incluyendo medios salinos y amortiguados. Los vehículos parenterales incluyen solución de cloruro de sodio, dextrosa de Ringer, cloruro de dextrosa y de sodio, aceites fijos o de Ringer lactados. Los vehículos intravenosos incluyen re-abastecedores de fluidos y nutrientes, re-abastecedores de electrolitos (tales como aquellos basados en la dextrosa de Ringer) y similares.

Una composición que comprende un bacteriófago de la invención, también se puede liofilizar usando medios bien conocidos en el arte, para la reconstitución posterior y uso.

Son también de interés, las formulaciones para la administración liposomal, y formulaciones que comprenden el bacteriófago microencapsulado. Las composiciones que comprenden tales excipientes se formulan por métodos convencionales bien conocidos (ver, por ejemplo, Remington Pharmaceutical Sciences, Capítulo 43, 14a Ed. Mack Publishing Co., Easton PA 18042, USA).

5 En general, se pueden preparar las composiciones farmacéuticas en diversas formas tales como gránulos, tabletas, píldoras, supositorios, cápsulas (por ejemplo, adaptadas para administración oral) micro-perlas, micro-esferas, liposomas, suspensiones, ungüentos, lociones y similares. Los portadores y/o diluyentes orgánicos o inorgánicos de grado farmacéutico, adecuados para uso oral y tópico se pueden usar para elaborar composiciones que comprenden
10 los compuestos terapéuticamente activos. Los diluyentes conocidos en el arte incluyen medios acuosos, aceites animales y vegetales y grasas. Los agentes estabilizantes, agentes emulsificantes y humectantes, sales para variar la presión osmótica o amortiguadores para asegurar un valor adecuado de pH.

15 La composición farmacéutica puede comprender otros componentes además del bacteriófago. Además, las composiciones farmacéuticas pueden comprender más de un bacteriófago, por ejemplo dos o más, tres o más, cinco o más, o diez o más bacteriófagos diferentes, en donde el bacteriófago diferente puede ser específico para bacterias iguales o diferentes. Por ejemplo, la composición farmacéutica puede contener múltiples bacteriófagos definidos Lys menos (por ejemplo al menos dos o más) en donde al menos dos de los fagos en la composición tienen una especificidad de hospedador bacteriano diferente. De esta manera, la composición del bacteriófago Lys menos se
20 puede adaptar para el tratamiento de una infección mixta de bacterias diferentes, por ejemplo, al seleccionar grupos diferentes de bacteriófagos de especificidad diferente, de manera de contener al menos un bacteriófago para cada bacteria (por ejemplo, cepa, especie, etc.) que se sospecha que está presente en la infección (por ejemplo, en el sitio infectado). Como se observa arriba, se puede administrar el bacteriófago en conjunto con otros agentes, tal como el agente antimicrobiano convencional (ver la tabla anterior). En algunas modalidades, puede ser deseable
25 administrar el bacteriófago y el antibiótico dentro de la misma formulación.

Dosis y vías de administración

30 La dosis y vía de administración variará con las bacterias infecciosas, el sitio y grado de la infección (por ejemplo, local o sistémico), y el sujeto a tratarse. Las vías de administración incluyen, pero no se limitan a oral, aerosol u otro dispositivo para administración a los pulmones, rocío nasal, intravenoso (IV), intramuscular, intraperitoneal, intratecal, vaginal, rectal, tópico, punción lumbar intratecal y aplicación directa al cerebro y/o meninges. Los excipientes que se pueden usar como un vehículo para la administración del fago serán evidentes para aquellos expertos en la técnica. Por ejemplo, el fago libre puede estar en forma liofilizada y disolverse justo antes de la
35 administración por inyección IV. La dosis de administración se contempla que este en el rango de alrededor de 1 millón alrededor de 10 trillones/por kg/por día, y preferiblemente alrededor de 1 trillón/ por kg/por día, y puede ser desde alrededor de 10^6 pfu/kg/día hasta alrededor de 10^{13} pfu/kg/día.

