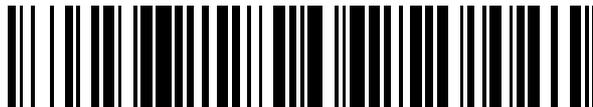


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 747 964**

51 Int. Cl.:

A61K 35/76 (2015.01)

C07K 14/005 (2006.01)

C12N 7/00 (2006.01)

C12Q 1/70 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.01.2015 PCT/EP2015/050355**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.07.2015 WO15104388**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.01.2015 E 15703227 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.07.2019 EP 3091992**

54 Título: **Tratamiento con bacteriófagos para infecciones por E. coli**

30 Prioridad:

10.01.2014 EP 14305041

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

12.03.2020

73 Titular/es:

PHERECYDES PHARMA (100.0%)

102 avenue Gaston Roussel

93230 Romainville, FR

72 Inventor/es:

POUILLOT, FLAVIE y

BLOIS, HÉLÈNE

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

Observaciones:

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

ES 2 747 964 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

Tratamiento con bacteriófagos para infecciones por *E. coli*

La presente invención se refiere a nuevos bacteriófagos, a las composiciones que los comprenden, a su fabricación y a los usos de los mismos. La invención está particularmente adaptada para el tratamiento de una infección en un mamífero y para la mejoría de una afección de un sujeto mediante la modificación de la microbiota de dicho sujeto.

Antecedentes de la invención

Los bacteriófagos (o fagos) son pequeños virus que presentan la capacidad de infectar y matar las bacterias al mismo tiempo que no afectan a las células de otros organismos. Los describió por primera vez hace casi un siglo William Twort y poco después los descubrió de manera independiente Félix d'Herelle, y hoy se han descubierto y descrito morfológicamente más de 6 000 bacteriófagos diferentes, que incluyen virus de bacterias y de arqueas. La inmensa mayoría de estos virus tienen cola, mientras que una pequeña proporción son polihédricos, filamentosos o pleomorfos. Se pueden clasificar de acuerdo con su forma, su contenido genético (ADN frente a ARN), su hospedador específico, el lugar en el que viven (virus marinos frente a otros hábitats) y su ciclo de vida. Como parásitos intracelulares de células bacterianas, los fagos presentan diferentes ciclos de vida dentro del hospedador bacteriano: infección lítica, lisogénica, pseudolisogénica y crónica (Weinbauer, 2004; Drulis-Kawa, 2012). Los fagos líticos provocan la lisis de la célula bacteriana hospedadora como una parte normal de su ciclo de vida. Los fagos lisogénicos (también denominados fagos temperados) pueden replicarse por medio del ciclo de vida lítica y provocar la lisis de la bacteria hospedadora, o bien pueden incorporar su ADN en el ADN de la bacteria hospedadora y convertirse en profagos no infecciosos. Cualesquiera que sea el tipo de ciclo de vida de un fago, la primera etapa es la adhesión a los receptores de la pared celular bacteriana antes de que los fagos puedan entrar en la bacteria. Este proceso específico influye en el espectro de las posibles interacciones entre fagos y bacterias.

Los bacteriófagos se utilizan con frecuencia como herramientas de investigación para modificar las bacterias en los experimentos de laboratorio.

Dada la especificidad de su célula diana hospedadora, se ha considerado que el uso de los fagos es un tratamiento con el que tratar las infecciones agudas y crónicas, sobre todo en dermatología, oftalmología, urología, estomatología, pediatría, otolaringología o cirugía. Este concepto del uso terapéutico de los fagos para tratar una infección bacteriana resultó, sin embargo, muy controvertido desde el comienzo y no fue ampliamente aceptado por el público ni por la comunidad médica. Los primeros estudios fueron ampliamente criticados por la ausencia de controles adecuados y la incongruencia de los resultados. La falta de reproducibilidad y los muchos resultados conflictivos obtenidos en los diferentes estudios publicados condujeron a que el Consejo de Farmacia y Química de la Asociación Médica Estadounidense concluyera que las pruebas para el valor terapéutico de los filtrados líticos eran en su mayor parte contradictorias, poco convincentes, y recomendaba que se siguiera investigando para confirmar sus pretendidos beneficios.

Desde la introducción de los antibióticos en los años cuarenta del siglo XX, se prestó poca atención a este campo de la terapéutica, sobre todo en el mundo occidental. Pero el extenso uso de los antibióticos ha conducido a la aparición generalizada y la diseminación de bacterias resistentes a los antibióticos por todo el mundo, lo que ocasiona problemas cada vez más graves. Por lo tanto, la superación de las escasas opciones terapéuticas que quedan para tratar los principales microorganismos con resistencia polifarmacológica se ha convertido en un desafío terapéutico importante.

Además, muchos microorganismos patógenos residen dentro de biopelículas, en donde dichas biopelículas provocan otros problemas más a la hora de diseñar nuevos agentes antimicrobianos. En este sentido, las bacterias que crecen como una biopelícula en vez de en forma de células sueltas («planctónicas») tienden a ser particularmente resistentes a agentes antimicrobianos y es particularmente difícil que el sistema inmunitario del hospedador monte una respuesta adecuada.

E. coli, una bacteria gramnegativa con forma de bacilo pequeño que pertenece al género *Escherichia* y a la familia *Enterobacteriaceae*, muestra una gran diversidad y aparece con mucha frecuencia en la flora microbiana de los humanos o de los animales. Se reveló que, aunque la mayoría de cepas de *E. coli* no son patógenas, pueden provocar infecciones oportunistas. Además, algunas cepas de *E. coli* son muy patógenas y pueden ocasionar enfermedades diversas y septicemia en los mamíferos, incluidos los humanos. Varias publicaciones asocian la enterobacteria *Escherichia coli* con infecciones de la piel y de las partes blandas (IPPB), una de las infecciones más habituales en los pacientes de todos los grupos de edad. En algunos casos moderados o graves, estas infecciones requieren la hospitalización y el tratamiento parenteral. Se encontró sobre todo que *E. coli* era el agente que causaba la onfalitis del recién nacido (Fraser et al., 2006), la celulitis localizada en las extremidades inferiores y superiores (Brzozowski et al., 1997, Corredoira et al., 1994), la fascitis necrosante (Afifi et al., 2008; Krebs et al., 2001), las infecciones del sitio quirúrgico (Tourmousoglou et al., 2008), las infecciones después de las lesiones por quemadura (Rodgers et al., 2000) y otras. Un estudio que vigiló las IPPB durante un periodo de 7 años y que abarcó tres continentes (Europa, América Latina y América del Norte) demostró que *E. coli* era un agente causal importante, ya que era la tercera especie aislada más prevalente. Por lo tanto, *E. coli* merece un tratamiento específico y selectivo, sobre todo al tener en cuenta el declive considerable de la susceptibilidad a los antibióticos que muestran las cepas de *E. coli* patógenas

en los últimos años, su diversidad y su presencia considerable en la flora microbiana.

Además, las bacterias de *E. coli* son capaces de formar biopelículas, lo que contribuye a su creciente resistencia a los antibióticos. Tales biopelículas pueden comprender más de un tipo de bacterias sostenidas y rodeadas por una matriz extracelular excretada y que ayuda a las bacterias a colonizar diferentes superficies. Las biopelículas permiten que las bacterias se adhieran a las superficies y alcancen densidades de población que, por otra parte, serían insostenibles, lo que confiere una resistencia creciente no solo a los antibióticos, sino también a muchas agresiones medioambientales entre las que están las toxinas, tales como metales pesados, lejías y otros agentes de limpieza. Se sabe que las bacterias del interior de las biopelículas pueden ser de 100 a 1 000 veces más resistentes a los antibióticos que la misma cepa de bacteria cuando crece en formas planctónicas. Una resistencia creciente tal significa que las bacterias que son aparentemente sensibles a los antibióticos en una prueba de laboratorio pueden ser resistentes al tratamiento en un entorno clínico. Incluso aunque se eliminen algunas, las biopelículas pueden ofrecer reservorios resistentes que permiten la colonización rápida una vez que los antibióticos ya no están presentes. Por lo tanto, resulta obvio que las biopelículas son factores importantes en muchas enfermedades humanas. La utilización de tratamientos químicos no es idónea contra las biopelículas, ya que para contrarrestar esto es precisamente por lo que han evolucionado. La abrasión física no es la manera de romper las biopelículas. Por desgracia, muchas superficies que dan soporte a las biopelículas para la patogenia bacteriana no son nada idóneas para la abrasión rigurosa, a saber, huesos, articulaciones, productos sanitarios implantados, etc. Por ejemplo, la superficie de las heridas o de las quemaduras son muy sensibles y delicadas. Incluso cuando la abrasión sea idónea y de uso corriente, la limpieza de las biopelículas es escasa. La placa oral de la superficie de los dientes es una biopelícula y se limpia parcialmente con el cepillado regular. Sin embargo, las bacterias se mantienen sobre las superficies sin cepillar (por ejemplo, en los huecos entre los dientes) y pueden recolonizar las superficies limpias con rapidez y eficacia. Teniendo en cuenta esto, está claro que los métodos existentes para limpiar las biopelículas resultan poco eficaces.

La aptitud para la adaptación rápida y su capacidad para formar biopelículas son las principales razones que identifican a *E. coli* como un patógeno oportunista. Ha adquirido la categoría de patógeno hospitalario y se puede aislar de muestras clínicas tomadas de heridas, esputo, vejiga, uretra, vagina, oídos, ojos y vías respiratorias. La aparición de la resistencia a los antibióticos más nuevos y poderosos en tales cepas clínicas de *E. coli*, que se produce incluso durante el tratamiento, hace que la lucha contra los patógenos hospitalarios de *E. coli* sea un gran problema. Además, se ha notificado que las afecciones patológicas y fisiológicas de un sujeto están influidas por el equilibrio de los microorganismos de la microbiota del sujeto. En consecuencia, la modificación de la flora microbiana o la modificación de dicho equilibrio, o la restauración de dicho equilibrio, mediante la destrucción de la población de *E. coli*, es también un método valioso para mejorar la afección de un sujeto.

La solicitud de patente internacional WO 2012/036580 describe bacteriófagos y los usos médicos de los mismos. En concreto, se describe el bacteriófago F488/08, que infecta las cepas de *E. coli* y cuya secuencia genómica se da a conocer como SEQ ID n.º 3 en la solicitud de patente internacional WO 2012/036580. Hay una gran necesidad de nuevos agentes o composiciones antibacterianas que se puedan utilizar para destruir las cepas de *E. coli*, incluso cuando se organizan en biopelículas bacterianas, idóneas para el uso en el tratamiento de humanos o de animales, así como para la descontaminación de materiales.

