

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 589 909**

51 Int. Cl.:

A61K 35/76 (2015.01)

A61K 31/7036 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.03.2008 PCT/GB2008/050162**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.09.2008 WO08110840**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.03.2008 E 08709681 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.06.2016 EP 2136826**

54 Título: **Efectos beneficiosos de tratamientos con bacteriófagos**

30 Prioridad:

09.03.2007 GB 0704553

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

17.11.2016

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

HARPER, DAVID

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 589 909 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

Efectos beneficiosos de tratamientos con bacteriófagos.

5 Campo de la invención

[0001] La presente invención se refiere a la sensibilización de bacterias previamente resistentes a antibióticos después de un tratamiento con bacteriófagos. En particular, la invención proporciona en su aspecto preferido la preparación y la administración de medicamentos terapéuticos que usan unos tratamientos secuenciales con bacteriófagos y con antibióticos convencionales, para ser usados en infecciones en animales y en seres humanos causadas por bacterias patógenas.

Antecedentes de la invención

15 **[0002]** Actualmente la resistencia a los antibióticos se contempla como uno de los principales retos que afronta la medicina moderna. Dada la escasez de nuevos antibióticos, se están investigando diversas nuevas estrategias, incluyendo el uso de bacteriófagos como agentes terapéuticos (Barrow & Soothill, Trends in Microbiology (1997), 5, 268-271; Dixon B, The Lancet Infectious Diseases (2004), 4, 186; Hausler T, Viruses vs. Superbugs: A Solution to the Antibiotics Crisis? (2006) MacMillan, Nueva York; Matsuzaki et al, Journal of Infection and Chemotherapy (2005), 11, 211-219.

25 **[0003]** Los bacteriófagos (a menudo conocidos simplemente como "fagos") son virus que crecen en el interior de las bacterias. El nombre se traduce como "comedores de bacterias" y refleja el hecho de que según crecen, la mayoría de los bacteriófagos destruyen el hospedador bacteriano según se libera la siguiente generación de bacteriófagos. Los trabajos tempranos con bacteriófagos se vieron obstaculizados por muchos factores, uno de los cuales era la extendida creencia de que sólo había un tipo de bacteriófago, un virus no específico que destruía todas las bacterias. De hecho, el intervalo de hospedadores de los bacteriófagos (el espectro de bacterias que son capaces de infectar) es a menudo muy específico. Esta especificidad puede considerarse una fortaleza terapéutica ya que las poblaciones de bacteriófagos puede ser seleccionadas para eliminar específicamente únicamente la especie bacteriana objetivo.

35 **[0004]** A pesar de las ventajas terapéuticas proporcionadas por la especificidad de hospedador de los bacteriófagos, esta característica tiene el inconveniente de que puede ser difícil conseguir una ampliación de la cobertura de cepas objetivo. Por esta razón, se ha despertado un interés en encontrar combinaciones de bacteriófagos que tengan una amplia capacidad de direccionamiento en relación con tipos particulares de infecciones bacterianas (véase, por ejemplo, Pirsí, The Lancet (2000) 355, 1418). Ahora esto se ha conseguido con el desarrollo de una mezcla de seis bacteriófagos dirigidos a *Pseudomonas aeruginosa*, que ha completado los ensayos en el ámbito veterinario y que ahora está en ensayos clínicos con seres humanos (Soothill et al Lancet Infectious Diseases (2004) 4, 544-545). El reto es ahora desarrollar unos regímenes que optimicen la administración de dichas terapias.

45 **[0005]** Las terapias con bacteriófagos y antibióticos se han usado previamente conjuntamente en Europa oriental (véase, por ejemplo, Bradbury, The Lancet (febrero de 2004) 363, 624-625), pero sin ninguna notificación específica de efectos sinérgicos. De hecho, ha habido sugerencias sobre que los antibióticos pueden tener efectos adversos en el uso de una terapia con un bacteriófago, dado que los bacteriófagos usan el metabolismo bacteriano para replicarse, y esto es inhibido por los antibióticos (Payne y Janssen, Clinical Pharmacokinetics (2002) 42, 315-325).

50 **[0006]** Más recientemente se ha demostrado que los bacteriófagos producen beneficios cuando se mezclan con bacterias patógenas cultivadas en una biopelícula (Soothill et al, 2005, solicitud de patente PCT WO2005009451). En esta solicitud se demuestra un beneficio con respecto al posterior tratamiento con antibióticos de infecciones por bacterias heterólogas, aparentemente mediante una desestabilización de la biopelícula después del tratamiento con el bacteriófago.