40 Los fagos se administran hasta que se alcanza la eliminación exitosa de las bacterias patogénicas. Así, la invención contempla formas de dosis sencillas así como formas de dosis múltiples de las composiciones de la invención, así como métodos para lograr la administración de tales formas sencillas y multidosis.

45 Con respecto a la administración en aerosol a los pulmones, el fago modificado Lys menos se incorpora en una formulación en aerosol diseñada específicamente para la administración a los pulmones por inhalación. Se conocen en el arte muchos de tales aerosoles, y la presente invención no se limita a alguna formulación en particular.

Ejemplos

50 Las modalidades anteriores de la presente invención, se describen además en los siguientes ejemplos. Se han hecho esfuerzos para asegurar la precisión con respecto a los números usados (por ejemplo, cantidades, temperatura, etc.) pero se debe tener en cuenta algunos errores y desviaciones experimentales. A menos que se indique de otra manera, las partes son partes en peso, el peso molecular es peso molecular promedio en número, la temperatura esta en grados centígrados y la presión es de o cercana a la atmosférica.

Ejemplo 1: Creación del fago T4 Lys menos

La secuencia de nucleótidos del gen de lisozima (e) del bacteriófago T4, junto con 130 nucleótidos adicionales a cada lado, se reporta por Owen *et al* (J. Mol. Biol. 165, 229, 1983). Los ADN que corresponden a los nucleótidos de las regiones de dirección ascendente y dirección descendente del gen e, se aíslan por PCR y se clonan en el
60 plásmido de resistencia a la ampicilina pUC 18 con sitios únicos de restricción (Xba I y Pst I) entre las dos regiones ((Sambrook, J. *et al* Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.). Un casete de ADN que contiene el gen para una forma mutante de la proteína fluorescente verde (GFP) que tiene una fluorescencia 40 veces más brillante que la proteína de tipo silvestre, se genera como un fragmento Xba I-Pst I a partir del plásmido pmut2 que lleva gfp (Cormack, B.P., Valdivia, R.H. y Falkow, S. Gene
65 173, 33, 1996), y se introduce entre las secuencias de la dirección ascendente y dirección descendente del gen de lisozima en pUC18(pGG8). El promotor y terminador para la expresión de GFP en este casete se reemplaza por el

promotor temprano del gen de la dihidrofolato reductasa T4 *frd* (Rosenberg, M. y Court, D. Ann. Rev. Genet. 13, 319, 1979) en la terminación 5', y el terminador de la transcripción situado entre los genes 44 y 45 de T4 (Spicer y Konigsberg in Bacteriophage T4 eds. Mathews, Kutter, Mosig y Berget, American Society for Microbiology, Washington, DC, 1983, pp. 299) en la terminación 3' respectivamente. El promotor *frd* está en la clase temprana inmediata de los promotores T4 que son los primeros a expresarse en células bacterianas infectadas con T4. Se usa la polimerasa del ARN del hospedador para la transcripción desde este promotor.

Este plásmido pGG8 se transforma en células de *E.coli* HB101 por el método RbC1 y se selecciona para resistencia a la ampicilina. Las células de *E.coli* HB101 que portan el plásmido pGG8 con el gen de lisozima mutante, se infectan entonces con el fago T4 de tipo silvestre a una multiplicidad baja de infección. Durante la replicación, algunos se recombinan con el gen de lisozima mutante llevado en el plásmido en las células para proporcionar el fago Lys menos. Es posible que la recombinación en cualquier célula no será 100 % eficiente. Ambos tipos de fagos se colectan al lisar las células bacteriales con cloroformo, y el fago Lys menos se separa del tipo silvestre por purificación de placa. Cada placa se prueba entonces para ver si es del tipo silvestre o Lys menos. Los fagos Lys menos pueden identificarse por la fluorescencia verde de las placas de replicado bajo luz UV ya que el GFP se expresa bajo el promotor temprano T4. Esto se puede confirmar además al probar el fago de cada placa en *E.coli* HB101 así como células que expresan el gen de *lisina* descrito abajo. Mientras que el fago de tipo silvestre elimina ambos hospedadores, el fago Lys menos sólo elimina las células hospedadoras que expresan la lisina.