Compendio de la invención

La invención es tal y como está definida en las reivindicaciones.

Los inventores han aislado y caracterizado nuevos bacteriófagos que presentan actividad lítica específica contra *Escherichia coli* (*E. coli*), y que se pueden utilizar como agentes activos en las preparaciones farmacéuticas o veterinarias, en concreto para tratar las infecciones bacterianas de *E. coli* o para modificar el equilibrio microbiano en un sujeto. Los nuevos bacteriófagos de la invención muestran actividad lítica fuerte, gran selectividad, y se pueden combinar para inducir la destrucción controlada de un espectro muy amplio de células de *E. coli*.

Un objeto de la invención es dar a conocer composiciones antibacterianas que comprenden al menos dos bacteriófagos que tienen actividad lítica contra una cepa de *Escherichia coli*, en donde dicha composición es como está definida en las reivindicaciones.

Otro objeto de la presente invención se refiere a un bacteriófago que tiene actividad lítica contra una cepa de *Escherichia coli*, en donde dicho bacteriófago tiene un genoma que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID n.º 9 o un genoma que consiste en una secuencia que tiene una identidad de al menos el 99 % con ella. En una realización específica, los bacteriófagos de la invención muestran actividad lítica contra las cepas resistentes a múltiples fármacos, en particular contra una *E. coli* patógena resistente a los antibióticos, tales como, preferiblemente, las cepas de *E. coli* con β -lactamasas de amplio espectro (BLAE) o las verotoxígena (ECVT).

Otro objeto de la invención se refiere a un bacteriófago que es BP1151, que tiene un genoma que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID n.º 9.

La invención se refiere además a una secuencia de ácido nucleico aislado contenido en un bacteriófago de la invención y que comprende la secuencia nucleotídica de la SEQ ID n.º 9.

Las composiciones de la invención comprenden típicamente además un excipiente o vehículo farmacéutica o veterinariamente aceptable. Pueden ser líquidas, semilíquidas, sólidas o liofilizadas.

Otro objeto de la invención se refiere a un bacteriófago o composición tal y como está definido más arriba, para ser usado en el tratamiento de una infección en un mamífero o para la descontaminación de un material.

5 La invención se refiere también a un bacteriófago o composición tal y como está definido más arriba, para ser usado para mejorar una afección de un sujeto mediante la modificación de la flora microbiana en dicho sujeto. La flora microbiana se puede modificar mediante la corrección, adaptación o restauración de un equilibrio adecuado de los microorganismos de dicha microbiota.

10 La descripción también da a conocer un método para tratar una infección en un mamífero, que comprende la administración a dicho mamífero de al menos un bacteriófago o composición, tal y como está definido más arriba.

La invención también describe un método para tratar una superficie o material que se sospecha que está contaminado con una bacteria de *E. coli*, que comprende la aplicación sobre dicha superficie o material de al menos un bacteriófago, ácido nucleico, polipéptido o composición, tal y como está definido más arriba. La superficie o material puede ser una superficie de, p. ej., cualquier dispositivo, recipiente o material de laboratorio, ropa, etc.

15 Otro objeto de la invención se refiere a un método para predecir o determinar la eficacia de un tratamiento con bacteriófagos en un sujeto, en donde el método comprende la etapa de determinar *in vitro* una actividad lítica de un bacteriófago que tiene un genoma que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID n.º 9, o un genoma que consiste en una secuencia que tiene una identidad de al menos el 99 % de ella, con una cepa de *E. coli* de una muestra de dicho sujeto, en donde una actividad lítica de dicho bacteriófago contra al menos una cepa de *E. coli* de dicha muestra es indicativa de un tratamiento eficaz. La descripción comprende además opcionalmente la etapa de tratar al sujeto con dicho bacteriófago.

20 En otro aspecto, la invención da a conocer un método para seleccionar un sujeto o determinar si un sujeto es posible que se beneficie de un tratamiento con bacteriófagos, en donde el método comprende la etapa de determinar *in vitro* una actividad lítica de un bacteriófago que tiene un genoma que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID n.º 9, o un genoma que consiste en una secuencia que tiene una identidad de al menos el 99 % con ella, contra una cepa de *E. coli* de una muestra de dicho sujeto, en donde una actividad lítica de dicho bacteriófago contra al menos una cepa de *E. coli* es indicativa de un sujeto que responde.

25 La invención se puede utilizar en cualquier mamífero, preferiblemente en los seres humanos o para tratar cualquier material, que incluye materiales de laboratorio o productos sanitarios.

30 **Breve descripción de los dibujos**

Figura 1: Eficacia *in vitro* de los bacteriófagos de la invención sobre combinaciones de cepas de *E. coli* a diferentes MDI.

Figura 2: Eficacia *in vivo* de los bacteriófagos de la invención sobre combinaciones de cepas de *E. coli* a diferentes dosis.

35 Figura 3: Eficacia de los bacteriófagos de la invención sobre la infección *in vivo* mediada por la cepa de *E. coli* SH113. Φ IV: tratamiento intravenoso; Φ IP: tratamiento intraperitoneal; Φ SC: tratamiento subcutáneo; Temp. inf.: control infectado sin tratar; Temp. Genta.: control infectado tratado con gentamicina.

40 Figura 4: Eficacia de los bacteriófagos de la invención sobre la infección *in vivo* mediada por la cepa de *E. coli* SH113: efecto de la dosis. Φ conc.: concentración total (10^8 ufp/ml); Φ 1/10: concentración diluida 10 veces; Φ 1/100: concentración diluida 100 veces; Φ 1/1000: concentración diluida 1 000 veces; Tem infect.: control infectado tratado con antibiótico.

Descripción detallada de la invención

La invención es tal y como está definida en las reivindicaciones.

45 La presente invención se refiere a nuevos bacteriófagos, componentes de los mismos, composiciones que los comprenden, su fabricación y los usos de los mismos como antibacterianos, en concreto para el tratamiento de una infección en un mamífero y para mejorar una afección del sujeto mediante la modificación de la flora microbiana en dicho sujeto.

Definiciones

Para facilitar la comprensión de la invención, se definen a continuación una serie de términos.

50

Tal y como se utiliza en la presente memoria, el término «bacteriófago» o «fago» se refiere a una partícula de fago funcional que comprende un genoma de ácido nucleico empaquetado en una envoltura proteica o cápsida. El término también se refiere a las porciones del bacteriófago, entre ellas, p. ej., una porción de la cabeza o un ensamblaje de componentes del fago, que dan a conocer sustancialmente la misma actividad funcional.

5 El término «*característica fenotípica*» designa más preferiblemente la forma y/o el abanico de hospedadores de un bacteriófago. Los métodos para fenotipar los bacteriófagos se conocen bien por sí mismos en la materia e incluyen, por ejemplo, la determinación del abanico de hospedadores bacterianos y/o la actividad contra la biopelícula producida por determinadas cepas bacterianas.

10 El término «actividad lítica», tal y como se utiliza en la invención, designa la capacidad que tiene un bacteriófago para provocar la lisis de una célula bacteriana. La actividad lítica de un bacteriófago se puede analizar en las cepas de *E. coli* de acuerdo con las técnicas conocidas de por sí en la materia (véase también el apartado experimental).

15 El término «variante» de un bacteriófago de referencia designa los bacteriófagos que tienen una o varias variaciones en la secuencia genómica y/o en los polipéptidos codificados por ella en comparación con dicho bacteriófago de referencia, al mismo tiempo que conservan las mismas características fenotípicas que el bacteriófago de referencia. Las variantes comprenden típicamente, p. ej., mutaciones silenciosas, mutaciones conservativas, deleciones menores y/o repeticiones menores de material genético, y conservan las características fenotípicas del bacteriófago de referencia. En una realización preferida, la variante de la invención conserva cualquier característica o propiedad observable que es dependiente del genoma del bacteriófago de la invención, a saber, las características fenotípicas de dicho bacteriófago y/o la actividad lítica contra las cepas de *E. coli*. Las variantes preferidas tienen menos de un 20 5 % variación en el ácido nucleico en comparación con el genoma del bacteriófago de referencia, incluso más preferiblemente menos del 4 %, más preferiblemente menos del 2 %. Como alternativa, o en combinación, las variantes tienen preferiblemente menos del 5 % de aminoácidos variantes en una secuencia polipeptídica codificada en comparación con un polipéptido del bacteriófago de referencia.

25 El término «% de identidad», con respecto a las secuencias de ácidos nucleicos, designa el nivel de identidad u homología entre dichas secuencias y se puede determinar por técnicas conocidas por sí mismas en la materia. Típicamente, el % de identidad entre dos secuencias de ácido nucleico se determina por medio de programas informáticos, tales como GAP incluido en el paquete de programas del GCG (Manual de los programas del paquete de Winsconsin, versión 8, agosto de 1996, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, Estados Unidos 53711) (Needleman, S. B. y Wunsch, C. D., (1970), *Journal of Molecular Biology*, 48, 443-453). Con la configuración ajustada a, p. ej., las secuencias de ADN (en concreto: penalización por creación de hueco de 5,0, y penalización por extensión del hueco de 0,3), las moléculas de ácido nucleico se pueden alinear unas con otras mediante el uso del programa informático de alineamiento Pileup disponible como parte del paquete de programas del GCG.

35 El término «fragmento» de un ácido nucleico designa típicamente un fragmento que tiene al menos 10 nucleótidos consecutivos de dicho ácido nucleico, más preferiblemente al menos 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50 o más nucleótidos consecutivos de dicho ácido nucleico.

El término «fragmento» de un polipéptido designa típicamente un fragmento que tiene al menos 5 aminoácidos consecutivos de dicho polipéptido, más preferiblemente al menos 10, 15, 20, 30, 40, 50 o más aminoácidos consecutivos de dicho polipéptido.

40 El término «cepa BLAE de *E. coli*» se refiere a una *E. coli* resistente a antibióticos, más en concreto a cepas de *E. coli* productoras de β -lactamasas de amplio espectro.

El término «ECVT» se refiere a otro tipo de cepas de *E. coli* resistentes a antibióticos, más en concreto a cepas de *E. coli* productoras de verotoxina (verotoxígenas).