55 **[0007]** Ahora se sabe que la formación de una biopelícula es una característica de muchas bacterias patógenas importantes que contribuye a un aumento en la resistencia a los antibióticos. Dichas biopelículas pueden comprender más de un tipo de bacteria apoyada y rodeada por una matriz extracelular excretada y que ayuda a la bacteria a colonizar las superficies, desde arrecifes marinos hasta el esmalte dental. Las biopelículas permiten que las bacterias se adhieran a las superficies y alcancen unas densidades de población que de otro modo no serían

soportables. Imparten un aumento en la resistencia no sólo a los antibióticos, sino también a muchos estreses medioambientales que incluyen toxinas tales como metales pesados, desinfectantes y otros agentes limpiadores. Previamente se pensaba que la contribución de la formación de una biopelícula a la resistencia a un antibiótico era fundamentalmente un proceso físico que surge de una limitación en la difusión, pero pruebas más recientes han demostrado que algunas biopelículas parecen tener una capacidad específica para atrapar antibióticos (Mah et al., Nature (2003) 426, 306-310). Se sabe que las bacterias de las biopelículas pueden ser entre 100 y 1.000 veces más resistentes a los antibióticos que la misma cepa bacteriana creciendo en forma de células individuales ("planctónica"). Este aumento en la resistencia significa que las bacterias que aparentemente son sensibles a los antibióticos en un ensayo de laboratorio, pueden ser resistentes a una terapia en un contexto clínico. Incluso si se eliminan algunas, las biopelículas pueden proporcionar depósitos de resistencia que permiten una rápida colonización una vez que los antibióticos ya no están presentes. Por lo tanto, está claro que las biopelículas son unos factores importantes en muchas enfermedades humanas.

[0008] Como se ha mencionado anteriormente, se han observado unos mayores efectos beneficiosos con el posterior uso de antibióticos frente a infecciones mixtas después del uso de una preparación terapéutica de un bacteriófago frente a *Pseudomonas aeruginosa*, y se ha propuesto que esto es debido a la destrucción de *Pseudomonas aeruginosa*, la especie clave para el mantenimiento de la biopelícula (Soothill et al, 2005, solicitud de patente PCT WO2005009451), que da como resultado una pérdida en la integridad de la biopelícula, y por lo tanto, una exposición de las bacterias a los antibióticos convencionales.

[0009] Las enseñanzas de la solicitud de patente PCT WO2005009451 son contra el uso de antibióticos que son activos específicamente frente a la misma especie bacteriana a la que se dirige el bacteriófago. Los ejemplos citados se refieren al uso de Synulox (amoxicilina y ácido clavulánico) y/o de gotas óticas Canaural (que contienen fusidato de dietanolamina, sulfato de frameticina, nistatina y prednisolona). Ambas preparaciones contienen únicamente antibióticos que no son eficaces frente a *Pseudomonas aeruginosa* (Krogh et al, Nordisk Veterinaer Medicin (1975) 27, 285-295; Kucers A, en Kucers et al (eds), The Use of Antibiotics: A Clinical Review of Antibacterial, Antifungal and Antiviral Drugs, quinta edición (1997), Butterworth-Heinemann, Oxford; Rawal, Journal of Antimicrobial Chemotherapy (1987) 20, 537-540). En particular, mientras que los antibióticos aminoglucósidos como clase son eficaces frente a *Pseudomonas aeruginosa*, la frameticina tiene una eficacia muy limitada. Kucers aprecia que "prácticamente todas las bacterias aerobias gramnegativas médicamente importantes son sensibles" (a la neomicina, la frameticina y la paromomicina) "con la excepción de *Pseudomonas aeruginosa*", mientras que el mismo autor indica que "*Pseudomonas aeruginosa* es resistente a co-amoxiclav, mencionando el trabajo de Comber et al, en Rolinson & Watson Augmentin (eds) (1980), Excerpta Medica, Ámsterdam, pág.19. La co-amoxiclav se define en la 52ª edición en línea del British National Formulary (www.bnf.org) como "una mezcla de amoxicilina (en forma del trihidrato o de la sal de sodio) y ácido clavulánico (en forma de clavulanato de potasio), equiparándola al fármaco veterinario Synulox. Por lo tanto, la solicitud de patente PCT WO2005009451 no indicaría el uso de antibióticos dirigidos a *Pseudomonas* en ninguna combinación con bacteriófagos, sino más bien el uso de antibióticos dirigidos específicamente a las bacterias co-infectantes.

[0010] Recientemente se ha identificado otro mecanismo mediante el cual los bacteriófagos pueden aumentar la sensibilidad de las bacterias a los antibióticos a los que son resistentes (Hagens et al, Microbial Drug Resistance (2006), 12, 164-168). Esto implica un metabolismo del bacteriófago activo, y se sugiere que implica la formación de poros en la membrana bacteriana. Sin embargo, esto es una señal de que la "resensibilización de los patógenos resistentes a un antibiótico en particular puede conseguirse en presencia de un fago *in vivo*" basándose en el uso de "un tratamiento combinado con antibióticos y un fago filamentoso". Por lo tanto, esto se refiere a una característica no heredable que es ejercida únicamente en presencia del bacteriófago, que se basa en el uso simultáneo tanto de bacteriófagos como de antibióticos, y que parece ser específica para los bacteriófagos filamentosos que forman poros en la membrana bacteriana. Por lo tanto, esto es distinto de las invenciones reivindicadas en el presente documento, que inducen unos cambios heredables que persisten incluso cuando no está presente el bacteriófago replicándose activamente.