Ejemplo 2: Producción del fago T4 Lys menos en *E.coli*

El sistema de lisis de dos genes del fago neumococal Cp-1, se ha clonado y expresado en *E.coli* (Martín *et al.* J. Bacteriol. 180, 210 (1998). El ADN Cp-1 que usa PCR como plantilla, genera fragmentos de ADN que contienen el gen *cpl1*(*lisina*) o los genes de casete *cph1-cpl1*(*holin-lisina*), en los cuales los genes mantienen sus propios sitios enlazados a la ribosoma. Con el uso de los oligonucleótidos apropiados, se crean los sitios de restricción *Sac II* y *Sac I* en los extremos 5' y 3' de los fragmentos PCR para clonarse en el pNM185 plásmido (Mermod *et al.* J. Bacteriol. 167, 447 (1986)). El gen *cpl1* o el casete que contiene los genes *cph1* y *cpl1* se expresan bajo el control de un promotor positivamente regulado (*Pm*) del operón de trayectoria meta del plásmido TOL. La transcripción de los genes de *Pm* se induce específicamente por el producto del gen regulador *xylS* solamente cuando las moléculas efectoras tipo 3-metil benzoato se presentan. La transformación de células de *E. coli* HB101 con los plásmidos pNM185 que llevan el casete *cpl1* o *cph1-cpl1*, se lleva a cabo por el método RbCl ((Sambrook *et al.* Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2da ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)). Las células de *E.coli* HB101 transformadas se hacen crecer en caldo LB u otro medio apropiado, y se inocula con el fago T4 Lys menos. Al momento apropiado, la expresión del casete *cpl1* o el *cph1-cpl1* en el plásmido pNM185 se induce por la adición de 3-metil benzoato 2mM para efectuar la liberación de la progenie del fago T4 Lys menos.

Ejemplo 3: Creación del plásmido pGMB021 para usar en la generación del fago recombinante Lys menos

Materiales y Métodos. La polimerasa de ADN Tag, dNTP, Fosfatasa Intestinal de Becerro, enzimas de restricción, cebadores y ligasa de ADN T4, se procuran de Bangalore Genei Pvt. Ltd (BGPL), Bangalore. Los vectores pRSET fueron de Invitrogen Ltd, USA.

Las ligaduras se realizan con la relación vector:inserto de 1:10M. Los productos PCR junto con los vectores digeridos se purifican de gel de agarosa usando los reactivos del kit de extracción en gel Qiagen salvo que se mencione de otra manera.

Construcción del clon de lisozima T4 en promotor T7 con base en el vector pRSETB (pRSETB-T4L). La amplificación PCR del gen de lisina de T4 se realiza con el fago T4 de tipo silvestre obtenido de BGPL, usando los siguientes cebadores:

GMB1: Directo 5' CG GAA TTC CAT ATG AAT ATA TTT GAA ATG TTA CGT 3' (SEC ID N°: 1)
 GMB2: Inverso 5' AA AGC GGC CGC AAG CTT TAG ATT TTT ATA CGC GTC CCA 3' (SEC ID N°: 2).

La desnaturalización inicial fue a 95 °C durante 4 minutos, seguido por 30 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 30 segundos, recociendo a 55 °C durante 30 segundos, y una extensión a 72 °C durante 30 segundos. Los contenidos se extendieron finalmente durante 7 minutos a 72 °C.

A continuación, el producto PCT obtenido se purificó y se rellenó con Klenow en el ligado anterior al vector pRSETB digerido con PvuII y desfosforilado con CIP. La relación vector a inserto se mantiene a 1:10M. El ligado se realiza a 22 °C durante 5 horas y luego se transforman células competentes DH5 alfa con la mezcla de ligado anterior. Los transformantes se seleccionan entonces en una placa LB amp (concentración final 100 ug/ml) a 37 °C durante la noche. Los transformantes se tamizan por PCR de colonia de acumulados y los clones positivos se revisan entonces para digestión por restricción después del aislado del ADN.

