

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 632 367**

51 Int. Cl.:

A01N 63/02 (2006.01)

A61K 35/74 (2015.01)

A61K 35/76 (2015.01)

A61K 8/99 (2007.01)

A01P 1/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.10.2008 PCT/GB2008/003363**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.04.2009 WO09044163**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.10.2008 E 08806507 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.04.2017 EP 2197284**

54 Título: **Composiciones antibacterianas**

30 Prioridad:

04.10.2007 GB 0719438

16.01.2008 GB 0800790

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

12.09.2017

73 Titular/es:

AMPLIPHI BIOSCIENCES CORPORATION

(100.0%)

3579 Valley Centre Drive, Suite 100

San Diego, CA 92130, US

72 Inventor/es:

JIA, YING

74 Agente/Representante:

SALVA FERRER, Joan

ES 2 632 367 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

Composiciones antibacterianas

- 5 **[0001]** Se describen en el presente documento formulaciones que comprenden bacteriófagos ("fagos") y métodos para tratar infecciones bacterianas, o desinfectar superficies, usando altas concentraciones de bacteriófago y/o formulaciones que contienen fago K y/o P68. La invención hace uso del fenómeno conocido como "lisis externa".
- 10 **[0002]** Se conocen bien agentes antibacterianos, en forma de antibióticos de base química (es decir, agentes no víricos), tales como penicilina o tetraciclina. El problema con dichos antibióticos es que la resistencia contra ellos es cada vez más común. Las mutaciones que confieren resistencia a los antibióticos, o los genes que codifican las enzimas con resistencia a los antibióticos, tales como las penicilinasas, son cada vez más comunes en las bacterias patógenas en todo el mundo. Las bacterias *Staphylococcus aureus* resistentes a la meticilina (MRSA), por ejemplo, son una forma cada vez más común de infección, a menudo adquirida durante la cirugía para otras causas en los
15 hospitales. Las infecciones por MRSA son extremadamente difíciles de tratar con antibióticos convencionales.
- [0003]** Un enfoque alternativo para tratar las infecciones bacterianas es infectar las bacterias con un virus, conocido como bacteriófagos. Dicha "terapia de bacteriófago" se desarrolló por primera vez a principios del siglo XX, pero ha sido poco utilizada en Occidente desde el advenimiento de los antibióticos en la década de 1940. Se ha
20 realizado un trabajo más extenso en Europa del Este.
- [0004]** Los bacteriófagos (también conocidos como "fagos") son específicos de tipos específicos de células bacterianas. No pueden infectar las células de organismos más complejos debido a las principales diferencias en la maquinaria intracelular clave, así como en los componentes de la superficie celular. La mayoría de bacteriófagos
25 tienen estructuras, tales como fibras de cola, que permiten a los bacteriófagos unirse a moléculas específicas en la superficie de sus bacterias diana. El ADN vírico dentro de los bacteriófagos, o ARN en algunos bacteriófagos, se inyecta a continuación, normalmente a través de la cola, en la célula huésped, que entonces dirige la producción del bacteriófago de la progenie.
- 30 **[0005]** Se encuentran diferentes tipos de bacteriófagos que infectan diferentes bacterias. Convencionalmente, pueden aislarse del entorno en el que crece la bacteria particular, por ejemplo de aguas residuales o heces. La presencia de un bacteriófago en una muestra puede determinarse pasando la muestra a través de un filtro con poros lo suficientemente pequeños para evitar que las bacterias pasen a través del filtro. El extracto filtrado se mezcla
35 usualmente con medio de crecimiento, se añaden bacterias huésped adecuadas, y después se esparce sobre, por ejemplo, una placa de agar. La presencia de manchas claras, denominadas placas, en el césped resultante de bacterias, indica la presencia de uno o más bacteriófagos, que causan la lisis de las bacterias.
- [0006]** Los bacteriófagos que solo pueden matar bacterias se conocen como bacteriófagos "obligatoriamente líticos". Existen bacteriófagos obligatoriamente líticos fuera de la célula bacteriana en forma de material de ácido
40 nucleico, usualmente ADN, rodeado por un revestimiento proteico. La capa proteica suele tener una o más moléculas unidas a ella que permiten a los bacteriófagos unirse a moléculas específicas en la superficie de las bacterias. Al unirse a la bacteria el ADN gana entrada en el huésped bacteriano donde se transcribe y se traduce en diversas proteínas necesarias para la replicación y el ensamblaje de nuevos bacteriófagos. El ADN también se replica y se envasa en nuevos bacteriófagos que se liberan tras la lisis de la célula bacteriana.
45
- [0007]** Además de bacteriófagos obligatoriamente líticos hay bacteriófagos lisogénicos o temperados. Estos bacteriófagos temperados tienen dos ciclos de vida, uno en el que lisan la célula infectada, y el otro en el que entran en el estado de profago. Los bacteriófagos obligatoriamente líticos siempre tienen que infectar desde el exterior, reprogramar la célula huésped y liberar una ráfaga de bacteriófago a través de la ruptura o la lisis de la célula
50 infectada. Los bacteriófagos "temperados" pueden integrar su ADN en el ADN bacteriano huésped, lo que conduce a una asociación virtualmente permanente como profago dentro de una bacteria específica y su progenie. Algunos profagos no se integran físicamente en el cromosoma, sino que existen como un replicón autónomo. El profago dirige la síntesis de un represor que bloquea la expresión de sus propios genes y también los de cualquier bacteriófago temperado estrechamente relacionado. Ocasionalmente, el profago puede escapar a la regulación por
55 su represor. El ADN del profago puede entonces ser cortado del genoma por recombinación específica del sitio, replicarse, y la progenie puede liberarse de la célula huésped, en la mayoría de los casos por lisis.
- [0008]** Se han utilizado bacteriófagos obligatoriamente líticos para tratar infecciones bacterianas. Se han aplicado bacteriófagos obligatoriamente líticos aislados a las heridas o se han inyectado por vía intravenosa donde