Resumen de la invención

[0011] La presente invención se basa en la inducción de una sensibilidad a los antibióticos químicos mediante el uso de un tratamiento con un bacteriófago *in vivo* en seres humanos o en animales, en la que dicha sensibilidad es heredable, no se basa en el metabolismo del bacteriófago activo y no está relacionada con la destrucción de la biopelícula para la inducción de dicha sensibilidad, junto con la preparación de medicamentos para permitir el uso secuencial de bacteriófagos y de antibióticos de forma que se aproveche dicha inducción en la sensibilidad para controlar la enfermedad bacteriana, especialmente, por ejemplo, una infección por *Pseudomonas*

aeruginosa. Se entenderá que la inducción de sensibilidad en este contexto incluye una mejora en la sensibilidad.

Descripción detallada

5 **[0012]** En un primer aspecto se proporciona una preparación de bacteriófagos que comprende uno más bacteriófagos para su uso en un procedimiento para el tratamiento de una infección bacteriana en seres humanos o en animales; en el que dicho procedimiento comprende las siguientes etapas:

(a) la administración de dicha preparación de bacteriófagos a un ser humano o a un animal *in vivo*;

10 (b) el control *in vitro* de la sensibilidad de una muestra de células bacterianas de dicha infección o de otra infracción de la misma cepa a uno o más antibióticos químicos; y

(c) la administración de dicho uno o más antibióticos químicos, cuando se ha establecido que se ha inducido dicha sensibilidad a dicho uno o más antibióticos químicos;

15 y en el que dicha sensibilidad bacteriana es heredable, es independiente de la continuidad del metabolismo del bacteriófago en el interior de dichas células, y no está relacionada con la destrucción de una biopelícula.

[0013] Por lo tanto, en una realización se proporciona una preparación de bacteriófagos que comprende uno más bacteriófagos para su uso en una terapia combinada de un bacteriófago y un antibiótico para el tratamiento de una infección bacteriana en un ser humano o en un animal, en la que se administra al menos un antibiótico después del inicio de dicho tratamiento con un bacteriófago en un periodo de tiempo en el que la susceptibilidad de las células bacterianas de dicha infección a dicho antibiótico es inducida o mejorada mediante el tratamiento con el bacteriófago, en el que dicha susceptibilidad es heredable, independiente de la continuidad del metabolismo del bacteriófago en el interior de esas células, y no está relacionada con la destrucción de una biopelícula para la inducción de dicha sensibilidad. La sensibilidad al antibiótico puede controlarse mediante procedimientos establecidos *in vitro*. Puede confirmarse la inducción de la sensibilidad para una o más cepas bacterianas del paciente individual, o puede ser identificada en otros pacientes con unas infecciones bacterianas similares después del tratamiento con el bacteriófago.

30 **[0014]** En el presente documento también se divulga un medicamento bifásico en el que la primera fase comprende un producto terapéutico basado en un bacteriófago y la segunda está formada por uno o más antibióticos químicos, para su uso secuencial en seres humanos o en animales, en el que éste está diseñado para ofrecer unos efectos beneficiosos mediante la inducción de sensibilidad, según se ha indicado anteriormente.

35 **[0015]** El producto terapéutico de bacteriófagos y uno o más antibióticos químicos puede ser administrado, por ejemplo, con un intervalo de entre uno o dos días hasta dos meses de diferencia, preferentemente con un intervalo de entre una y cuatro semanas, lo más preferentemente con un intervalo de dos semanas de diferencia.

[0016] Como se ha indicado anteriormente, la terapia combinada de fago / antibiótico según la invención puede ser particularmente útil, por ejemplo, para dirigirse a una infección bacteriana que comprende o que consiste en *Pseudomonas aeruginosa*. Dicha infección puede estar, por ejemplo, en la zona de una quemadura cutánea o de otra herida cutánea. Puede estar en el pulmón, ser una infección ocular o una infección auditiva. En este contexto, se entenderá que dicha infección que comprende *P. aeruginosa* incluye una infección que consiste esencialmente en *P. aeruginosa*. Por lo tanto, la terapia con fagos según la invención puede ser aplicada a una infección formada completamente, predominantemente o significativamente por *P. aeruginosa*.