El ADN de los clones positivos se secuenció por ABI Prism de Pharmacia. El clon anterior expresa la proteína lisozima T4 como se observa en el gel SDS-PAGE. La proteína fue una proteína de lisina etiquetada His de 25 Kda

como se espera (ver Figura 2, pistas 1 y 2). PGMB011 se selecciona para uso adicional.

Construcción de GFP como su proteína de fusión tag en el vector pRSETA (pSETA-GFP). Para interrumpir el gen de lisina con el gen reportero, se elige el gen GFP. Primero, el gen GFP se amplifica del plásmido pUC-GFP en el kit de enseñanza GFP de BGPL, usando los siguientes cebadores:

GMB5: Directo 5' CC GGA ATT CAT ATG AGT AAA GGA GAA GAA CTT TTC 3' (SEC ID N°: 3)

GMB6: Inverso 5' CC GGA ATT CAT TTA TTT GTA TAG TTC ATC CAT GCC 3' (SEC ID N°: 4).

10 La desnaturalización inicial fue a 95 °C durante 4 minutos, seguido por 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 30 segundos, combinando los pares base a 60 °C durante 30 segundos, y una extensión a 72 °C durante 30 segundos. La extensión final fue a 72 °C durante 7 minutos. El producto purificado se digirió con EcoR1 y luego se ligó con pRSETA cortado con EcoR1.

15 Los clones se separaron por exclusión por PCR de colonia de acumulados para GFP y la expresión de escala pequeña de GFP se observa en SDS-PAGE. Todos los clones se revisaron bajo luz UV para la fluorescencia GFP que indica que el clon tiene GFP en la orientación correcta con respecto al promotor T7. El tamaño de la proteína GFP fue de 36 KDa como se espera.

20 *Interrupción del gen de lisina T4 con GFP en la estructura con la terminal 5' del gen de lisina T4 para el constructo pGMB021.* El fragmento GFP del clon pRSETA-GFP se subclona entonces en pGMB011 parcialmente digerido (un vector pRSETB-T4L producido arriba) con EcoR1. Los transformantes se separaron por exclusión para PCR con GMB5/GMB6 y luego se revisaron por expresión de escala pequeña de la proteína de fusión GFP-lisina etiquetada his. La proteína de fusión GFP-lisina etiquetada His expresada del clon anterior (42 KDa) (ver Figura 2, pistas 3 y 4) y su fluorescencia mostrada bajo luz UV, indica que el gen GFP estaba intacto en este constructo.

30 El clon anterior se probó además para PCR con cebadores GMB1/GMB2 (cebadores específicos de lisina T4). Como se espera, el PCR con GMB1/GMB2 dio un producto de lisina-GFP-lisina de aproximadamente 1200 pb que muestra lo intacto de la lisina y genes GFP (Figura 3). Este clon se usó en el experimento recombinante descrito en el Ejemplo 4 abajo.

Ejemplo 4: Generación y aislado del fago recombinante Lys menos

35 Se infectan células DH5α que contienen el plásmido pGMB021 (que contienen el gen de lisina defectuoso con la inserción de GFP) con el fago T4 de tipo silvestre a 2,5 m.o.i. Esta alta multiplicidad de infección asegura que cada célula se infecta con al menos un fago. La infección de las células pGMB021-DH5α resulta en la producción del fago deficiente en lisina como se describe en el Ejemplo 3 anterior. Después de 40 minutos de incubación, se agrega cloroformo (1 %) y el lisado se centrifuga. Se separa el sobrenadante y se coloca al aire durante 30 minutos a temperatura ambiente para evaporación del cloroformo residual.