45 El término «específico» o «especificidad» con respecto a un bacteriófago se refiere al tipo de hospedador que dicho bacteriófago es capaz de infectar. La especificidad suele estar mediada por las fibras en la cola de los bacteriófagos, que intervienen en la interacción con los receptores que se expresan en las células. Un bacteriófago «específico» de *E. coli* designa más preferiblemente a un bacteriófago que puede infectar una o varias cepas de *E. coli* y que no puede infectar otras bacterias que no sean *E. coli* en las condiciones fisiológicas.

50 Tal y como se utiliza en la presente memoria, el término «polipéptido» se refiere a polipéptidos de cualquier tamaño, que incluyen los péptidos pequeños de, p. ej., de 5 a 20 aminoácidos, los polipéptidos más largos, las proteínas o los fragmentos de las mismas.

55 El término «ELP» o «efecto lítico productivo» designa la proporción entre la magnitud del brote y el tiempo lítico productivo de un bacteriófago dado. La magnitud del brote y el tiempo lítico productivo son parámetros que definen la interacción entre el fago y el hospedador, y corresponden, respectivamente, al rendimiento medio de partículas de bacteriófago producidas por la infección de una bacteria por un fago, y al tiempo que tarda un bacteriófago libre en lisar una célula bacteriana.

En el contexto de la presente especificación, el término «bacteriófago aislado» se debe considerar que significa el material retirado de su medio original en el que se produce de forma natural. Con respecto a un bacteriófago, el término designa, en concreto, un fago que, p. ej., está cultivado, está purificado y/o se cultiva por separado del medio en el que se localiza de forma natural. Con respecto a un ácido nucleico o polipéptido, el término «aislado» designa, p. ej., una molécula de ácido nucleico o polipéptido que está separada de al menos algunos de los componentes de su entorno natural, tales como, p. ej., una proteína, un lípido y/o un ácido nucleico.

La terminología «farmacéutica o veterinariamente aceptable», tal y como se utiliza en la presente memoria, se refiere a cualquier material (p. ej., vehículo, excipiente o sustancia de arrastre) que es compatible con el uso en un sujeto mamífero. Tal material incluye soluciones o vehículos fisiológicamente aceptables que son inocuos o no causan ninguna reacción inmunitaria inespecífica ni específica significativa sobre un organismo, o no destruyen la actividad biológica del compuesto activo. Para la formulación de la composición en una preparación líquida, se pueden utilizar como excipiente o vehículo farmacéutica o veterinariamente aceptable solución salina, agua estéril, solución de Ringer, solución salina fisiológica tamponada, solución de infusión con albúmina, solución con dextrosa, solución con maltodextrina, glicerol, etanol, y mezclas de las mismas. Si fuera necesario, se le pueden añadir otros aditivos convencionales, tales como espesantes, diluyentes, tamponantes, conservantes, surfactantes, antioxidantes y bacteriostáticos. Además, los diluyentes, disgregantes, tensioactivos, aglutinantes y lubricantes se pueden añadir adicionalmente a la composición para preparar formulaciones inyectables, tales como soluciones acuosas, suspensiones y emulsiones, formulaciones orales, tales como píldoras, cápsulas, gránulos o comprimidos, o formulaciones en polvo.

Tal y como se utiliza en la presente memoria, «UFP» significa unidad formadora de placa (o calva), tal como está bien definido en la técnica. Los bacteriófagos líticos lisan la célula hospedadora, lo que causa una zona transparente (o calva) en una placa de cultivo sólido. Teóricamente, cada calva (o placa de lisis) se forma gracias a un fago y el número de calvas multiplicado por el factor de dilución es igual al número total de fagos en una preparación problema.

El término «tratamiento» o «terapia» designa tanto un tratamiento curativo como un tratamiento profiláctico de una enfermedad. Un tratamiento curativo se define como aquel tratamiento que da lugar a la cura, o un tratamiento que alivia, mejora y/o elimina, reduce y/o estabiliza los síntomas de una enfermedad o el sufrimiento que provoca de manera directa o indirecta. Un tratamiento profiláctico comprende tanto un tratamiento que da lugar a la prevención de una enfermedad como un tratamiento que reduce y/o retrasa la incidencia de una enfermedad o el riesgo de su aparición.

El término «mamífero» incluye los sujetos humanos, así como los mamíferos no humanos, tales como mascotas (p. ej., perros, gatos), caballos, rumiantes, ovejas, cabras, cerdos, etc.

El término «biopelícula», tal y como se utiliza en la presente memoria, designa a la formación bacteriana heterogénea que crece en diferentes superficies; preferiblemente, una comunidad bacteriana que crece incluida en una matriz de exopolisacáridos adherida sobre superficies sólidas biológicas o no biológicas.

El término «comprometer», tal y como se utiliza en la presente memoria, se refiere a cualquier alteración de la integridad. Al comprometer una biopelícula bacteriana, se entiende que el bacteriófago ha penetrado en la biopelícula, que hay una infección de las bacterias asociadas a la biopelícula y/o una lisis de las mismas y/o una eliminación parcial o completa de la biopelícula (a saber, al parar la colonización y/o al romper las biopelículas).

El término «muestra», tal y como se utiliza en la presente memoria, hace referencia a cualquier muestra que contiene células. Los ejemplos de tales muestras incluyen líquidos, tales como sangre, plasma, saliva u orina, así como muestras de biopsias, órganos, tejidos o células. La muestra se puede tratar antes de su uso.

Tal y como se utiliza en la presente memoria, el término «sujeto» o «paciente» se refiere a un animal, preferiblemente a un mamífero, incluso más preferiblemente a un humano, que incluye los adultos y los niños. Sin embargo, el término «sujeto» también abarca animales no humanos, en concreto mamíferos, tales como perros, gatos, caballos, vacas, cerdos, ovejas y primates no humanos, entre otros.

El término «eficacia» del tratamiento o «respuesta» a un tratamiento con bacteriófagos, tal y como se utiliza en la presente memoria, se refiere a un tratamiento que da lugar a una disminución del número de cepas de *E. coli* en un sujeto después del tratamiento con bacteriófagos cuando se compara con el número de cepas de *E. coli* antes del tratamiento. Un sujeto «que responde bien» se refiere a un sujeto que muestra o mostrará una recuperación clínicamente significativa cuando se trate con un tratamiento con bacteriófagos.

El término «cóctel» o composición de bacteriófagos designa una combinación de dos o más bacteriófagos diferentes. Los bacteriófagos en un cóctel/composición están formulados preferiblemente juntos, a saber, en un mismo recipiente o envase, aunque se pueden utilizar como kits de partes, en donde los bacteriófagos (o algunos de ellos) están formulados o envasados por separado y se combinan cuando se utilizan o administran.

55

Descripción de las realizaciones

La presente invención se refiere a nuevos tratamientos con bacteriófagos. Más en concreto, la presente invención se refiere a nuevos bacteriófagos que tienen una gran especificidad por las cepas de *Escherichia coli*, su fabricación, los componentes de los mismos, las composiciones que los comprenden y los usos de los mismos en el tratamiento con fagos. La invención es tal y como queda definida en las reivindicaciones.

Bacteriófagos:

En un primer aspecto, la invención describe el aislamiento y la caracterización de nuevos bacteriófagos que son específicos de las cepas de *E. coli* y presentan, solos o en una o varias combinaciones, un notable y amplio espectro de hospedadores para la actividad lítica. Estos bacteriófagos se han seleccionado de muestras medioambientales, se han aislado y se han caracterizado. Tal y como se indica, los bacteriófagos son, de manera individual o en una o varias combinaciones, activos contra las cepas de *E. coli*. Son notablemente eficaces contra las cepas patógenas de *E. coli*, tales como las cepas de *E. coli* resistentes a los antibióticos. Además, los bacteriófagos de la invención tienen un efecto lítico productivo («ELP») notable por debajo de 15, más preferiblemente por debajo de 10 y aún más preferiblemente entre 0,1 y 10. Además, los bacteriófagos de la invención son específicos de las cepas de *E. coli*, a saber, no provocan la lisis de las bacterias que no sean de *E. coli*. Tal y como se ilustrará adicionalmente, la invención demuestra que estos bacteriófagos se pueden combinar y formular en condiciones idóneas para ser utilizados como agentes farmacéuticos o veterinarios por exhibir un efecto antibacteriano muy potente y selectivo contra un espectro controlado de cepas de *E. coli*.

Más específicamente, se han seleccionado y caracterizado los bacteriófagos que vienen a continuación. También se indican sus correspondientes secuencias de ácido nucleico.

Tabla 1

| SEQ ID n.º | Bacteriófago |
|---------------|--------------|
| SEQ ID NO: 1 | BP539 |
| SEQ ID NO: 2 | BP700 |
| SEQ ID NO: 3 | BP753 |
| SEQ ID NO: 4 | BP814 |
| SEQ ID NO: 5 | BP953 |
| SEQ ID NO: 6 | BP954 |
| SEQ ID NO: 7 | BP970 |
| SEQ ID NO: 8 | BP1002 |
| SEQ ID NO: 9 | BP1151 |
| SEQ ID NO: 10 | BP1155 |
| SEQ ID NO: 11 | BP1168 |
| SEQ ID NO: 12 | BP1176 |
| SEQ ID NO: 13 | BP1197 |
| SEQ ID NO: 14 | BP1226 |
| SEQ ID NO: 15 | BP1229 |

El perfil lítico de estos bacteriófagos se ha determinado sobre un amplio número de cepas de *E. coli*. Estos bacteriófagos se han seleccionado por su potencia y sus posibles combinaciones, tal y como se describe en la tabla que viene a continuación. En esta tabla, se presentan el efecto lítico de los bacteriófagos sobre las cepas resistentes a los patógenos y de referencia para confirmar el potencial lítico elevado.