Ejemplos

Inducción de sensibilidad a un antibiótico en un ensayo en el ámbito veterinario:

50

[0017] Las infecciones auditivas caninas causadas por *Pseudomonas aeruginosa* (otitis externa y otitis media) son algunos ejemplos de una enfermedad clínica asociada con una colonización basada en una biopelícula de una superficie corporal. Algunos signos clínicos de dicha infección incluyen dolor, irritación (eritema), úlceras y la expulsión de grandes cantidades de material por el oído. Esto es a menudo de una naturaleza purulenta y está acompañado por un olor característico.

55

[0018] Una preparación combinada de seis bacteriófagos se denominó BioVet-PA, y fue autorizada para su ensayo en perros con dicha infección por el Veterinary Medicines Directorate del Reino Unido en noviembre de 2003.

Realización del ensayo

5 **[0019]** El BioVet-PA se almacenó a -80 °C. Inmediatamente antes de su administración, el producto se descongeló y se calentó con la mano. Se administraron 0,2 ml (que contienen 1×10^5 unidades infecciosas de cada uno de los 6 bacteriófagos) gota a gota mediante el uso de una jeringa estéril de 1 ml de capacidad en el oído. Se evaluó el estado del oído y la microbiología 2 días después de la administración.

10 **[0020]** El procedimiento fue como sigue:

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

15 Día 0 Un cirujano veterinario tomó frotis de cada oído. Los ensayos de laboratorio llevados a cabo mediante el uso de estos frotis confirmaron la presencia de *Pseudomonas aeruginosa*.

Si no se detectaba *Pseudomonas aeruginosa*, el perro era excluido del ensayo

20 Día 1 Si se detectaba *Pseudomonas aeruginosa*, se ensayaba la sensibilidad de las cepas clínicas a BioVet-PA.

[0021] Si la(s) cepa(s) de *Pseudomonas aeruginosa* con la que se había infectado el perro no era(n) sensible(s) a BioVet-PA, el perro era excluido del ensayo.

25 **[0022]** Tratamiento:

30 Día 0 Se examinaron los oídos con un otoscopio para evaluar su estado. Se tomaron frotis de cada oído para su análisis microbiológico. Se midió la temperatura corporal del perro. Al perro se le administró una dosis de 0,2 ml de BioVet-PA en el oído (los tratamientos se administraron gota a gota mediante el uso de una jeringa estéril de 1 ml de capacidad, y después se masajó el canal auditivo para favorecer una penetración profunda).

35 Día 2 Se examinaron los oídos para evaluar su estado. Se tomaron frotis de cada oído para su análisis microbiológico. Se midió la temperatura corporal del perro. Al perro se le administró una dosis de 0,2 ml de BioVet-PA en el segundo oído (los tratamientos se administraron gota a gota mediante el uso de una jeringa estéril de 1 ml de capacidad, y después se masajó el canal auditivo para favorecer una penetración profunda).

40 Día 4 Únicamente cuando estaban infectados ambos oídos: los oídos se examinaron para evaluar su estado. Se tomaron frotis de cada oído para su análisis microbiológico. Se midió la temperatura corporal del perro.

Resultados:

45 **[0023]** Los estudios con diez perros con infecciones auditivas graves resistentes a antibióticos por *Pseudomonas aeruginosa* tratados con BioVet-PA mostraron una mejora en los síntomas clínicos a los dos días del tratamiento, y una reducción de la carga bacteriana en el mismo periodo de tiempo. Se observó la replicación del bacteriófago en todos los perros. El análisis de la mejora en los síntomas clínicos demostró que esto era significativo a un nivel de confianza del 95 % tanto mediante la prueba de la *t* de Student como con la prueba de Wilcoxon para datos apareados.

55 **[0024]** Se excluyeron tres perros del ensayo. El primer perro que se iba a ensayar fue excluido debido a un cambio posterior en el sistema de puntuación (para tener en cuenta la purulencia del exudado auditivo), mientras que dos de los perros tratados mostraron tener unas infecciones que no eran predominantemente por la bacteria objetivo en el momento del tratamiento (debidas a cambios en la flora bacteriana después del cribado previo a la admisión).

Resistencia a antibióticos:

[0025] Todas las cepas clínicas de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas a partir de los trece perros que se recogieron antes del tratamiento fueron cribadas para comprobar su sensibilidad a los antibióticos. El perfil de sensibilidad al antibiótico de cada una de las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* se evaluó con un intervalo de 10 antibióticos que podían ser usados únicamente por los veterinarios para el tratamiento de infecciones por *Pseudomonas aeruginosa*. Los resultados fueron registrados en las hojas de recolección de datos apropiadas.

[0026] Dado que a menudo se observaban en el mismo perro diferentes tipos de colonias, y que en cuatro perros estaban infectados ambos oídos, se ensayó un total de 83 cepas clínicas individuales de *Pseudomonas aeruginosa*. Por lo tanto, se llevaron a cabo 830 ensayos, de los cuales 340 fueron sobre frotis tomados inmediatamente antes del tratamiento, 340 dos días después del tratamiento y 150 cuatro días después del tratamiento.