matan bacterias. La ventaja de los bacteriófagos es que se auto-repican, con tan solo un centenar más o menos de bacteriófagos que pueden matar hasta cien millones de bacterias. Los bacteriófagos simplemente se replican matando bacterias hasta que las han eliminado del individuo o del entorno. El documento WO 01/51066, por ejemplo, describe un procedimiento para tratar un paciente con uno o más bacteriófagos obligatoriamente líticos. De forma similar, el documento US 4.957.686 describe un procedimiento para tratar caries dentales con bacteriófago.

10 **[0009]** Un posible problema con el uso de bacteriófagos ha sido que el propio cuerpo del paciente tendrá a menudo una respuesta inmune contra los bacteriófagos y eliminará los bacteriófagos de la sangre. Los documentos US 5.660.812, US 5.688.501 y US 5.766.892 muestran métodos de selección de bacteriófagos para mejorar la semivida de bacteriófago dentro de la sangre de un paciente a tratar. El documento US 5.811.093 analiza la selección de un gen modificado que codifica una de las proteínas de cápside (recubrimiento) (cápside E) de manera que los bacteriófagos sobrevivan en el sistema circulatorio de un animal durante más tiempo. En el caso de esta última patente, la modificación se identificó como una mutación puntual dentro de un gen.

15 **[0010]** El documento WO 01/50872 A2 describe un procedimiento para la higienización de productos que utilizan bacteriófagos.

20 **[0011]** Soothill (1999) Burns, Vol. 20, N.º 3, 209-211 describe que la infección de injertos de piel dividida en cobayas por *Pseudomonas aeruginosa* 3719 los destruye, y el bacteriófago BS24, lítico para la cepa 3719, protege los injertos.

25 **[0012]** Un problema asociado a los usos de la técnica anterior para desinfectar o tratar contaminantes o enfermedades bacterianas es que los fagos son a menudo cepas bacterianas específicas. La presencia, por ejemplo, de un profago dentro de una bacteria puede bloquear la expresión de genes de un fago infeccioso, evitando así la replicación del fago infeccioso e impidiendo la lisis y la muerte de la bacteria. Un profago también puede causar la destrucción del ADN del fago entrante.

30 **[0013]** Esto ha significado previamente que el fago necesita ser emparejado a la bacteria, requiriendo a menudo un análisis genético complicado de la bacteria, o ha de usarse un número de fagos diferente en combinación. La producción de paneles de diferentes fagos, tales como paneles de mutantes *vir* derivados de bacteriófagos temperados, se describe en el documento WO 03/080823.

35 **[0014]** El fenómeno conocido como "lisis externa" se conoce desde finales de la década de 1930 y principios de la de 1940. Delbrück M. (J. Gen. Physiol., (1940), páginas 643-660) analiza dos conceptos: "lisis interna" y "lisis externa".

40 **[0015]** La "lisis interna" es cuando las células bacterianas se infectan con el fago, el fago se multiplica dentro de las células, y las células se lisan, liberando nuevos fagos y matando a las bacterias. Este es el proceso normalmente usado por el fago obligatoriamente lítico. Por otro lado, la "lisis externa" no implica la replicación de fagos dentro de las células bacterianas. Delbrück observó que los fagos se adsorbieron por las células bacterianas, pero no se liberaron los fagos de la progenie. Esto dio lugar a la deformación de células bacterianas en cuerpos esféricos y la muerte de las bacterias por lisis. Se observó que se requerían altas concentraciones de fago por encima de un valor umbral para inducir este fenómeno.