Tabla 2

| | Fago EC | 539 | 700 | 753 | 814 | 953 | 954 | 970 | 1002 | 1151 | 1155 | 1168 | 1176 | 1197 | 1226 | 1229 | 15 fagos |
|----|---------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|------|------|------|------|------|------|------|----------|
| 1 | K12/DH5 | + | | | | + | | + | | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 2 | ECOR1 | | | | | + | | + | | | | | | | | | + |
| 3 | ECOR2 | | | | | | | + | | +/- | + | | + | +/- | +/- | + | + |
| 4 | ECOR4 | | | | | + | | | | | | | + | | | | + |
| 5 | ECOR5 | | | | | + | | + | | | | | | | | | + |
| 6 | ECOR10 | | | + | | | | +/- | | | | | | | | | + |
| 7 | ECOR13 | | | | | + | | + | | + | +/- | +/- | + | + | + | +/- | + |
| 8 | ECOR15 | + | | | | | | + | +/- | + | + | + | + | + | | + | + |
| 9 | ECOR24 | | | | | | + | | +/- | + | | | + | | | | + |
| 10 | ECOR28 | | | | | + | | + | | | + | + | +/- | + | +/- | +/- | + |
| 11 | ECOR35 | + | | | | | + | | + | +/- | | + | +/- | | | | + |
| 12 | ECOR38 | + | | | | | + | | + | +/- | | | | | | | + |
| 13 | ECOR40 | + | | | | | + | | + | +/- | | | | | | | + |
| 14 | ECOR46 | | + | | + | | + | | | + | + | + | | + | | + | + |
| 15 | ECOR48 | | | + | | | | | +/- | + | | | | + | +/- | + | + |
| 16 | ECOR50 | | + | | + | | | | | +/- | +/- | +/- | | +/- | | +/- | + |
| 17 | ECOR54 | + | | | | | | | + | + | + | + | | + | | + | + |
| 18 | ECOR55 | | + | | + | + | | | + | | + | + | + | | | + | + |
| 19 | ECOR56 | | | + | | + | | | + | + | | | +/- | | | | + |
| 20 | ECOR59 | | | | | + | | | + | +/- | + | + | +/- | + | + | + | + |
| 21 | ECOR60 | | + | | | + | | | + | +/- | | | + | + | +/- | | + |
| 22 | ECOR62 | + | | | | | + | | | + | | | | | | | + |
| 23 | ECOR64 | + | + | | + | | | | + | + | | | | | | | + |
| 24 | ECOR71 | + | | | | | | | | +/- | + | +/- | | + | | | + |
| 25 | ECOR72 | | | | | + | | + | | | | +/- | | +/- | +/- | +/- | + |

Las celdas sombreadas son ejemplos de cepas de *E. coli* productoras.

5 Tal y como se puede observar a partir de la tabla 2, estos fagos tienen individualmente un poder lítico muy fuerte y se pueden producir combinaciones (o cócteles) de estos bacteriófagos que son capaces de destruir todas las cepas de *E. coli* analizadas, gracias a lo cual se producen composiciones antibacterianas de amplio espectro.

A modo de ilustración, un cóctel de los 15 fagos de la invención es capaz de destruir con eficacia todas las bacterias recogidas en la tabla 2.

10 Además, se ha analizado la especificidad de los bacteriófagos en muchas cepas que no son de *E. coli*. Más en concreto, en el apartado experimental se demuestra que los bacteriófagos de la invención no tienen ningún efecto lítico sobre las bacterias seleccionadas de *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinebacter baumannii*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter asburiae*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus aureus*, *Stenotrophomonas maltophilia* y/o *Serratia marcescens*.

15 Un objeto concreto de la invención reside, así pues, en un bacteriófago que tiene actividad lítica contra una cepa de *E. coli* y que tiene un genoma que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID n.º 9 o un genoma que consiste en una secuencia que tiene una identidad de al menos el 99 % con ella.

Un objeto concreto de la invención reside, así pues, en un bacteriófago que tiene actividad lítica contra una cepa de *E. coli* y que tiene un genoma que tiene o consiste de una secuencia de nucleótidos de SEQ ID n.º 9.

20 Los bacteriófagos de la invención se pueden preparar mediante métodos estándares de cultivo, aislamiento y purificación. Por ejemplo, se cultivan las bacterias productoras de *E. coli*, se infectan con una muestra de un bacteriófago y, a continuación, se tratan para retirar las células bacterianas y los desechos. La solución de bacteriófagos enriquecida se puede sembrar en placas en un medio, por ejemplo, de agar, que lleva incluida una cepa de *E. coli* hospedadora sensible para obtener calvas. A continuación, se puede recoger una única calva para una posterior purificación y amplificación del bacteriófago. Se puede realizar uno o más ciclos de la amplificación selectiva de los bacteriófagos de la invención, por ejemplo, mediante la mezcla de los bacteriófagos con la *E. coli* competente, seguido de la adición de un medio de crecimiento y de la incubación en las condiciones de crecimiento seleccionadas para el problema. Después de la centrifugación, el sobrenadante amplificado transparente se filtra a través de un filtro y se somete a otro ciclo de amplificación selectiva o se le analiza la presencia de actividad lítica. El título del fago en una suspensión y la visualización de la forma de la calva de los bacteriófagos de la invención se puede estimar con

los métodos conocidos, por ejemplo, mediante el recuento de calvas. Además, el procesamiento de los bacteriófagos de la invención en diferentes formas (líquida, liofilizada, etc.) para el almacenamiento breve, largo, congelado o de otra clase se puede llevar a cabo mediante cualquier método idóneo, tal y como se conoce bien en la técnica (véase Clark, 1962).

5 La actividad de los bacteriófagos de la invención se puede valorar mediante los métodos bien conocidos en la técnica, tal como el ensayo de calvas también conocido como método de agar doble, basado en el crecimiento del bacteriófago con las posibles bacterias hospedadoras seguido de la valoración de su capacidad para acabar con la célula bacteriana hospedadora. En el método de ensayo de calvas, el bacteriófago induce la lisis de las cepas de *E. coli* destinatarias después de un periodo de incubación en el medio de agar blando, lo que da lugar a zonas transparentes en la placa
10 conocidas como calvas. En un aspecto preferido, los bacteriófagos de la invención muestran, solos o en combinación, actividad lítica sobre una cepa de *E. coli* patógena, que incluye una cepa de *E. coli* resistente a los antibióticos, tal como una cepa BLAE de *E. coli*. Además, las variantes de estos bacteriófagos que conservan el fenotipo (p. ej., especificidad o actividad lítica) de estos bacteriófagos se puede producir y/o aislar mediante las técnicas conocidas por sí mismas en la materia.

15 La invención comprende el bacteriófago BP1151 que tiene actividad lítica sobre una cepa de *E. coli* y que tiene un genoma que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID n.º 9, o una variante de la misma que tiene actividad lítica sobre una cepa de *E. coli*, y un genoma que consiste en una secuencia que tiene una identidad de al menos el 99 % con la SEQ ID n.º 9. Dicho bacteriófago se puede producir o expandir en, p. ej., la cepa de *E. coli* ECOR56. BP1151 o cualquier variante del mismo, es específico y tiene actividad lítica contra las cepas K12/DH5, ECOR2,
20 ECOR13, ECOR15, ECOR24, ECOR35, ECOR38, ECOR40, ECOR46, ECOR48, ECOR50, ECOR54, ECOR56, ECOR59, ECOR60, ECOR62, ECOR64 y/o ECOR71. BP1151 comprende un genoma que comprende una secuencia tal como la presentada en la SEQ ID n.º 9 o un genoma que consiste en una secuencia que tiene una identidad de al menos el 99 % con la SEQ ID n.º 9. También se da a conocer una secuencia de ácido nucleico aislado del bacteriófago BP1151, que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID n.º 9. El bacteriófago BP1151 de la invención
25 también se caracteriza por un ELP por debajo de 15, más preferiblemente por debajo de 10 y aún más preferiblemente de aproximadamente 10.

En una realización en concreto, la invención describe el bacteriófago BP539, o cualquier variante del mismo. El bacteriófago BP539, o cualquier variante del mismo, se puede producir o expandir en, p. ej., la cepa ECOR54 de *E. coli*. BP539, o cualquier variante del mismo, es específico de, y tiene actividad lítica contra, las cepas K12/DH5,
30 ECOR15, ECOR35, ECOR38, ECOR40, ECOR54, ECOR62, ECOR64 y/o ECOR71. BP539 comprende un genoma que comprende una secuencia tal y como se presenta en la SEQ ID n.º 1, o que tiene una identidad de al menos el 97 %, 98 % o 99 % con la SEQ ID n.º 1. También se describe una secuencia de ácido nucleico aislado del bacteriófago BP539, o variante del mismo. El bacteriófago BP539 también se caracteriza por un ELP por debajo de 15, más preferiblemente por debajo de 10 y aún más preferiblemente de aproximadamente 0,1.

35 En otra realización en concreto, la invención describe el bacteriófago BP700, o cualquier variante del mismo. El bacteriófago BP700, o cualquier variante del mismo, se puede producir o expandir en, p. ej., la cepa de *E. coli* ECOR55. BP700, o cualquier variante del mismo, es específico de, y tiene actividad lítica contra, las cepas ECOR46, ECOR55, ECOR60 y/o ECOR64. BP700 comprende un genoma que comprende una secuencia que se presenta en la SEQ ID n.º 2 o que tiene una identidad de al menos el 97 %, 98 % o 99 % con la SEQ ID n.º 2. También se describe una
40 secuencia de ácido nucleico aislado del bacteriófago BP700, o variante del mismo. El bacteriófago BP700 también se caracteriza por un ELP por debajo de 15, más preferiblemente por debajo de 10 y aún más preferiblemente de aproximadamente 2.

Aún en otro aspecto, la invención describe el bacteriófago BP753, o cualquier variante del mismo. El bacteriófago BP753, o cualquier variante del mismo, se puede producir o expandir en, p. ej., la cepa de *E. coli* ECOR56. BP753, o cualquier variante del mismo, es específico de, y tiene actividad lítica contra, las cepas ECOR10, ECOR48 y/o ECOR56. BP753 comprende un genoma que comprende una secuencia tal y como se presenta en la SEQ ID n.º 3 o que tiene una identidad de al menos el 97 %, 98 % o 99 % con la SEQ ID n.º 3. También se describe una secuencia de ácido nucleico aislado del bacteriófago BP753, o variante del mismo. El bacteriófago BP753 también se caracteriza por un ELP por debajo de 15, más preferiblemente por debajo de 10 y aún más preferiblemente de aproximadamente 2.