[0027] Se compararon todos los ensayos de sensibilidad para identificar los cambios en la sensibilidad frente a cualquiera de los antibióticos ensayados. Ninguna cepa clínica individual mostró más de un único cambio, y ninguna cepa clínica cambió de totalmente sensible a totalmente resistente, o de totalmente resistente a totalmente sensible. Sin embargo, se observaron cambios de sensible a parcialmente resistente, de parcialmente resistente a resistente, de resistente a parcialmente resistente o de parcialmente resistente a sensible para 16 cepas clínicas. Los acontecimientos se observaron como se muestra en la siguiente Tabla 1.

20 Tabla 1

	Amikacina	Ceftazidima	Ciprofloxacino	Gentamicina	Aztreonam	Tobramicina	Meropenem	Piperacilina + Tazobactam	Colistina	Imipenem
										Todas sensibles
Cambio de sensible a parcialmente resistente						1				
Cambio de parcialmente resistente a resistente				1						
Cambio de resistente a parcialmente resistente	6		3	5						
Cambio de parcialmente resistente a sensible	2		2	5		5				

Total de cepas clínicas controladas	340	100 %
- más resistentes	2	0,59 %
- más sensibles	28	8,24 %

[0028] Se observó un total de 30 alteraciones en la sensibilidad al antibiótico, con 28 cambios hacia sensibilidad y 2 cambios hacia resistencia. Por lo tanto, los cambios hacia sensibilidad superaron a los de resistencia en un factor de 14:1, ilustrando la preponderancia de dichos cambios "beneficiosos" después del tratamiento con el bacteriófago.

Inducción de sensibilidad a un antibiótico en un ensayo clínico humano:

[0029] El ensayo era un estudio con grupos paralelos, aleatorizado, con enmascaramiento doble y de centro único sobre la seguridad y la eficacia de una única administración de BioPhage-PA (una mezcla de seis bacteriófagos específicos para *Pseudomonas aeruginosa*) en comparación con placebo en pacientes con una infección auditiva crónica causada por *Pseudomonas aeruginosa* que se demostró que era susceptible a uno o más de los bacteriófagos presentes en BioPhage-PA.

[0030] Este estudio investigó la eficacia y la seguridad de BioPhage-PA, una mezcla de seis bacteriófagos de *Pseudomonas aeruginosa* de los mismos tipos que los ensayados con BioVet-PA en el ensayo en el ámbito

veterinario, que formaban parte del trabajo preclínico para este estudio.

[0031] Las seis cepas de bacteriófago (que se depositaron en la National Collection of Industrial and Marine Bacteria, 23 St Machar Drive, Aberdeen, AB24 3RY, Escocia, Reino Unido, el 24 de junio de 2003) son como sigue:

5

Referencia	Número de depósito de la NCIMB
BC-BP-01	NCIMB 41174
BC-BP-02	NCIMB 41175
BC-BP-03	NCIMB 41176
BC-BP-04	NCIMB 41177
BC-BP-05	NCIMB 41178
BC-BP-06	NCIMB 41179

[0032] Estos bacteriófagos son eficaces para destruir un amplio intervalo de cepas clínicas de *P. aeruginosa*.

[0033] El estudio se llevó a cabo con dos grupos paralelos de pacientes con una infección auditiva causada por *Pseudomonas aeruginosa*. Los pacientes se distribuyeron aleatoriamente para recibir una única dosis bien de BioPhage-PA o bien de placebo, y fueron controlados en un diseño de enmascaramiento doble durante un periodo de 6 semanas después de la dosis. Las evaluaciones de eficacia incluían preguntas sobre los acontecimientos adversos, una evaluación tanto del paciente como del investigador sobre la gravedad de la enfermedad mediante el uso de escalas de analogía visual, un recuento del frotis aditivo de *Pseudomonas aeruginosa* y del bacteriófago, un audiograma, una fotografía del oído y un análisis de la temperatura del oído. Se compararon estadísticamente los cambios desde el momento inicial (evaluación previa a la dosis) en los grupos activos y con placebo. También se compararon los datos de seguridad de los 2 grupos.

Diseño del estudio

20

[0034] Este era un estudio con grupos paralelos, aleatorizado, con enmascaramiento doble y de centro único en pacientes con una infección auditiva crónica por *Pseudomonas aeruginosa*. Los pacientes se distribuyeron aleatoriamente en uno de dos grupos:

25 Grupo 1: los pacientes recibieron una única dosis de 0,2 ml de BioPhage-PA (que contiene 1×10^5 ufp mediante una valoración original de cada uno de los 6 bacteriófagos terapéuticos)

Grupo 2: los pacientes recibieron una única dosis de 0,2 ml de placebo (glicerol en PBS al 10 % v/v)

30 Resumen del diseño

Visita previa al estudio

[0035] Los pacientes acudieron a la clínica en las 2 semanas del día 0 del tratamiento después de haber sido informados verbalmente del ensayo. En esta visita se les proporcionó la hoja de información escrita y también se les proporcionaron verbalmente los detalles del estudio. A los pacientes se les preguntó sobre su elegibilidad para participar y si consentían, firmaban una hoja de consentimiento antes del día 0 de ensayo.