45 **[0016]** Ahora sabemos que esto se debe, al menos en parte, a la digestión de la pared celular bacteriana por las enzimas presentes en forma soluble o unidas a partículas de fago (Stent. G.S., Molecular Biology of Bacterial Particles, W.H. Freeman & Co. (1963), páginas 71-87). Se ha llevado a cabo una gran cantidad de trabajo para aislar y caracterizar las enzimas de lisis conocidas como "lisinas". Las lisinas también se conocen como mureína hidrolasas.

50 **[0017]** Ralston D.J., *et al.* (J. Gen. Physiol. (1957), 41(2): 343-358), por ejemplo, estudiaron la acción del fago y la virolisina sobre las bacterias. La virolisina se ha obtenido a partir de lisados de células infectadas con fagos. El mismo grupo continuó informando sobre el fenómeno. En 1964 informaron que la lisis externa parecía requerir sensibilización por los fagos, seguida por la digestión de la pared por la lisina (Ralston D., *et al.*, J. Bacteriol. (1964), 55 88: 676-681).

[0018] El uso de lisinas aisladas se ha enfocado por la comunidad científica como que tiene aplicaciones terapéuticas potenciales. También se han investigado otras enzimas y proteínas asociadas a lisis aislada, tales como holinas. Las holinas están implicadas en la permeabilización de las membranas celulares.

[0019] Por ejemplo, Nelson D., *et al.* (PNAS, (2001), 98: 4107-4112) describen el uso de lisinas purificadas para tratar infecciones bacterianas. El grupo fue capaz de tratar las infecciones estreptocócicas en el tracto respiratorio superior usando lisina purificada introducida por vía oral. Los documentos WO 01/19391 y US 5 2002/0094319 también describen el uso de enzimas obligatoriamente líticas purificadas, tal como lisina.

[0020] *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) puede causar infecciones sistémicas o abscesos y úlceras, especialmente en pacientes enfermos, ancianos o inmunocomprometidos. Es cada vez más una causa principal, o contribución, de muerte en los hospitales. MRSA puede residir en la cavidad nasal de los médicos o 10 visitantes sin ningún síntoma evidente de la enfermedad. Sin embargo, las bacterias pueden propagarse de persona a persona, incluyendo a los pacientes. Por consiguiente, matar las bacterias ayuda a prevenir la enfermedad.

[0021] Se proporciona un posible enfoque en el documento WO 03/080823, usando un panel de bacteriófagos. Sin embargo, hay muchas cepas diferentes de MRSA. Por lo tanto, el panel no puede matar a todos 15 los MRSA por la infección obligatoriamente lítica de las bacterias. El inventor ha comprendido ahora que proporcionar fagos en concentraciones suficientemente altas para inducir la lisis externa proporciona una forma de matar rápidamente bacterias sin tener que infectar las bacterias para causar lisis interna. Esto amplía el número de cepas que pueden ser tratadas con fagos, al mismo tiempo que permite la lisis interna en cepas susceptibles de fagos.

20 **[0022]** Otras bacterias, tales como *Clostridium difficile* (*C. difficile*), también se están convirtiendo en problemáticas en los hospitales y se propagan por contacto con otros pacientes, trabajadores sanitarios o visitantes, o del entorno circundante.

25 **[0023]** Actualmente, los hospitales utilizan lavados de manos con alcohol para ayudar a prevenir la transmisión de MRSA. Sin embargo, tales lavados alcohólicos a menudo no son adecuados para su uso en el revestimiento sensible de la cavidad nasal o áreas rotas de la piel. Por lo tanto, existe la necesidad de producir una composición adecuada para matar bacterias, tales como MRSA o *C. difficile*.

30 **[0024]** Los inventores han identificado inesperadamente que la aplicación de la lisis externa permite que se produzca una formulación más sencilla y rentable. La lisis externa proporciona una manera de matar rápidamente las bacterias. Permite la muerte de bacterias resistentes a los antibióticos sin la necesidad de antibióticos o productos químicos dañinos o irritantes. Además, la utilización de fagos enteros tiene la ventaja de que, si el fago es capaz de 35 infectar bacterias, a través de lisis interna, entonces las formulaciones pueden tener un modo dual de ataque; tanto la muerte por lisis externa como, incluso si la concentración de la formulación se diluye por los fluidos corporales tal como el moco, por la lisis interna.

[0025] Además, se ha encontrado que los fagos utilizados por el inventor, el fago K y el fago P68 juntos 40 tienen actividad contra una amplia gama de cepas bacterianas y tienen beneficios adicionales descritos más adelante.