40 El lisado se trata con DNasa (50 ug/ml) durante 30 minutos a 37 °C para digerir el ADN cromosomal y plásmido, y luego se titula. A continuación, se infectan células de *E. coli* (que no portan plásmido) con el lisado a 0,1 m.o.i. Esta baja multiplicidad de infección asegura que todas las células infectadas contienen un fago sencillo, lo que a su vez sirve para separar el fago deficiente en lisina y los fagos de tipo silvestre.

45 La mezcla de infección anterior se incubaba a 37 °C durante 30 minutos y luego se centrifuga. El pelletizado celular y el sobrenadante se separa. Las células que contienen el fago Lys menos no se lisan y, por lo tanto, se presentan en el pelletizado celular junto con células no infectadas. Se descarta el sobrenadante, como esta fracción es posible que contenga la mayoría de los fagos de tipo silvestre. El pelletizado se vuelve a suspender entonces en el medio de cultivo (Caldo Luria) y se lisa con lisozima de huevo blanco (100ug/ml) y cloroformo (2 %). Este lisado se usa para infectar células E BL21(DE3) a 0,1 m.o.i., y se planta en un tramo de las mismas células. Estas células se eligen específicamente para esta etapa ya que expresan constitutivamente, de un plásmido, la lisozima del fago T7 y deberían ayudar al fago Lys menos a formar placas.

55 Dos tipos de placas se aprecian en el plato, varias placas de tipo silvestre y algunas placas de minuto o punta de alfiler. Las placas de punta de alfiler se pinchan y vuelven a suspender en el medio de cultivo. A continuación, éstas se permite que infecten células BL21(DE3) pLysE y luego se plantan en una mezcla 1:1 de células BL21(DE3)pLysE (que hacen la lisozima T7) y células LE392 (sin lisozima).

60 Las áreas turbias que representan el fago recombinante se distinguen entre las placas de tipo silvestre en el tramo de la mezcla de células. Estas áreas turbias se recogen. Una parte se vuelve a suspender en agua para PCR y el resto se vuelve a suspender en un medio de cultivo. El producto de gen GFP fue amplificable de muchas de las placas turbias (Figura 4).

65 La lisina-GFP-lisina T4 de longitud completa también se amplifica. Sin embargo, el producto de gen de lisina de tipo silvestre también se presenta, lo que indica la presencia del fago de tipo silvestre (Figuras 5 y 6). La eliminación

- 5 selectiva del fago de tipo silvestre de estos lisados se da al infectar células a un bajo m.o.i. y la lisis de las células a 40 minutos. En este momento, el fago de tipo silvestre debería tener otra ronda de entrada de infección y deberá estar en etapa de eclipse (en forma de ADN). La lisis de las células destruye de esta manera el fago de tipo silvestre antes de ensamblarse en partículas. Después de 3-5 rondas de tal eliminación, los lisados fueron menos placas (Figura 7). La confirmación de la presencia del fago Lys menos recombinante en tales lisados, y la cuantificación se da al estimar el número de células viables después de la infección. La pérdida de viabilidad de las células infectadas fue evidente durante el plantado de la mezcla de infección (Figura 8).
- 10 Con objeto de enriquecer el fago Lys menos recombinante y evitar el uso de cloroformo y complementación externa de lisizima, se usa un tipo de célula de *E.coli* mutante sensible a la temperatura (RE 7) (que crece a 30 °C y se lisa a 42 °C). El enriquecimiento del fago Lys menos recombinante al nivel de alrededor de 2×10^9 /ml se alcanza. Esta preparación se evalúa para su eficacia en eliminar la infección de *E.coli* en un modelo de ratón de infección disponible en el arte.
- 15 Se hace constar que con relación a esta fecha, el mejor método conocido por la solicitante para llevar a la práctica la citada invención, es el que resulta claro de la presente descripción de la invención.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 20 <110> Gangagen, Inc.
 <120> Bacteriófagos deficientes en lisina que tienen inmunogenicidad reducida
 <130> AHB/FP6217400
- 25 <140> EP 02776032.1
 <141> 27-09-2002
 <150> PCT/US02/30846
 <151> 27-09-2002
- 30 <150> US 60/325.803
 <151> 27-09-2001
- 35 <160> 4
 <170> FastSEQ para Windows Versión 4.0
- 40 <210> 1
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
- 45 <220>
 <223> cebador
 <400> 1
 cggaattcca tatgaatata ttgaaatgt tacgt 35
- 50 <210> 2
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
- 55 <220>
 <223> cebador
 <400> 2
 aaagcggccg caagctttag atttttatac gcgtccca 38
- 60 <210> 3
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
- 65