50 En otro aspecto, la invención describe el bacteriófago BP814, o cualquier variante del mismo. El bacteriófago BP814, o cualquier variante del mismo, se puede producir o expandir en, p. ej., la cepa de *E. coli* ECOR55. BP814, o cualquier variante del mismo, es específico y tiene actividad lítica contra las cepas ECOR46, ECOR50, ECOR55 y/o ECOR64. BP814 comprende un genoma que comprende una secuencia tal y como se presenta en la SEQ ID n.º 4 o que tiene una identidad de al menos el 97 %, 98 % o 99 % con la SEQ ID n.º 4. También se describe una secuencia de ácido nucleico aislado del bacteriófago BP814, o una variante del mismo. El bacteriófago BP814 también se caracteriza por un ELP por debajo de 15, más preferiblemente por debajo de 10 y aún más preferiblemente de aproximadamente 0,3.
55

En otra realización en concreto, la invención describe el bacteriófago BP953, o cualquier variante del mismo. El bacteriófago BP953, o cualquier variante del mismo, se puede producir o expandir en, p. ej., la cepa de *E. coli* ECOR55. BP953, o cualquier variante del mismo, es específico de, y tiene actividad lítica contra, las cepas K12/DH5, ECOR1,

ECOR46, ECOR50, ECOR54, ECOR55, ECOR59 y/o ECOR60. BP953 comprende un genoma que comprende una secuencia tal y como se presenta en la SEQ ID n.º 5 o que tiene una identidad de al menos el 97 %, 98 % o 99 % con la SEQ ID n.º 5. También se describe una secuencia de ácido nucleico aislado del bacteriófago BP953, o variante del mismo. El bacteriófago BP953 también se caracteriza por un ELP por debajo de 15, más preferiblemente por debajo de 10 y aún más preferiblemente de aproximadamente 3.

En otra realización en concreto, la invención describe el bacteriófago BP954, o cualquier variante del mismo. El bacteriófago BP954, o cualquier variante del mismo, se puede producir o expandir en, p. ej., la cepa de *E. coli* ECOR35. BP954, o cualquier variante del mismo, es específico de, y tiene actividad lítica contra, las cepas ECOR24, ECOR35, ECOR38, ECOR40, ECOR46 y/o ECOR62. BP954 comprende un genoma que comprende una secuencia tal y como se presenta en la SEQ ID n.º 6 o que tiene una identidad de al menos el 97 %, 98 % o 99 % con la SEQ ID n.º 6. También se describe una secuencia de ácido nucleico aislado del bacteriófago BP954, o variante del mismo. El bacteriófago BP954 también se caracteriza por un ELP por debajo de 15, más preferiblemente por debajo de 10 y aún más preferiblemente de aproximadamente 3.

Aún en otro aspecto, la invención describe el bacteriófago BP970, o cualquier variante del mismo. El bacteriófago BP970, o cualquier variante del mismo, se puede producir o expandir en, p. ej., la cepa de *E. coli* K12/DH5. BP970, o cualquier variante del mismo, es específico de, y tiene actividad lítica contra, las cepas K12/DH5, ECOR1, ECOR2, ECOR5, ECOR10, ECOR13, ECOR15, ECOR28 y/o ECOR72. BP970 comprende un genoma que comprende una secuencia tal y como se presenta en la SEQ ID n.º 7 o que tiene una identidad de al menos el 97 %, 98 % o 99 % con la SEQ ID n.º 7. También se describe una secuencia de ácido nucleico aislado del bacteriófago BP970, o variante del mismo. El bacteriófago BP970 también se caracteriza por un ELP por debajo de 15, más preferiblemente por debajo de 10 y aún más preferiblemente de aproximadamente 5.

En otra realización en concreto, la invención describe el bacteriófago BP1002, o cualquier variante del mismo. El bacteriófago BP1002, o cualquier variante del mismo, se puede producir o expandir en, p. ej., la cepa de *E. coli* ECOR56. BP1002, o cualquier variante del mismo, es específico de, y tiene actividad lítica contra, las cepas ECOR15, ECOR24, ECOR35, ECOR38, ECOR40, ECOR48, ECOR54, ECOR55, ECOR56, ECOR59, ECOR60 y/o ECOR64. BP1002 comprende un genoma que comprende una secuencia tal y como se presenta en la SEQ ID n.º 8 o que tiene una identidad de al menos el 97 %, 98 % o 99 % con la SEQ ID n.º 8. También se describe una secuencia de ácido nucleico aislado del bacteriófago BP1002, o variante del mismo. El bacteriófago BP1002 se caracteriza también por un ELP por debajo de 15, más preferiblemente por debajo de 10 y aún más preferiblemente de aproximadamente 5.

En otro aspecto, la invención describe el bacteriófago BP1155, o cualquier variante del mismo. El bacteriófago BP1155, o cualquier variante del mismo, se puede producir o expandir en, p. ej., la cepa de *E. coli* ECOR59. BP1155, o cualquier variante del mismo, es específico de, y tiene actividad lítica contra, las cepas K12/DH5, ECOR2, ECOR13, ECOR15, ECOR28, ECOR46, ECOR50, ECOR54, ECOR55, ECOR59 y/o ECOR71. BP1155 comprende un genoma que comprende una secuencia tal y como se presenta en la SEQ ID n.º 10, o que tiene una identidad de al menos el 97 %, 98 % o 99 % con la SEQ ID n.º 10. También se describe una secuencia de ácido nucleico aislado del bacteriófago BP1155, o variante del mismo. El bacteriófago BP1155 también se caracteriza por un ELP por debajo de 15, más preferiblemente por debajo de 10 y aún más preferiblemente de aproximadamente 0,5.

Aún en otro aspecto, la invención describe el bacteriófago BP1168, o cualquier variante del mismo. El bacteriófago BP1168, o cualquier variante del mismo, se puede producir o expandir en, p. ej., la cepa de *E. coli* ECOR59. BP1168, o cualquier variante del mismo, es específico de, y tiene actividad lítica contra, las cepas K12/DH5, ECOR13, ECOR15, ECOR28, ECOR35, ECOR46, ECOR50, ECOR54, ECOR55, ECOR59, ECOR71 y/o ECOR72. BP1168 comprende un genoma que comprende una secuencia tal y como se presenta en la SEQ ID n.º 11 o que tiene una identidad de al menos el 97 %, 98 % o 99 % con la SEQ ID n.º 11. También se describe una secuencia de ácido nucleico aislado del bacteriófago BP1168, o variante del mismo. El bacteriófago BP1168 también se caracteriza por un ELP por debajo de 15, más preferiblemente por debajo de 10 y aún más preferiblemente de aproximadamente 0,8.

En otro aspecto, la invención describe el bacteriófago BP1176, o cualquier variante del mismo. El bacteriófago BP1176, o cualquier variante del mismo, se puede producir o expandir en, p. ej., la cepa de *E. coli* ECOR60. BP1176, o cualquier variante del mismo, es específico de, y tiene actividad lítica contra, las cepas K12/DH5, ECOR2, ECOR4, ECOR13, ECOR15, ECOR24, ECOR28, ECOR35, ECOR55, ECOR56, ECOR59 y/o ECOR60. BP1176 comprende un genoma que comprende una secuencia tal y como se presenta en la SEQ ID n.º 12 o que tiene una identidad de al menos el 97 %, 98 % o 99 % con la SEQ ID n.º 12. También se describe una secuencia de ácido nucleico aislado del bacteriófago BP1176, o variante del mismo. El bacteriófago BP1176 también se caracteriza por un ELP por debajo de 15, más preferiblemente por debajo de 10 y aún más preferiblemente de aproximadamente 4.

Aún en otro aspecto, la invención describe el bacteriófago BP1197, o cualquier variante del mismo. El bacteriófago BP1197, o cualquier variante del mismo, se puede producir o expandir en, p. ej., la cepa de *E. coli* K12/DH5. BP1197, o cualquier variante del mismo, es específico de, y tiene actividad lítica contra, las cepas K12/DH5, ECOR2, ECOR13, ECOR15, ECOR28, ECOR46, ECOR48, ECOR50, ECOR54, ECOR59, ECOR60, ECOR71 y/o ECOR72. BP1197 comprende un genoma que comprende una secuencia tal y como se presenta en la SEQ ID n.º 13 o que tiene una identidad de al menos el 97 %, 98 % o 99 % con la SEQ ID n.º 13. También se describe una secuencia de ácido

nucleico aislado del bacteriófago BP1197, o variante del mismo. El bacteriófago BP1197 también se caracteriza por un ELP por debajo de 15, más preferiblemente por debajo de 10 y aún más preferiblemente de aproximadamente 1.

5 En un aspecto, la invención describe el bacteriófago BP1226, o cualquier variante del mismo. El bacteriófago BP1226, o cualquier variante del mismo, se puede producir o expandir en, p. ej., la cepa de *E. coli* ECOR59. BP1226, o cualquier variante del mismo, es específico de, y tiene actividad lítica contra, las cepas K12/DH5, ECOR2, ECOR13, ECOR28, ECOR48, ECOR59, ECOR60 y/o ECOR72. BP1226 comprende un genoma que comprende una secuencia tal y como se presenta en la SEQ ID n.º 14 o que tiene una identidad de al menos el 97 %, 98 % o 99 % con la SEQ ID n.º 14. También se describe una secuencia de ácido nucleico aislado del bacteriófago BP1226, o variante del mismo. El bacteriófago BP1226 también se caracteriza por un ELP por debajo de 15, más preferiblemente por debajo de 10 y aún más preferiblemente de aproximadamente 5.

10 En otra realización en concreto, la invención describe el bacteriófago BP1229, o cualquier variante del mismo. El bacteriófago BP1229, o cualquier variante del mismo, se puede producir o expandir en, p. ej., la cepa de *E. coli* K12/DH5. BP1229, o cualquier variante del mismo, es específico y tiene actividad lítica contra las cepas K12/DH5, ECOR2, ECOR13, ECOR15, ECOR28, ECOR46, ECOR48, ECOR50, ECOR54, ECOR55, ECOR59 y/o ECOR72. BP1229 comprende un genoma que comprende una secuencia tal y como se presenta en la SEQ ID n.º 15 o que tiene una identidad de al menos el 97 %, 98 % o 99 % con la SEQ ID n.º 15. También se describe una secuencia de ácido nucleico aislado del bacteriófago BP1229, o variante del mismo. El bacteriófago BP1229 también se caracteriza por un ELP por debajo de 15, más preferiblemente por debajo de 10 y aún más preferiblemente de aproximadamente 6.