[0026] El fago K se ha caracterizado previamente como un fago anti-MRSA. O'Flaherty S.O., *et al.*, (Appl. Environ. Microbiol. (2005), 71(4): 1836-1842) estudiaron el fago K en diferentes cepas resistentes a fármacos de *S. aureus*. El fago P68 se estudió, por ejemplo, por Takac M. y Blasi U. (Antimicrob. Agents and Chemo, (2005): 2934- 45 2940). Los inventores han encontrado que el espectro de cepas de MRSA que los fagos K y/o P68 infectan se complementa entre sí, haciendo que la combinación de las dos cepas sea especialmente adecuada para su uso en combinaciones anti-MRSA.

[0027] El fago K tiene una ventaja adicional. Aunque las paredes de las bacterias Gram negativas están 50 compuestas principalmente por peptidoglicano, las bacterias Gram positivas contienen, además, grandes cantidades de ácido teicoico, un polímero de fosfato de polioli aniónico. Se sabe desde la década de 1970 que los mutantes de *S. aureus* que son resistentes al fago K carecen de ácido ribitol teicoico. (Shaw D.R.D. et al (1970) J. Biol. Chem. 245 (19) 5101-5106). El fago K se une a las células bacterianas a través del ácido teicoico. Se ha encontrado que la falta de ácidos teicoicos de pared reduce las interacciones con las células endoteliales, siendo necesario el ácido 55 teicoico para la unión a las células nasales (Weidenmaier C et al In. J. Medical Microbiol (2008) 298, 505-513). Por lo tanto, si el ácido teicoico está presente, el fago K debe unirse a la bacteria. Si la bacteria muta para ser resistente al fago K mediante la reducción del ácido teicoico en la pared celular, entonces esto debería reducir la capacidad de la bacteria para unirse a las células nasales. Esto debería ayudar a reducir la virulencia de cualquier bacteria que se mantenga después del tratamiento con el fago K.

[0028] La experimentación por parte de los inventores también ha encontrado que, por ejemplo, el fago K y sus derivados de cambio en el intervalo de huéspedes a altas concentraciones, todavía pueden matar *S-aureus*, incluso si mutan para ser resistentes a la infección obligatoriamente lítica.

5

[0029] Un primer aspecto de la invención proporciona un procedimiento para matar bacterias sobre una superficie que es un equipo médico, ropa de cama, muebles, paredes o suelos en un hospital que comprende aplicar a la superficie una composición desinfectante que comprende un vehículo y dos o más fagos, comprendiendo los fagos el fago K o mutantes del mismo, y el fago P68 o mutantes del mismo caracterizado por que la concentración de ambos fagos es de al menos 5:1 ufp de fagos:ufc de bacterias para inducir la lisis externa de las bacterias para las que el fago es un patógeno cuando dichas bacterias están presentes sobre la superficie a desinfectar.

10

[0030] La concentración de fagos necesaria para causar la lisis externa puede determinarse experimentalmente, por ejemplo, incubando células bacterianas a su temperatura normal de crecimiento con diferentes concentraciones del fago y observando a qué concentraciones de fagos las células bacterianas se lisan como se muestra por el cultivo que pierde turbidez.

15

[0031] El fago en la composición será normalmente de una especie particular predeterminada de bacteria. El término "patógeno", como se usa en el presente documento, pretende significar que el fago es capaz de unirse específicamente a la superficie de una especie de bacteria y, cuando está a una alta concentración, es capaz de inducir la lisis externa. El fago no necesita ser capaz de inducir lisis interna. Como se ha indicado anteriormente, la presencia de profagos diferentes dentro de diferentes cepas de la misma especie de bacteria significa que un fago particular puede o no inducir la lisis de la bacteria a través del mecanismo de lisis interna. Sin embargo, el fago puede todavía unirse a la superficie de la bacteria y todavía puede inducir la lisis a través del mecanismo de lisis externa.

20

25

[0032] Preferentemente, la concentración del fago es de al menos 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, al menos 20: 1, 40: 1, 50: 1, al menos 100: 1 unidades formadoras de placa de fagos (ufp):unidades formadoras de colonias (ufc) de bacterias. Las unidades formadoras de placa de fagos se determinan sobre bacterias que son capaces de lisarse por el fago a través de lisis interna.

30

[0033] Se apreciará que la eficacia a la que diferentes tipos de fagos son capaces de inducir la lisis externa en diferentes bacterias variará de fago a fago. Las concentraciones requeridas para inducir tal fenómeno pueden determinarse mediante experimentación rutinaria.