ES 2 559 668 T3

<220>
<223> cebador

5 <400> 3
ccggaattca tatgagtaaa ggagaagaac ttttc 35

10 <210> 4
<211> 35
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

15 <220>
<223> cebador
<400> 4
ccggaattca tttattgta tagttcatcc atgcc 35

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un bacteriófago defectuoso en lisis para uso en un método para inhibir el crecimiento de bacterias patógenas presentes en un sujeto, en donde el bacteriófago se administra en una cantidad eficaz para inhibir el crecimiento de las bacterias patógenas en el sujeto y en donde el bacteriófago defectuoso en lisis tiene un gen *lisina* suprimido o inactivado o un gen *holina* suprimido o inactivado.
- 10 2. Un bacteriófago defectuoso en lisis para uso en un método para tratar una infección bacteriana en un sujeto para proporcionar eliminación de bacteriófagos reducida por el sistema inmunitario del sujeto, en donde:
- 15 (a) el bacteriófago se administra en una cantidad eficaz para inhibir el crecimiento de las bacterias patógenas en el sujeto;
- (b) el bacteriófago defectuoso en lisis tiene un gen *lisina* suprimido o inactivado o gen *holina* suprimido o inactivado; y
- 20 (c) el bacteriófago defectuoso en lisis no provoca lisis significativa de las bacterias patógenas, reduciendo de este modo el número de bacteriófagos expuestos a una respuesta inmunitaria por parte del sujeto y proporcionando eliminación reducida del bacteriófago en relación con la asociada a un bacteriófago de tipo silvestre.
- 25 3. El bacteriófago para uso de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde la carga bacteriana se reduce en el sujeto y se trata la infección bacteriana.
4. El bacteriófago para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde las bacterias son bacterias resistentes a fármacos.
- 30 5. El bacteriófago para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la infección bacteriana es en un sitio local.
6. El bacteriófago para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la infección bacteriana es sistémica.
- 35 7. El bacteriófago para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde la bacteria es de un género seleccionado del grupo que consiste en *Micobacteria*, *Estafilococos*, *Vibrio*, *Enterobacter*, *Enterococcus*, *Escherichia*, *Haemofilus*, *Neisseria*, *Pseudomonas*, *Shigella*, *Serratia*, *Salmonella*, *Streptococcus*, *Klebsiella* y *Yersinia*.
- 40 8. Una composición farmacéutica que comprende un bacteriófago defectuoso en lisis y un vehículo farmacéuticamente aceptable, para uso en un método para inhibir el crecimiento de bacterias patógenas presentes en un sujeto, en donde el bacteriófago está presente en una cantidad eficaz para inhibir el crecimiento de las bacterias patógenas en el sujeto, y en donde el bacteriófago defectuoso en lisis tiene un gen *lisina* suprimido o inactivado o un gen *holina* suprimido o inactivado.
- 45 9. La composición para uso de acuerdo con la reivindicación 8 en donde la composición está en forma liofilizada.
- 50 10. La composición para uso de acuerdo con la reivindicación 8 que comprende una mezcla de dos o más bacteriófagos defectuosos en lisis que infectan el mismo hospedador bacteriano.
11. La composición para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 9 que comprende una mezcla de dos o más bacteriófagos defectuosos en lisis diferentes que infectan diferentes hospedadores bacterianos o diferentes cepas del mismo hospedador bacteriano.
- 55 12. El bacteriófago para uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, o la composición para uso de acuerdo con la reivindicación 8, en donde el bacteriófago defectuoso en lisis tiene una *lisina* suprimida o inactivada.
13. El bacteriófago para uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, o la composición para uso de acuerdo con la reivindicación 8, en donde el bacteriófago defectuoso en lisis tiene un gen *holina* suprimido o inactivado.