Periodo de tratamiento (días 0 - 42 ambos inclusive)

40

[0036] Los pacientes acudieron a la clínica la mañana del día 0 para una evaluación clínica y se les preguntó sobre los acontecimientos adversos y el cumplimiento del estudio. Tras confirmar la elegibilidad, los pacientes fueron distribuidos aleatoriamente en uno de los dos grupos de tratamiento y se llevaron a cabo las evaluaciones del momento inicial para determinar la gravedad de la infección. Después el profesional clínico administró el tratamiento, mediante una instilación gota a gota de la terapia en el oído. Los pacientes permanecieron en la clínica durante 6 horas después de la dosis. Se les proporcionaron unas tarjetas diarias para el registro de cualquier acontecimiento adverso o de los comentarios sobre el estado del oído sobre una base diaria cuando estuvieran fuera de la unidad.

[0037] Los pacientes volvieron los días 7, 21 y 42 para ensayos adicionales de seguridad y eficacia.

[0038] Un paciente era elegible para su inclusión en este estudio únicamente si se cumplían todos los criterios siguientes: una edad de 18 o mayor; capacidad y disposición para proporcionar un consentimiento informado por escrito para formar parte del estudio; una infección en el oído que se ha demostrado que está causada predominantemente o únicamente por *Pseudomonas aeruginosa*; se ha aislado *Pseudomonas aeruginosa* de la infección y se ha demostrado que es vulnerable a uno o más de los bacteriófagos presentes en BioPhage-PA; infección establecida durante al menos 6 semanas y que ha demostrado no ser sensible a la terapia antibacteriana convencional; disponible para acudir a todas las visitas clínicas y completar todas las mediciones del estudio; las pacientes femeninas deben ser postmenopáusicas, estériles quirúrgicamente o estar en disposición de usar una forma aceptable de anticoncepción.

[0039] Un paciente no era elegible para su inclusión en este estudio si cumplía cualquiera de los siguientes criterios: cirugía local en los 3 meses previos a la visita previa al estudio; septicemia aguda o sistémica; uso de antibióticos sistémicos o tópicos en la semana previa a la visita previa del estudio o durante el estudio; uso de agentes antisépticos o antiinflamatorios en la semana previa a la visita previa al estudio o durante el estudio; terapia con bacteriófagos en los 6 meses previos a la visita previa al estudio; estreptococos hemolíticos de los grupos A, B, C y G o una flora bacteriana o fúngica inusual en el cultivo del frotis auditivo en la visita previa al estudio; mujer embarazada o con intención de quedarse embarazada; pacientes que han tenido o tienen una enfermedad que, a juicio del investigador, puede afectar al resultado del estudio; cualquier otra afección que el investigador considere perjudicial para los resultados del estudio; participación en otros ensayos clínicos que impliquen una nueva entidad molecular en los 4 meses previos, o en cualquier ensayo durante el mes previo.

Evaluaciones y procedimientos del estudio

[0040] Cada paciente acudió a la unidad para las siguientes visitas:

Antes del comienzo oficial del estudio se tomaron frotis (en medio de transporte) de cada uno de los oídos para la evaluación de los potenciales candidatos para el ensayo. Se llevó a cabo un análisis microbiológico general para determinar el nivel de *Pseudomonas aeruginosa* en el oído. Esto fue seguido por un ensayo diagnóstico del frotis auditivo. El ensayo fue analizado verbalmente con el paciente, y al paciente se le proporcionó la hoja de información/consentimiento; se realizó una historia clínica y se registró en la hoja de registro de casos; se realizó un frotis diagnóstico y el frotis se envió para su análisis microbiológico, donde fue analizado para una evaluación de *Pseudomonas aeruginosa* y de la sensibilidad de la *Pseudomonas aeruginosa* que había presente a los bacteriófagos de BioPhage-PA.

[0041] Si era adecuado, el paciente era incluido en el ensayo en las 2 semanas de tiempo desde la toma del frotis diagnóstico.