35

[0034] En el presente documento se describe que, potencialmente, podría tratarse cualquier superficie sobre la que se puede aplicar la composición desinfectante para producir concentraciones suficientemente altas de fago para producir la lisis externa requerida. En un aspecto, la superficie es equipo médico, ropa de cama, muebles, paredes o suelos en un hospital. Como alternativa, la superficie a tratar es preferentemente la piel externa de un mamífero, por ejemplo, la cavidad nasal o la superficie de una herida o corte en la superficie de un mamífero. Preferentemente, el mamífero es un ser humano.

40

[0035] La composición desinfectante puede estar en forma de un lavado por pulverización o líquido para la superficie. La composición puede ser un lavado de manos. Preferentemente, cuando la composición es una formulación para aplicación tópica, puede adoptar la forma de una loción, crema, ungüento, pasta, gel, espuma o cualquier otra forma física como un vehículo generalmente conocido para administración tópica. Dichas formulaciones tópicas espesadas son particularmente ventajosas porque las formulaciones se adhieren al área de la piel sobre la que se coloca el material, permitiendo así que se introduzca una alta concentración localizada de fago en la zona particular a desinfectar.

45

50

[0036] Por ejemplo, las cremas a base de parafina y lanolina, que son particularmente útiles para la aplicación de producto a la cavidad nasal, son generalmente conocidas en la técnica. Sin embargo, pueden usarse otros espesantes, tales como espesantes poliméricos.

55

[0037] Las formulaciones también pueden comprender uno o más de los siguientes: agua, conservantes, tensioactivos activos, emulsionantes, antioxidantes o disolventes.

[0038] Se utilizan dos o más fagos diferentes. Los revestimientos superficiales de diferentes cepas de, por ejemplo, la misma especie de bacteria, a veces varían. Por lo tanto, con el fin de aumentar la probabilidad de que

una formulación particular pueda inducir la lisis externa en la población bacteriana de una especie particular sobre una superficie particular, es preferible utilizar dos o más fagos diferentes capaces de infectar diferentes cepas de la misma especie de bacterias. Esto también aumenta la probabilidad de que la lisis interna también se pueda usar como un procedimiento secundario para matar bacterias en una superficie particular.

5

[0039] Se utilizan dos o más tipos diferentes de fago, cada fago puede ser específico para una especie de bacteria diferente. Esto permite utilizar una formulación particular como control en situaciones en las que puede estar presente un número de bacterias diferentes en una superficie particular.

10 **[0040]** Preferentemente, el fago es un patógeno de una bacteria seleccionada de *Staphylococcus*, *Helicobacter*, *Klebsiella*, *Listeria*, *Mycobacterium*, *Escherichia*, *Meningococcus*, *Campylobacter*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Shigella*, *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Clostridium*, *Legionella*, *Acetivobacter*, o *Salmonella*.

15 **[0041]** Preferentemente, el fago es un patógeno de *Staphylococcus aureus*, especialmente MRSA o *C. difficile*.

20 **[0042]** De hecho, la combinación de fago K y fago P68 o mutantes de los mismos, se usa en ambas concentraciones altas como se indica en las reivindicaciones, para inducir la lisis externa para cepas bacterianas que no permiten la multiplicación del fago. El inventor ha encontrado que el uso del fago K en combinación con el fago P68 en una formulación desinfectante permite infectar y matar una amplia gama de cepas de MRSA. Los intervalos de huésped del fago K y del fago P68 se complementan entre sí.

25 **[0043]** Se describe en el presente documento una composición desinfectante para desinfectar una superficie que comprende un vehículo, el fago K y/o el fago P68 o mutantes de los mismos.

[0044] El fago K o el fago P68 se utilizan en combinación entre sí y opcionalmente con otros fagos.

[0045] La composición puede comprender tipos adicionales de fago, además del fago K y el fago P68.

30 **[0046]** Los mutantes del fago K o P68 pueden ser mutaciones puntuales, de delección o de adición. Pueden cambiarse 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 bases en comparación con la secuencia original del fago K o P68. Dichos mutantes tienen preferentemente un intervalo de huésped alterado.

35 **[0047]** El fago K se analiza en detalle en el artículo por O'Flaherty et al (J. Bacteriol. (2004) 2862-2871). Es un fago polivalente con un genoma de ADN de 127.395 pb. Típicamente, el fago K carece sustancialmente de sitios GATC y GGNCC. Típicamente comprende una gran región del genoma que tiene homología con el fago A511 de *Listeria*. El genoma también comprende típicamente intrones en funciones esenciales del fago, dos en el gen de la polimerasa y uno en el gen de la lisina.