FIG. 1

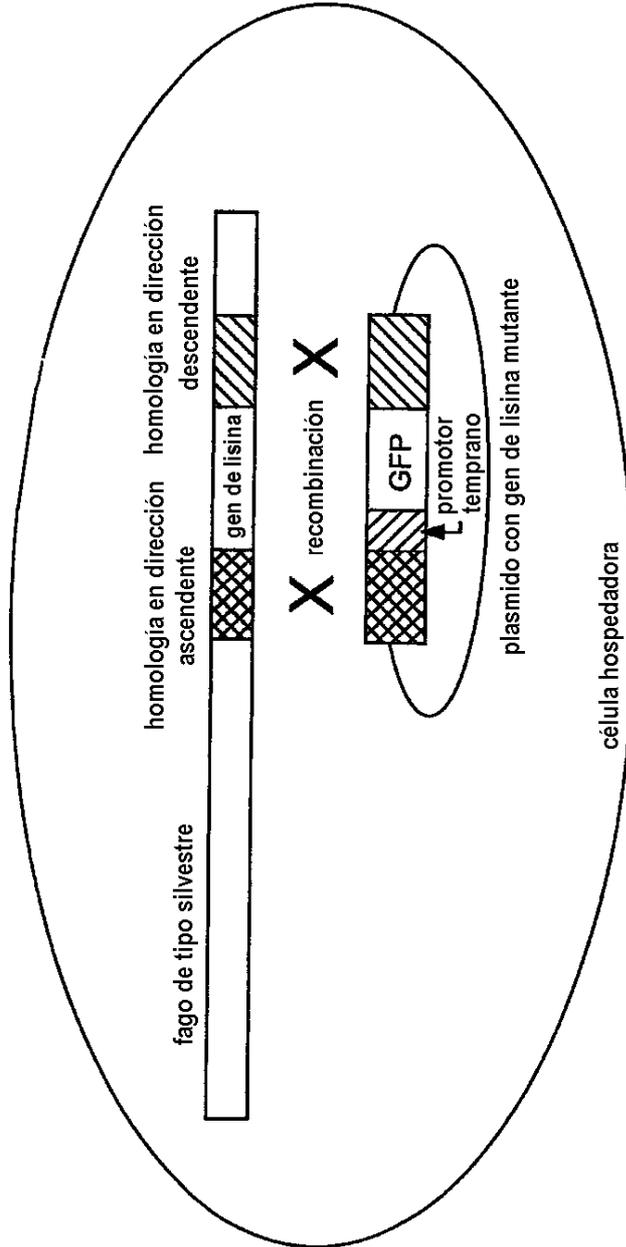


FIG. 2

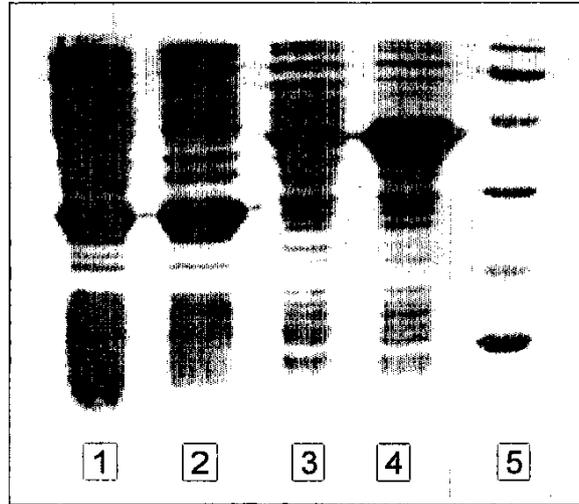


FIG. 3

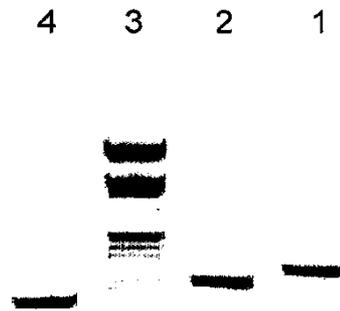


FIG. 4