Ácidos nucleicos y polipéptidos

20 La invención también pertenece a un ácido nucleico aislado que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID n.º 9. La descripción también da a conocer un ácido nucleico contenido en un bacteriófago de la invención, o cualquier fragmento de tal ácido nucleico. El término fragmento designa, más preferiblemente, un fragmento que contiene (o que consiste en) un marco abierto de lectura. El ácido nucleico puede ser ADN o ARN, monocatenario o bicatenario.

25 El ácido nucleico se puede aislar a partir de los bacteriófagos depositados o producirse mediante el uso de la tecnología de ADN recombinante (p. ej., amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), clonación), síntesis enzimática o química, o combinaciones de las mismas, según las técnicas generales conocidas por sí mismas en la materia. También se incluyen las secuencias homólogas y fragmentos de las mismas que incluyen, pero sin limitarse a ellas, variantes alélicas naturales y secuencias de ácido nucleico modificadas en las cuales se han insertado, delecionado, sustituido y/o invertido algunos nucleótidos.

30 En una realización en concreto, la invención se refiere a un ácido nucleico que comprende la secuencia de SEQ ID n.º 9.

En una realización en concreto, la invención se refiere a un ácido nucleico que tiene o consiste en la secuencia de la SEQ ID n.º 9.

El ácido nucleico de la invención puede estar en forma libre o clonado en un vector.

35 Composiciones de la invención:

Un aspecto de la invención se refiere a las composiciones como las citadas en las reivindicaciones y que comprenden al menos un bacteriófago tal y como está descrito más arriba, más preferiblemente al menos 2 o más y, optativamente, un excipiente farmacéutica o veterinariamente aceptable. Tal y como está descrito, los bacteriófagos de la invención tienen una actividad lítica muy potente contra las cepas de *E. coli*. Se pueden producir combinaciones de estos bacteriófagos para expandir el espectro de hospedadores y producir composiciones antibacterianas muy eficaces.

40 Más en concreto, la invención se refiere a una composición antibacteriana que comprende al menos dos bacteriófagos que tienen actividad lítica contra una cepa de *E. coli*, en donde uno de dichos bacteriófagos tiene un genoma que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID n.º 9 o una secuencia que tiene una identidad de al menos el 97 % con ella, y en donde uno de dichos al menos dos bacteriófagos que se seleccionan entre los bacteriófagos tiene un genoma que comprende una secuencia de nucleótidos de cualquiera de las SEQ ID n.ºs 1 a 8 y 10 a 15, o una secuencia que tiene una identidad de al menos el 97 % con ella, preferiblemente una identidad de al menos el 98 % o 99 % con ella.

45 En una realización preferida, las composiciones de la invención son tal y como se enumera en las reivindicaciones y comprenden al menos tres, incluso más preferiblemente al menos cuatro, bacteriófagos diferentes, tal y como está definido más arriba. Las composiciones de la invención son como tal y como se enumera en las reivindicaciones y pueden comprender al menos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 11, 12, 13, 14, o los 15 bacteriófagos diferentes que se describen más arriba.

Un aspecto de la descripción es una composición que comprende al menos un bacteriófago seleccionado de BP539, BP700, BP753, BP814, BP953, BP954, BP970, BP1002, BP1151, BP1155, BP1168, BP1176, BP1197, BP1226 y/o

BP1229, y las variantes de los mismos.

Una descripción más de la invención es una composición que se recoge en las reivindicaciones y que comprende al menos dos bacteriófagos distintos seleccionados de BP539, BP700, BP753, BP814, BP953, BP954, BP970, BP1002, BP1151, BP1155, BP1168, BP1176, BP1197, BP1226 y/o BP1229, y las variantes de los mismos.

5 Preferiblemente, una composición de la invención es tal y como se recoge en las reivindicaciones y comprende al menos tres bacteriófagos distintos, más preferiblemente al menos cuatro bacteriófagos distintos, aún más preferiblemente al menos cinco bacteriófagos distintos, aún más preferiblemente al menos seis bacteriófagos distintos, más preferiblemente al menos siete bacteriófagos distintos, aún más preferiblemente al menos ocho bacteriófagos distintos, aún más preferiblemente al menos nueve bacteriófagos distintos y aún más preferiblemente al menos diez
10 bacteriófagos diferentes, seleccionados de BP539, BP700, BP753, BP814, BP953, BP954, BP970, BP1002, BP1151, BP1155, BP1168, BP1176, BP1197, BP1226 y/o BP1229, y las variantes de los mismos.

En una realización en concreto, una composición de la invención comprende BP539 en combinación con al menos BP1151.

15 En otra realización en concreto, una composición de la invención comprende BP1002 en combinación con al menos BP1151.

En otra realización preferida, la composición comprende BP1151 en combinación con al menos otro bacteriófago más seleccionado de BP1176, BP953, BP970, BP700 y BP1002.

20 La descripción también describe una composición que comprende una combinación de bacteriófagos BP953 + BP1168. Tal composición podría destruir el 100 % de las cepas de *E. coli* hemorrágicas analizadas y aproximadamente el 70 % de las 25 bacterias de *E. coli* de la tabla 2 (véase el ejemplo 3.1).

La descripción también describe una composición que comprende una combinación de bacteriófagos BP953 + BP1168 + BP1229. Tal composición puede destruir las bacterias de *E. coli* de tipo O157, O144 y O104, que incluyen cepas hemorrágicas (véase el ejemplo 3.2).

25 La invención también se refiere a una composición que comprende una combinación de los bacteriófagos BP953 + BP1151 + BP1155 + BP1176. Tal composición podría destruir el 80 % de las bacterias de *E. coli* analizadas que se han aislado de hospitales (véase el ejemplo 3.3).

30 La descripción también describe una composición que comprende una combinación de los bacteriófagos BP700 + BP953 + BP970 + BP1002 + BP1176. Tal composición podría destruir el 100 % de las bacterias de *E. coli* de tipo ST131 analizadas, al menos el 80 % de las bacterias de *E. coli* de tipo BLAE analizadas y al menos el 93 % de las bacterias de *E. coli* de tipo BMR analizadas (véase el ejemplo 3.4).

La invención también se refiere a una composición que comprende una combinación de los bacteriófagos BP1002 + BP1151 + BP1155 + BP1168 + BP1176. Tal composición puede destruir el 100 % de las bacterias de *E. coli* que provocan la meningitis que se han analizado (véase el ejemplo 3.5).

35 La invención también se refiere a una composición que comprende una combinación de los bacteriófagos BP539 + BP700 + BP753 + BP814 + BP1151 + BP1176 + BP1168. Tal composición podría destruir cerca del 96 % de las 24 bacterias de *E. coli* de la colección de ECOR de la tabla 2 (véase el ejemplo 3.6).

40 La invención también se refiere a una composición que comprende una politerapia de todos los bacteriófagos BP539, BP700, BP753, BP814, BP953, BP954, BP970, BP1002, BP1151, BP1155, BP1168, BP1176, BP1197, BP1226 y/o BP1229, o variantes de los mismos. Tal composición podría destruir el 100 % de las 25 bacterias de *E. coli* de la tabla 2 (véase el ejemplo 3.7).

Los ejemplos específicos de las composiciones de la invención comprenden:

- 45 - un bacteriófago que tiene un genoma que comprende una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID n.º 5 o una secuencia que tiene una identidad de al menos el 97 % con ella, y un bacteriófago que tiene un genoma que comprende una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID n.º 9 o una secuencia que tiene una identidad de al menos el 97 % con ella, y un bacteriófago que tiene un genoma que comprende una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID n.º 10 o una secuencia que tiene una identidad de al menos el 97 % con ella, y un bacteriófago que tiene un genoma que comprende una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID n.º 12 o una secuencia que tiene una identidad de al menos el 97 % con ella;
- 50 - un bacteriófago que tiene un genoma que comprende una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID n.º 8 o una secuencia que tiene una identidad de al menos el 97 % con ella, y un bacteriófago que tiene un genoma que comprende una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID n.º 9 o una secuencia que tiene una identidad de al menos el 97 % con ella, y un bacteriófago que tiene un genoma que comprende una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID n.º 10 o una secuencia que tiene una identidad de al menos el 97 % con ella, y un bacteriófago que tiene un genoma que comprende una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID n.º 11 o una secuencia que

tiene una identidad de al menos el 97 % con ella, y un bacteriófago que tiene un genoma que comprende una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID n.º 12 o una secuencia que tiene una identidad de al menos el 97 % con ella; o

- 5 - un bacteriófago que tiene un genoma que comprende una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID n.º 1 o una secuencia que tiene una identidad de al menos el 97 % con ella, y un bacteriófago que tiene un genoma que comprende una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID n.º 2 o una secuencia que tiene una identidad de al menos el 97 % con ella, y un bacteriófago que tiene un genoma que comprende una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID n.º 3 o una secuencia que tiene una identidad de al menos el 97 % con ella, y un bacteriófago que tiene un genoma que comprende una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID n.º 4 o una secuencia que
- 10 tiene una identidad de al menos el 97 % con ella, y un bacteriófago que tiene un genoma que comprende una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID n.º 9 o una secuencia que tiene una identidad de al menos el 97 % con ella, y un bacteriófago que tiene un genoma que comprende una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID n.º 12 o una secuencia que tiene una identidad de al menos el 97 % con ella, y un bacteriófago que tiene un genoma que comprende una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID n.º 11 o una secuencia que tiene una
- 15 identidad de al menos el 97 % con ella.