[0042] Día de estudio 0: el paciente evaluó el estado de sus oídos: incomodidad, picor, humedad y olor. Mediante el uso de hisopos secos se tomaron frotis para su análisis microbiológico. Se registraron las temperaturas oral y auditiva, se limpió el oído y el médico tratante evaluó el estado del oído: eritema / inflamación, úlceras / granulación / pólipos, tipo de exudado (transparente / mucoide / mucopurulento), cantidad de exudado y olor (inmediatamente antes de los procedimientos del estudio). Se realizaron fotografías digitales con un otoscopio, junto con una prueba auditiva (audiograma). Después se administró directamente BioPhage-PA (0,2 ml) en el canal auditivo mediante el uso de una jeringa de 1 ml y un tubo estéril blando durante un periodo de aproximadamente 30 segundos. El paciente permaneció en la clínica durante 6 horas después de la terapia para su observación, y después fue enviado a casa con unas tarjetas diarias para registrar cualquier información que considerara pertinente relativa a su estado.

[0043] Día de estudio 7: esto implicaba preguntas sobre acontecimientos adversos y el cumplimiento por parte del paciente, una evaluación del paciente sobre el oído, una muestra de frotis con un análisis microbiológico, el registro de la temperatura auditiva y oral, la evaluación del médico del oído y una limpieza del oído.

[0044] Día de estudio 21: esto implicaba los procedimientos descritos para el día de estudio 7

[0045] Día de estudio 42: esto implicaba los procedimientos descritos para los días de estudio 7 y 21, excepto porque también se llevó a cabo una prueba de audición y se fotografió el oído.

Evaluación microbiológica

[0046] La evaluación microbiológica implicaba el recuento de las *Pseudomonas aeruginosa* presentes en el frotis, junto con un recuento de todos los bacteriófagos (tanto extraños como terapéuticos) en el frotis.

5 **[0047]** También se controló la sensibilidad a diez antibióticos (como en el ensayo de ámbito veterinario) de todas las cepas clínicas. El ensayo de sensibilidad a los antibióticos se llevó a cabo para cada cepa de *Pseudomonas aeruginosa* aislada. El ensayo se llevó a cabo según los procedimientos habituales de la British Society for Antimicrobial Chemotherapy (BSAC) Disc Diffusion Method Antimicrobial Susceptibility Testing (mayo de 2003). Los antibióticos que se usaron fueron como sigue:

10

Amikacina - 30 µg/ml
 Ceftazadima - 30 µg/ml
 Ciprofloxacino - 5 µg/ml
 Gentamicina - 10 µg/ml
 Meropenem - 10 µg/ml
 Piperilina + Tazobactam (7,5:1) - 85 µg/ml
 Colistina - 25 µg/ml
 Aztreonam - 30 µg/ml
 Imipenem - 10 µg/ml
 Tobramicina - 10 µg/ml
 El ensayo se llevó a cabo mediante el uso de agar Isosensitest.

[0048] Se encontró que en el primer paciente en el que se observó replicación del bacteriófago, había pruebas de un movimiento hacia sensibilidad para tres de los diez antibióticos controlados (véase la Tabla 2).

15

Tabla 2

Sensibilidad de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> a los antibióticos:					
Datos del ensayo de otitis humana					
Antibiótico	Cribado previo al tratamiento	Día 0 (tratamiento)	Día 7	Día 21	Día 42
Amikacina	Parcialmente resistente	Parcialmente resistente	Sensible	Parcialmente resistente	Sensible
Gentamicina	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Parcialmente resistente
Tobramicina	Resistente	Sensible	Resistente	Parcialmente resistente	Resistente
Meropenem	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible
Imipenem	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible
Ceftazadima	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible
Piperilina & Tazobactam	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible
Colistina	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible
Aztreonam	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible
Ciprofloxacino	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible

Resumen de la demostración anterior

[0049] En el ensayo de ámbito veterinario, en un periodo de control de entre dos y cuatro días, se encontraron pruebas de un movimiento hacia sensibilidad al antibiótico en el 8,24 % de las cepas clínicas de *Pseudomonas aeruginosa* (frente a un 0,59 % en el que se observó un movimiento hacia resistencia).

5

[0050] En el ensayo con seres humanos, se observaron pruebas de un movimiento hacia sensibilidad a los antibióticos químicos después del uso de un bacteriófago terapéutico en el primer paciente en el que se observó la replicación del bacteriófago. Dicho movimiento se observó para tres de los diez antibióticos controlados (30 %), durante el periodo de control más largo de este ensayo.

10

Otros resultados del ensayo con seres humanos

[0051] El posterior análisis de los 24 participantes en el ensayo con seres humanos confirmó los hallazgos anteriores como sigue, con referencia a las siguientes Tablas 3 y 4. Puede observarse que la propia suspensión del tratamiento con antibiótico (necesaria para la aceptación en el ensayo) produjo un cambio hacia sensibilidad al antibiótico, pero esto fue más marcado para ambos números de pacientes y para los antibióticos individuales ensayados en el ensayo del grupo (tratado con bacteriófago), mostrando la mayoría de los pacientes (7/12) al menos un cambio hacia sensibilidad durante el periodo de control. Los cambios hacia sensibilidad parecían ser particularmente notables para los antibióticos aminoglucósidos mostrando, por ejemplo, entre cinco y diez pacientes tratados con bacteriófago un aumento en la sensibilidad a la gentamicina.