40 **[0048]** La secuencia nucleotídica de P68 se muestra en el artículo por Vybiral D. et al. (FEMS Microbiol. Lett (2003), 219, 275-283). P68 comprende 18277 ob (Genbank n.º AF513033).

45 **[0049]** Preferentemente, la mutación del fago K o el fago P68 es al menos un 90 %, mucho más preferentemente al menos un 92 %, 94 %, 96 %, 98 % o un 99 % con respecto a la secuencia nativa del fago.

[0050] El fago está presente en concentraciones suficientemente altas para inducir la lisis externa como se ha descrito anteriormente.

50 **[0051]** La composición puede ser para una aplicación tópica, por ejemplo, sobre la piel de un mamífero, tal como un ser humano. Por ejemplo, la piel puede ser la cavidad nasal o en una mano. Otras superficies pueden ser como se ha definido anteriormente.

55 **[0052]** La forma de la composición, los componentes de la composición, y los usos pueden ser como se han definido anteriormente.

[0053] Los fagos específicos para diferentes especies de bacterias, y de hecho diferentes cepas de bacterias, son generalmente conocidos en la técnica. Se describe una composición que comprende uno o más fagos generalmente conocidos que son capaces de infectar MRSA incluyendo el o K y/o el o P68.

[0054] La invención también proporciona una composición desinfectante que comprende un vehículo y dos o más fagos, comprendiendo los fagos el fago K o mutantes del mismo, y el fago P68 o mutantes del mismo, caracterizada por que la concentración de ambos fagos es de al menos 5:1 ufp de fagos:ufc de bacterias para inducir la lisis externa de las bacterias para las que el fago es un patógeno cuando dichas bacterias están presentes sobre una superficie a desinfectar para su uso en métodos para eliminar bacterias sobre una superficie que comprende aplicar la composición desinfectante a la superficie, en la que la superficie es la piel de un mamífero, tal como un ser humano. En particular, la superficie puede ser la cavidad nasal de un mamífero, o la piel de las manos de un ser humano. Esto puede usarse como un desinfectante, por ejemplo para prevenir la propagación de una bacteria particular. También puede usarse como una forma de inhibir una infección bacteriana en la superficie de, por ejemplo, la piel.

[0055] Se describen en el presente documento métodos de tratamiento de una infección bacteriana que comprende aplicar a una superficie infectada una composición descrita en el presente documento. Se describe en el presente documento una composición para su uso para tratar una infección bacteriana.

[0056] La composición desinfectante puede aplicarse a un vendaje o apósito para heridas.

[0057] Se describe en el presente documento un vendaje o apósito para heridas que comprende al menos un tipo de fago, caracterizado por que el fago se proporciona a una concentración suficientemente alta en el vendaje o apósito de herida para inducir la lisis externa en bacterias para las cuales el fago es un patógeno cuando se pone en contacto con tales bacterias.

[0058] Se describe en el presente documento un vendaje o apósito para heridas que comprende el fago K y/o el fago P68 o mutaciones de los mismos. El fago K o P68 puede usarse en solitario o en combinación.

[0059] El apósito para heridas puede ser una compresa o un apósito de tipo yeso que se pegue. El fago y/o las concentraciones utilizadas son preferentemente como se ha definido anteriormente. El fago puede aplicarse al apósito para heridas o vendaje como formulación desinfectante o crema tópica, antes de aplicarla al apósito o el vendaje.

[0060] Como alternativa, el vendaje o apósito para heridas puede empaparse en un vehículo que contiene el fago y secarse para dejar el fago impregnado dentro del apósito o vendaje.

[0061] El fago también se puede adsorber sobre la superficie del vendaje o apósito para heridas usando técnicas generalmente conocidas en la técnica.

[0062] La ventaja de este enfoque es que el vendaje o apósito de herida permite que el fago sea puesto en contacto con una herida que puede contener las bacterias.

[0063] También se describen en el presente documento métodos para inhibir o tratar bacterias mediante la aplicación de un vendaje o apósito para heridas a un paciente.

[0064] El bacteriófago K y el bacteriófago P68, y el fago derivado de ellos, se usan en las composiciones descritas en el presente documento. Estos inducen la lisis externa en una amplia gama de cepas de MRSA. Ambos fagos son generalmente conocidos en la técnica. Por ejemplo, el fago K puede obtenerse de ATCC (ATCC 19685-B1) y/o P68 del Felix d'Hérelle Reference Center for Bacterial Viruses de la Université Laval (HER49). También se pueden usar otros fagos.

MÉTODOS

[0065] Se cultivaron bacterias de *Staphylococcus aureus* insensibles a la infección obligatoriamente lítica por el fago en cuestión en caldo Luria-Bertani como medio de crecimiento hasta una concentración de aproximadamente 2×10^8 unidades formadoras de colonias (ufc) por ml. Se añadieron diferentes concentraciones de fago a diferentes alícuotas de bacterias suspendidas en medio y se incubaron a 37 °C durante la noche.