Una realización específica de la invención se refiere a una composición que comprende:

- un bacteriófago que tiene un genoma que comprende una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID n.º 1 o una secuencia que tiene una identidad de al menos el 97 % con ella;
- 20 - un bacteriófago que tiene un genoma que comprende una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID n.º 2 o una secuencia que tiene una identidad de al menos el 97 % con ella;
- un bacteriófago que tiene un genoma que comprende una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID n.º 3 o una secuencia que tiene una identidad de al menos el 97 % con ella;
- un bacteriófago que tiene un genoma que comprende una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID n.º 4 o una secuencia que tiene una identidad de al menos el 97 % con ella;
- 25 - un bacteriófago que tiene un genoma que comprende una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID n.º 5 o una secuencia que tiene una identidad de al menos el 97 % con ella;
- un bacteriófago que tiene un genoma que comprende una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID n.º 6 o una secuencia que tiene una identidad de al menos el 97 % con ella;
- 30 - un bacteriófago que tiene un genoma que comprende una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID n.º 7 o una secuencia que tiene una identidad de al menos el 97 % con ella;
- un bacteriófago que tiene un genoma que comprende una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID n.º 8 o una secuencia que tiene una identidad de al menos el 97 % con ella;
- un bacteriófago que tiene un genoma que comprende una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID n.º 9 o una secuencia que tiene una identidad de al menos el 97 % con ella;
- 35 - un bacteriófago que tiene un genoma que comprende una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID n.º 10 o una secuencia que tiene una identidad de al menos el 97 % con ella;
- un bacteriófago que tiene un genoma que comprende una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID n.º 11 o una secuencia que tiene una identidad de al menos el 97 % con ella;
- 40 - un bacteriófago que tiene un genoma que comprende una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID n.º 12 o una secuencia que tiene una identidad de al menos el 97 % con ella;
- un bacteriófago que tiene un genoma que comprende una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID n.º 13 o una secuencia que tiene una identidad de al menos el 97 % con ella;
- un bacteriófago que tiene un genoma que comprende una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID n.º 14 o una secuencia que tiene una identidad de al menos el 97 % con ella; y
- 45 - un bacteriófago que tiene un genoma que comprende una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID n.º 15 o una secuencia que tiene una identidad de al menos el 97 % con ella.

Las composiciones de la invención ejercen su actividad lítica contra las bacterias patógenas de *E. coli*. Las composiciones de la invención pueden además comprender agentes antibacterianos adicionales, en concreto otros bacteriófagos que tienen una especificidad de hospedador distinta.

- 50 Las composiciones preferidas de la invención son líticas contra las cepas de *E. coli* resistentes a los antibióticos.

Otras composiciones preferidas de la invención son líticas contra más del 90 % de las cepas bacterianas de la colección ECOR, una colección de referencia de cepas de *E. coli* encontradas en la naturaleza.

Las composiciones antibacterianas de la invención pueden estar en diferentes formas, tales como formulaciones líquidas, semilíquidas, sólidas o liofilizadas.

- 55 Se desea en un aspecto de la invención que la composición comprenda entre 10^{e2} y $10^{e12 \text{ ufp}}$ de al menos un bacteriófago de la invención, preferiblemente entre 10^{e5} y $10^{e10 \text{ ufp}}$. Cuando la composición antibacteriana comprende varios bacteriófagos tal y como está definido más arriba, se prefiere que la composición comprenda entre 10^{e2} y $10^{e12 \text{ ufp}}$ de cada bacteriófago presente de la invención.

Las composiciones de la invención pueden comprender cualquier cantidad eficaz de uno o varios de los bacteriófagos seleccionados. Preferiblemente, comprenden entre 10^{e2} y 10^{e12} ufp de cada uno de dichos bacteriófagos, preferiblemente entre 10^{e5} y 10^{e10} ufp. Las cantidades relativas de cada uno de los tipos de bacteriófagos en una composición de la invención las puede ajustar el experto en la técnica. Típicamente, cuando la composición antibacteriana comprende varios (n) bacteriófagos diferentes, tal y como se definió más arriba, la cantidad relativa total %A de cada bacteriófago en la composición es más preferiblemente $\%A = (100/n_i) \times V$, en donde n_i representa el número de tipos distintos de bacteriófagos y V es un factor de la variabilidad comprendido entre 0,2 y 5. Más preferiblemente, V está comprendido entre 0,3 y 3, incluso más preferiblemente entre 0,5 y 2, por lo general entre 0,8 y 1,5. En una realización típica, cuando la composición antibacteriana comprende varios bacteriófagos, tal y como está definido más arriba, se prefiere que la composición comprenda entre 10^{e2} y 10^{e12} ufp de cada uno de los bacteriófagos presentes de la invención. Preferiblemente, cada tipo de bacteriófago está presente en una composición de la invención en cantidades relativas aproximadamente iguales.

Las composiciones de la invención comprenden preferiblemente un diluyente o vehículo idóneo, tal como un excipiente o vehículo farmacéutica o veterinariamente aceptable. Las composiciones de acuerdo con la presente invención pueden incluir cualquier excipiente o vehículo, tal como espesantes, diluyentes, tamponantes, conservantes, tensioactivos y similares, además de uno o varios bacteriófagos de elección. Tales incluyen soluciones o vehículos fisiológicamente aceptables que son inocuos o no provocan ninguna reacción inmunitaria específica ni inespecífica significativa en un organismo o no destruye la actividad biológica del bacteriófago. Para la formulación líquida, se pueden utilizar solución salina, agua estéril, solución de Ringer, solución fisiológica tamponada, solución para infusión con albúmina, solución con dextrosa, solución con maltodextrina, glicerol, etanol y mezclas de los mismos, como un excipiente o vehículo farmacéutica o veterinariamente aceptable. Si fuera apropiado, se le pueden añadir otros aditivos convencionales, tales como espesantes, diluyentes, tamponantes, conservantes, tensioactivos, antioxidantes y bacteriostáticos. Además, se le pueden añadir adicionalmente a la composición diluyentes, disgregantes, surfactantes, aglutinantes y lubricantes con el objeto de preparar formulaciones inyectables, tales como soluciones acuosas, suspensiones y emulsiones, formulaciones orales, tales como píldoras, cápsulas, gránulos o comprimidos, o formulaciones en polvo. Las formulaciones para la administración tópica pueden incluir tiritas, vendajes, parches, películas, ungüentos, lociones, cremas, geles, gotas, supositorios, pulverizadores, nebulizadores, tampones, toallas higiénicas, líquidos y polvos. Las formulaciones para la descontaminación o para el uso médico pueden también incluir aerosoles o pulverizadores.

Las composiciones de la invención se pueden utilizar en el campo médico, que incluye las áreas médicas humanas o veterinarias, para, p. ej., el tratamiento de una infección en un mamífero o para mejorar una afección de un sujeto.

Las composiciones se pueden utilizar para destruir las bacterias de *E. coli* en un organismo, para tratar una infección. La composición también se puede utilizar para mejorar la afección de un mamífero mediante la modificación de la flora microbiana en dicho mamífero. En concreto, las composiciones de la invención pueden, de manera específica, retirar las cepas de *E. coli* de la piel o de las membranas de mucosa de un mamífero, con lo que se modifica su flora microbiana y se restaura un equilibrio adecuado.

En un aspecto en concreto, la descripción da a conocer un método para el tratamiento de una infección en un mamífero que comprende administrar a dicho animal una composición o bacteriófago o ácido nucleico o polipéptido, tal y como se define más arriba.

En un aspecto en concreto, el método comprende administrar al menos uno, preferiblemente al menos dos, incluso más preferiblemente al menos tres, bacteriófagos seleccionados de BP539, BP700, BP753, BP814, BP953, BP954, BP970, BP1002, BP1151, BP1155, BP1168, BP1176, BP1197, BP1226 y/o BP1229, o variantes de los mismos.

La invención también se refiere al uso de una composición, bacteriófago o ácido nucleico, tal y como está descrito, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una infección en un mamífero, o para la restauración de la flora microbiana en dicho mamífero.

Las composiciones o agentes de la invención se pueden administrar mediante cualquier vía adecuada, entre ellas intravenosa, oral, transdérmica, subcutánea, mucosa, intramuscular, intrapulmonar, intranasal, parenteral, rectal, vaginal y tópica. En una realización preferida, los bacteriófagos o composiciones son para la administración por la vía tópica, p. ej., mediante la aplicación sobre la piel de un sujeto. Las composiciones se pueden administrar de manera directa o indirecta, p. ej., a través de un soporte. En este sentido, las composiciones pueden, por ejemplo, aplicarse o pulverizarse sobre el área afectada. Las composiciones de la invención también se pueden administrar por las vías oral o parental. La dosis idóneas para la aplicación, pulverización o administración de las composiciones de la presente invención las puede ajustar el experto en la técnica en función de una serie de factores, que incluyen la formulación, el modo de administración, la edad, el peso, el sexo, la afección, la dieta del mamífero a tratar en el momento de la administración, la vía de administración y la sensibilidad reactiva. Un médico con las habilidades habituales en la materia puede determinar con facilidad y recetar la cantidad eficaz de la composición necesaria.

La dosificación también la puede ajustar el experto en la técnica para que se obtenga una actividad lítica contra las cepas de *E. coli* resistentes a los antibióticos. Una dosis eficaz para obtener una actividad lítica *in vivo* incluye

típicamente una concentración de al menos 10^{e2} ufp/ml, preferiblemente de aproximadamente 10^{e2} a 10^{e12} ufp/ml, en función de la vía de administración. La administración se puede realizar solo una vez o, si es necesario, repetirse.

Las composiciones de la invención se pueden administrar para tratar infecciones de *E. coli*, típicamente vías respiratorias, vías urinarias, quemaduras, heridas, oído, piel y partes blandas, infecciones digestivas o posquirúrgicas.

5 Tal y como se muestra en el apartado experimental, los bacteriófagos y las composiciones de la invención tienen la capacidad de destruir selectivamente las bacterias de *E. coli in vitro* o *in vivo*. Las composiciones pueden destruir mezclas de diferentes bacterias de *E. coli*, incluso *in vivo*, incluso a una dosis baja. Además, las composiciones de la invención son eficaces a la hora de destruir las bacterias incluidas en las biopelículas, lo cual es particularmente importante para las bacterias patógenas. De igual modo, las composiciones y los bacteriófagos de la invención son estrictamente incapaces de afectar a las células de los mamíferos y, por lo tanto, son específicos y están desprovistos de efectos secundarios *in vivo*.

10 La invención también se refiere al uso de una composición, bacteriófago o ácido nucleico de la invención para descontaminar un material. Debido a su potente efecto antibacteriano y a su capacidad para comprometer incluso la integridad de una biopelícula bacteriana, las composiciones de la invención se pueden utilizar como un descontaminante para eliminar, o al menos provocar una reducción, de la cantidad de bacterias sobre un material. Tales métodos se pueden aplicar para el tratamiento de una serie de superficies biológicas o no biológicas en contextos médicos y no médicos, que incluyen materiales sólidos o dispositivos, tales como, por ejemplo, lentes de contacto, superficie de dispositivos que se van a implantar en el cuerpo, tubos, conductos, recipientes de laboratorio, telas, etc.