15

20

[0052] Tomados conjuntamente, los datos anteriores sirven de ejemplo para la presente invención.

Tabla 3

25

Sensibilidad a los antibióticos de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> :												
Datos del ensayo de otitis humana												
Cambio desde antes del cribado hasta el día 42												
	Grupo con placebo											
	Número de paciente											
Antibiótico	3	4	6	8	9	11	13	14	19	20	22	2
Amikacina							+	+				
Gentamicina							+	-		+		
Tobramicina								+	+			
Meropenem												
Imipenem												
Ceftazadima												
Piperacilina & Tazobactam												
Colistina												
Aztreonam							+					
Ciprofloxacino												
	Ensayo											
	Número de paciente											
Antibiótico	1	2	5	7	10	12	15	16	17	18	21	2

Amikacina	+		-				+					
Gentamicina	+		+				+	+				
Tobramicina												
Meropenem			-		-							
Imipenem												
Ceftazadima												
Piperilina & Tazobactam												
Colistina												
Aztreonam											+	
Ciprofloxacino					+							

Tabla 4

Cambios en los patrones de resistencia		n =	Antibiótico (diez fármacos ensayados)			
			A resistencia		A sensibilidad	
Ensayo			Nº	%	Nº	%
Pacientes (uno o más cambios)	de	12	2	16,7 %	7	58,3 %
Ensayos individuales	de	120	3	2,5 %	11	9,2 %
Control						
Pacientes (uno o más cambios)	de	12	1	8,3 %	5	41,7 %
Ensayos individuales	de	120	1	0,8 %	7	5,8 %

REIVINDICACIONES

1. Una preparación de bacteriófagos que comprende uno o más bacteriófagos para su uso en un procedimiento para el tratamiento de una infección bacteriana en seres humanos o en animales;
5 en la que dicho procedimiento comprende las siguientes etapas:
- (a) la administración de dicha preparación de bacteriófagos a un ser humano o a un animal *in vivo*;
 - (b) el control *in vitro* de la sensibilidad de una muestra de células bacterianas de dicha infección o de otra infección de la misma cepa a uno o más antibióticos químicos; y
 - 10 (c) la administración de dicho uno o más antibióticos químicos, cuando se ha establecido que se ha inducido dicha sensibilidad a dicho uno o más antibióticos químicos;
- y en la que dicha sensibilidad bacteriana es heredable, es independiente de la continuidad del metabolismo del bacteriófago en el interior de esas células y no está relacionada con la destrucción de una biopelícula.
15
2. La preparación de bacteriófagos para su uso según la reivindicación 1, en la que la capacidad de dicha de preparación para inducir sensibilidad en dichas células bacterianas a dichos antibióticos se determina mediante un ensayo de sensibilidad a los antibióticos *in vitro* mediante el uso de muestras de células bacterianas de dicha infección.
20
3. La preparación de bacteriófagos para su uso según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que el procedimiento comprende adicionalmente, después de la administración de dicha preparación de bacteriófagos, la administración de al menos un antibiótico en un periodo de tiempo en el que se ha inducido sensibilidad en las células bacterianas de dicha infección a dicho al menos un antibiótico mediante el tratamiento con
25 el bacteriófago, en la que periodo de tiempo se determina mediante un ensayo de sensibilidad a los antibióticos *in vitro* mediante el uso de muestras de células bacterianas de dicha infección; preferentemente en la que dicho periodo de tiempo es al menos de entre uno y dos días.
- 30 4. La preparación de bacteriófagos para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que se ha confirmado la inducción de sensibilidad para una o más de las cepas bacterianas del paciente individual.
5. La preparación de bacteriófagos para su uso según la reivindicación 3 o 4,
35 en la que dicha preparación de bacteriófagos y dicho al menos un antibiótico son administrados con unos intervalos de entre un día y dos meses de diferencia, preferentemente con unos intervalos de entre una y cuatro semanas de diferencia, y lo más preferentemente con unos intervalos de dos semanas de diferencia.
6. La preparación de bacteriófagos para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en la
40 que la infección bacteriana que se va a tratar es una infección por *Pseudomonas aeruginosa*.
7. La preparación de bacteriófagos para su uso según la reivindicación 6, en la que dicho al menos un antibiótico comprende o consiste en un antibiótico aminoglucósido.
- 45 8. La preparación de bacteriófagos para su uso según la reivindicación 6 o la reivindicación 7, en la que dicha preparación de bacteriófagos es una preparación combinada de los seis bacteriófagos NCIMB 41174, NCIMB 41175, NCIMB 41176, NCIMB 41177, NCIMB 41178 y NCIMB 41179 (depositados en la National Collection of Industrial And Marine Bacteria, Reino Unido, el 24 de junio de 2003).