[0066] Se midió la turbidez del cultivo. Una disminución en la turbidez indicó la lisis externa de las células.

[0067] La concentración de fago se calculó como unidades formadoras de placa (ufp) en células bacterianas en las que se sabía que el fago infectaba e inducía la lisis interna para formar placas. El cálculo de ufp de fagos y de

células bacterianas son técnicas convencionales.

5 **[0068]** Como alternativa, se proporciona una placa de Petri de un medio de crecimiento sólido (medio Luria-Bertani). Las bacterias insensibles a la infección obligatoriamente lítica por el fago en cuestión se mezclan con agar líquido de baja densidad y luego se propagan sobre el medio de crecimiento sólido. Las alícuotas (~20 µl) de diferentes diluciones de la preparación de fago se manchan luego sobre la superficie de la placa de Petri. La placa de Petri se incuba para permitir que las bacterias crezcan. Las zonas sin crecimiento bacteriano que corresponden a las posiciones en las que cualquiera de las diluciones de fago se manchó indican lisis externa.

10 **[0069]** La capacidad del fago para inducir la lisis interna puede determinarse mediante una serie de técnicas. Típicamente se proporciona una placa petri de un medio de crecimiento sólido (medio Luria-Bertani). Las bacterias se mezclan con el fago y el agar líquido de baja densidad y luego se esparcen sobre el medio de crecimiento sólido. La placa de Petri se incubó para permitir que las bacterias creciesen. Cuando ocurrió lisis interna, se observaron placas en el crecimiento bacteriano.

15

RESULTADOS

20 **[0070]** La Tabla 1 muestra la capacidad del fago K y del fago P68 para inducir la lisis interna (placas) en una gama de diferentes cepas de *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (MRSA). SAI 653 se ha utilizado como estándar. Está disponible públicamente en la ATCC (ATCC número 19685) y es *Staphylococcus aureus* subsp *aureus* Rosenbach. Las cepas restantes son cepas de MRSA aisladas de pacientes en hospitales en el Reino Unido y en el extranjero.

25 **[0071]** La tabla también muestra que a concentraciones mayores el fago puede usarse para inducir lisis externa en cepas incluyendo aquellas en las que el fago no formará placas a través de lisis interna.

[0072] Esto aumenta considerablemente la eficacia de las formulaciones que comprenden fagos aumentando el número de diferentes cepas de bacterias en las que puede usarse la formulación que contiene fago para infectar.

30 **[0073]** Se observó que con el fago K, la concentración mínima de fago K necesaria para inducir la lisis externa en el fago en la que no fue capaz de inducir la formación de placa era 5:1 ufp de placas con respecto a las células.

Lisis externa de mutantes de *Staphylococcus aureus* resistentes a la infección por fagos.

35

[0074] Los fagos K, K* y K*710 de *Staphylococcus aureus* (mutantes del intervalo de huéspedes espontáneos derivados del precursor original K) y el fago P68 pueden provocar la lisis externa de la gran mayoría de cepas de *S. aureus* ensayadas. Se realizaron experimentos para investigar si los mutantes de *S. aureus* que son resistentes a la infección obligatoriamente lítica (lisis interna) eran todavía sensibles a la lisis externa. Se aislaron cinco mutantes independientes de la cepa SAI669 de *S. aureus* (un aislado de EMRSA-15) resistentes al fago K*710, al igual que otros cinco mutantes resistentes al fago P68. Todos los mutantes aislados como resistentes a la infección obligatoriamente lítica por el fago K*710 también mostraron resistencia a la infección obligatoriamente lítica por los fagos K y K*. Los mutantes resistentes a la infección obligatoriamente lítica por K/K*/K*710 eran sensibles a la infección obligatoriamente lítica por el fago P68 y viceversa, los mutantes resistentes a la infección obligatoriamente lítica por el fago P68 eran todavía sensibles a la infección obligatoriamente lítica por K/K*/K*710. Cada mutante resistente a fago individual se ensayó para determinar la sensibilidad a la lisis externa. Este ensayo se realizó inoculando un césped de la cepa de *S. aureus* en 3 ml de agar blando de caldo Luria (0,7 % p/v) sobre una placa de agar de caldo Luria (1,5 % p/v) y luego se salpicaron 20 µl de diluciones seriadas 10 veces de cada fago (concentración inicial -5×10^9 unidades formadoras de placas/ml) sobre el agar blando, seguido de incubación a 37
45 50 °C durante 20 horas. Las zonas de clareo en el césped bacteriano a altas concentraciones de fago, pero la ausencia de placas individuales a bajas concentraciones de fago, se tomaron para indicar lisis externa.