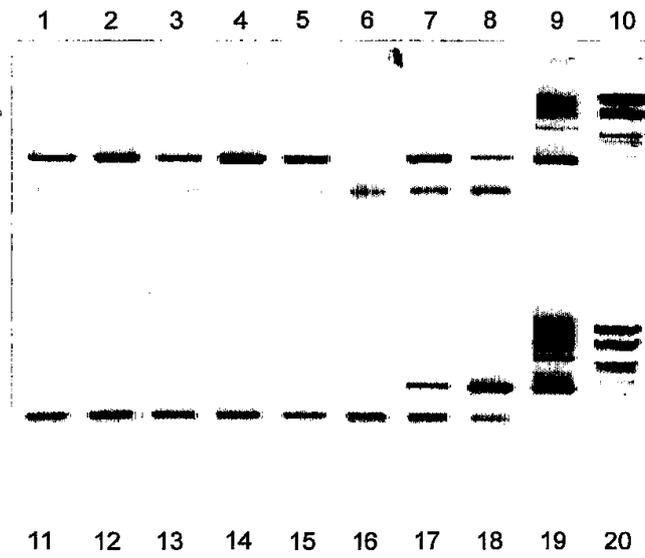


FIG. 5

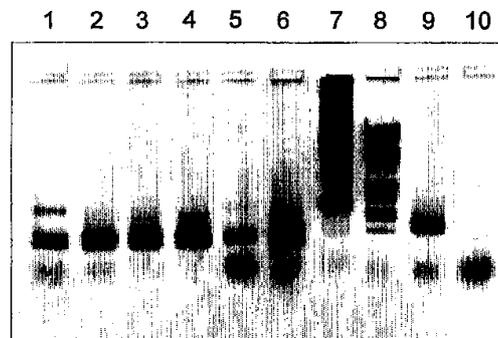


FIG. 6

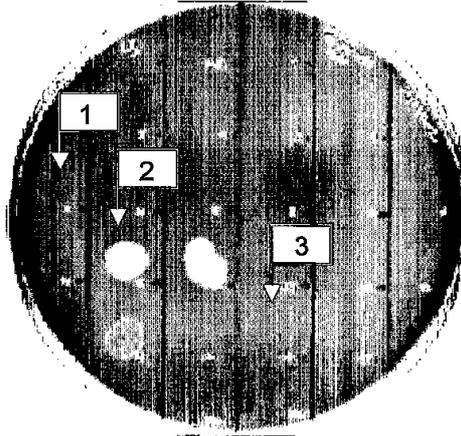


FIG. 7

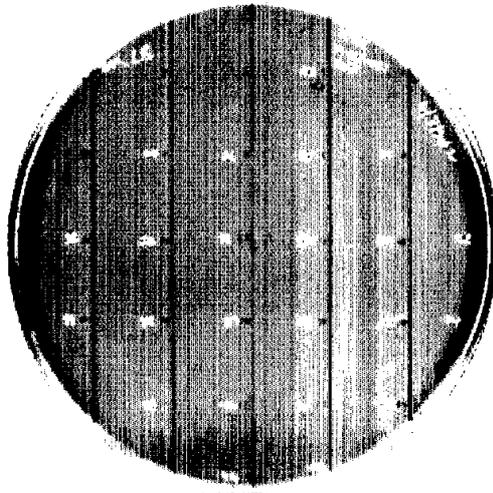


FIG. 8