[0075] El conjunto de los diez mutantes era sensible a la lisis externa por los fagos K, K* y K*710. Sin embargo, los mutantes resistentes a P68 no eran sensibles a la lisis externa por P68. Se aislaron mutantes dobles espontáneos de cada uno de los diez mutantes originales que ahora eran resistentes tanto a K*710 como a P68. Estos mutantes dobles se seleccionaron por su sensibilidad a la lisis externa. Todos los mutantes dobles eran sensibles a la lisis externa por los fagos K, K* y K*710, pero no por el fago P68. A partir de estos resultados se concluye que los mutantes de *S. aureus* resistentes a la infección obligatoriamente lítica por el fago K y los mutantes espontáneos del intervalo de huéspedes derivados del fago K, permanecen sensibles a la lisis externa.

[0076] Por lo tanto, en el contexto de la terapia con fagos, el uso del fago K y sus derivados mutantes del intervalo de huéspedes a una concentración suficientemente alta debería matar las cepas de *S. aureus* incluso si mutan a resistencia a una infección obligatoriamente lítica.

5

Tipo de EMRSA	15											16		13			15			16	
SAI número	653	654	655	656	657	658	659	660	661	662	663	664	665	666	667	668	669	670	671	672	673
Fago y huésped																					
K/653																					
P68/653																					

	Infecioso con alta eficiencia
	No infeccioso, pero causa lisis externa

Tabla 1

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para matar bacterias sobre una superficie que es un equipo médico, ropa de cama, muebles, paredes o suelos en un hospital que comprende aplicar a la superficie una composición desinfectante que comprende un vehículo y dos o más fagos, comprendiendo los fagos el fago K o mutantes del mismo, y el fago P68 o mutantes del mismo, **caracterizado porque** la concentración de ambos fagos es de al menos 5:1 ufp de fagos:ufc de bacterias para inducir la lisis externa de las bacterias para las que el fago es un patógeno cuando dichas bacterias están presentes sobre la superficie a desinfectar.
- 10 2. Una composición desinfectante que comprende un vehículo y dos o más fagos, comprendiendo los fagos el fago K o mutantes del mismo, y el fago P68 o mutantes del mismo, **caracterizada porque** la concentración de ambos fagos es de al menos 5:1 ufp de fagos:ufc de bacterias para inducir la lisis externa de las bacterias para las que el fago es un patógeno cuando dichas bacterias están presentes sobre una superficie a desinfectar para su uso en un procedimiento para eliminar bacterias sobre una superficie, que comprende aplicar la composición desinfectante a la superficie, en la que la superficie es la piel de un mamífero.
- 15 3. Una composición desinfectante para su uso según la reivindicación 2, en la que la composición desinfectante es una aplicación tópica para aplicación a la piel del mamífero.
- 20 4. Una composición desinfectante para su uso según la reivindicación 3, en la que la piel está dentro de la cavidad nasal, o piel de la mano de un humano.
5. Un procedimiento según la reivindicación 1, o una composición desinfectante para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, en el que la composición desinfectante es un lavado por pulverización o líquido para la superficie.
- 25 6. Un procedimiento según la reivindicación 5, o una composición desinfectante para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5 en forma de crema, loción, ungüento, pasta, gel, espuma o lavado de manos.
- 30 7. Un procedimiento según la reivindicación 5 o 6, o una composición desinfectante para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6, en el que el vehículo comprende lanolina o parafina.
8. Un procedimiento o composición desinfectante para su uso según cualquier reivindicación anterior, en los que la composición comprende fagos adicionales que son un patógeno de una bacteria seleccionada de *Staphylococcus*, *Helicobacter*, *Klebsiella*, *Listeria*, *Mycobacterium*, *Escherichia*, *Meningococcus*, *Campylobacter*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Shigella*, *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Clostridium*, *Legionella*, *Acetobacter*, o *Salmonella*.
- 35 9. Un procedimiento o composición desinfectante para su uso según la reivindicación 8, en los que el fago es un patógeno de *Staphylococcus aureus*.
10. Un procedimiento o composición desinfectante para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores que comprende al menos un mutante del fago K o fago P68, en los que el mutante es al menos un 90 %, 45 92 %, 94 %, 96 %, 98 % o un 99 % idéntico a la secuencia nativa del fago.
11. Un procedimiento o composición desinfectante para su uso según la reivindicación 10, en los que el mutante es un mutante puntual, de delección o de adición en el que se cambian 1-10 bases en comparación con la secuencia original del fago K o P68.