Pruebas diagnósticas/predictivas de la invención

20 La invención también se refiere a un método para predecir o determinar la eficacia de un tratamiento con bacteriófagos en un sujeto, en donde el método es tal y como está definido en las reivindicaciones. En un aspecto preferido, el método comprende, además, de manera optativa, una etapa de tratamiento de dicho sujeto con dichos bacteriófagos que tienen actividad lítica contra una cepa de *E. coli* de una muestra de dicho sujeto.

25 En otro aspecto, la invención da a conocer un método para seleccionar un sujeto o para determinar si un sujeto podría obtener beneficio de un tratamiento con bacteriófagos, en donde el método es tal y como está definido en las reivindicaciones.

30 Otro objeto de la invención describe un método para predecir la respuesta de un sujeto a un tratamiento con bacteriófagos, en donde el método comprende la etapa de determinar una actividad lítica de uno o varios bacteriófagos seleccionados de BP539, BP700, BP753, BP814, BP953, BP954, BP970, BP1002, BP1151, BP1155, BP1168, BP1176, BP1197, BP1226 y/o BP1229 contra una cepa de *E. coli* obtenida de una muestra de dicho sujeto, en donde una actividad lítica de uno o varios bacteriófagos de la invención contra al menos una cepa de *E. coli* es indicativa de una buena respuesta a dicho tratamiento.

Se describirán más aspectos y ventajas de la invención en el siguiente apartado experimental, que solo tiene propósitos ilustrativos.

35 Ejemplos

Materiales y métodos

Aislamiento y preparación de los fagos

40 Las bacterias de *E. coli* BMR se utilizaron para aislar y enriquecer cada bacteriófago virulento a partir de agua medioambiental. Se mezclaron las muestras medioambientales y el cultivo de las bacterias durante una noche en el medio Luria Bertani (LB) y se incubaron a 37 °C durante 24 h con agitación para enriquecer los bacteriófagos específicos. Al final de la incubación, al cultivo se le añadieron unas gotas de cloroformo. El cultivo se centrifugó a 11 000g durante 5 min para retirar las células bacterianas y sus residuos. El sobrenadante se pasó a través de un filtro de 0,2 µm para retirar las células bacterianas residuales. La solución de fagos enriquecida se sembró en el medio de LB con agar que lleva incluido la *E. coli*. Se formaron calvas sobre las placas al cabo de la incubación de 24 h a 37 °C.

45 Se picó una única calva para la posterior purificación y amplificación del fago. A continuación, el fago se conservó a 4 °C en una suspensión en el medio LB o en la solución salina fisiológica.

El título del fago en una suspensión se estimó mediante el recuento de las calvas (Postic, 1961). Se dispusieron diluciones 1/10 de una suspensión sobre un césped seco de la cepa de propagación. Las placas se leyeron después de la incubación durante una noche. El método de recuento de calvas también permitió visualizar la forma de las calvas.

Determinación del abanico de hospedadores

El abanico de hospedadores de los bacteriófagos se determinó en una colección de 26 *E. coli* de la colección ECOR. Se mezclaron 10^9 células bacterianas con agar fundido y esta mezcla se vertió sobre agar sólido para hacer placas

de agar con dos capas. Después de la solidificación, en cada placa con diferente cepa bacteriana se depositaron puntos con las soluciones de reserva de los bacteriófagos aislados. Después de dejar 20 min para que se absorbiera lo depositado en cada punto, las placas se invirtieron e incubaron durante 24 h a 37 °C antes de anotar el grado de la lisis.

5 Microscopia electrónica

Se tomaron imágenes al microscopio electrónico de cada fago con un microscopio electrónico de transmisión.

Secuenciación, análisis y anotación del genoma de los fagos

10 Para aislar el ADN fágico, los fagos se propagaron tal y como está descrito más arriba. El ADN de los fagos se aisló mediante extracción con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1, V/V), precipitación con etanol y resolución en agua. Se secuenció el genoma entero y se utilizó el algoritmo BLAST para determinar la similitud con los genes descritos en la base de datos del Centro Estadounidense para la Información Biotecnológica (NCBI, por su nombre en inglés). En los genomas se detectaron todos los posibles marcos abiertos de lectura (ORF, por su nombre en inglés).

Ejemplo 1: Características y cinética de bacteriófago-hospedador

15 Se llevaron a cabo experimentos de crecimiento en una etapa de acuerdo con las descripciones anteriores para determinar primero el tiempo lítico productivo, la tasa de adsorción, y a continuación la magnitud del brote de fagos. Para determinar la tasa de adsorción, se tomaron muestras a diferentes intervalos de tiempo para analizar las partículas de fago libres en cada solución. Para determinar el tiempo productivo y la magnitud del brote de fagos, las bacterias de *E. coli* se mezclaron con las soluciones de fagos y los fagos se dejaron adsorber durante 15 min. La mezcla se centrifugó inmediatamente a 5 000 rpm durante 10 min para retirar las partículas de fago libres. El sedimento se resuspendió en 5 medios de LB fresco y el cultivo se incubó continuamente a 37 °C. Se tomaron
20 muestras a intervalos de 3 min y se determinó el título de los fagos. Estos resultados permitieron calcular el número de fagos producidos por bacteria (magnitud del brote), el tiempo productivo y el efecto lítico productivo (ELP), tal y como se muestra en la tabla 3 que viene a continuación.

Tabla 3

| Fago | Tiempo lítico productivo (min) | Tasa de adsorción (ml ⁻¹ min ⁻¹) | MAGNITUD DEL BROTE (ufp por bacteria) | ELP (ufp por bacteria por min) |
|------|--------------------------------|---|---------------------------------------|--------------------------------|
| 539 | 70 | 9,83E-09 | 9 | 0,13 |
| 700 | 15 | 1,04E-08 | 32 | 2,13 |
| 753 | 60 | 3,00E-08 | 119 | 1,98 |
| 814 | 30 | 2,30E-08 | 9 | 0,30 |
| 953 | 20 | 2,05E-08 | 66 | 3,30 |
| 954 | 20 | 2,01E-08 | 66 | 3,30 |
| 970 | 10 | 2,24E-08 | 46 | 4,60 |
| 1002 | 10 | 8,40E-09 | 49 | 4,90 |
| 1151 | 10 | 2,10E-08 | 99 | 9,90 |
| 1155 | 15 | 1,21E-08 | 7 | 0,47 |
| 1168 | 10 | 8,70E-09 | 8 | 0,80 |
| 1176 | 60 | 1,56E-08 | 232 | 3,87 |
| 1197 | 45 | 6,60E-09 | 49 | 1,09 |
| 1226 | 30 | 8,87E-09 | 149 | 4,97 |
| 1229 | 55 | 6,55E-09 | 332 | 6,04 |

25 Estos resultados demuestran que todos los fagos tienen una capacidad de producción de virus y tasa de adsorción enormes. La mayoría de fagos tiene un ELP por debajo de 5, lo que demuestra un perfil notable. El fago 539 es particularmente eficaz en este sentido. Además, los diferentes ELP y tiempos de adsorción permiten crear cócteles con una variabilidad seleccionada.

30 Ejemplo 2: Preparación de una composición en cóctel

Se constituyeron las siguientes composiciones en cóctel, en donde cada una comprende entre 10⁻⁹ y 10⁻¹¹ ufp de cada bacteriófago:

Tabla 4

| Cóctel | Fagos |
|--------|--|
| I | BP953 + BP1168 |
| II | BP953 + BP1168 + BP1229 |
| III | BP953 + BP1151 + BP1155 + BP1176 |
| IV | BP700 + BP953 + BP970 + BP1002 + BP1176 |
| V | BP1002 + BP1151 + BP1155 + BP1168 + BP1176 |
| VI | BP539 + BP700 + BP753 + BP814 + BP1151 + BP1176 + BP1168 |

Se constituyeron los siguientes dos cócteles más de composiciones que comprenden todos los diferentes fagos, que cubren la diversidad más importante de especies de *E. coli*.

Tabla 5A: Cóctel de la composición A:

| | | | | | | | | |
|--------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| Fago | BP539 | BP 700 | BP 753 | BP 814 | BP 953 | BP 954 | BP970 | BP1002 |
| Título | 2,72 ^{E+09} | 8,00 ^{E+09} | 2,27 ^{E+08} | 5,89 ^{E+07} | 4,53 ^{E+10} | 3,00 ^{E+08} | 4,02 ^{E+08} | 9,73 ^{E+08} |
| Fago | BP1151 | BP1155 | BP1168 | BP1176 | BP1197 | BP1226 | B1229 | |
| Título | 1,56 ^{E+09} | 3,00 ^{E+10} | 7,77 ^{E+09} | 1,00 ^{E+10} | 3,91 ^{E+09} | 4,44 ^{E+06} | 9,11 ^{E+09} | |

5

Tabla 5B: Cóctel de la composición B:

| | | | | | | | | |
|--------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| Fago | BP539 | BP 700 | BP 753 | BP 814 | BP 953 | BP 954 | BP970 | BP1002 |
| Título | 8,85 ^{E+08} | 1,89 ^{E+08} | 7,26 ^{E+07} | 3,04 ^{E+08} | 9,47 ^{E+08} | 3,89 ^{E+08} | 9,56 ^{E+07} | 2,09 ^{E+09} |
| Fago | BP1151 | BP1155 | BP1168 | BP1176 | BP1197 | BP1226 | B1229 | |
| Título | 7,35 ^{E+08} | 2,57 ^{E+09} | 3,01 ^{E+09} | 1,77 ^{E+09} | 1,03 ^{E+10} | 2,00 ^{E+09} | 1,56 ^{E+09} | |

Ejemplo 3: Sensibilidad de las bacterias a los cócteles de bacteriófagos de la invención

10 Las diferentes cepas de bacterias se ensayaron un con cóctel de bacteriófagos de la invención a 2×10^9 bacteriófagos/ml. Las diferentes concentraciones bacterianas se sembraron en placa sobre el cóctel de bacteriófagos a 2×10^9 bacteriófagos/ml y se incubaron 24 h a 37 °C.

15 Los cócteles se analizaron en las diferentes bacterias de *E. coli* recogidas en la tabla 2, así como en otras bacterias de *E. coli*, entre ellas las bacterias que causan la meningitis de tipo bacteriano de *E. coli* de la colección de R. Debré (37 cepas), BLAE (5 cepas) y ST131 (9 cepas), bacterias de *E. coli* obtenidas de pacientes hospitalizados (35 cepas) y bacterias de *E. coli* hemorrágicas del tipo O157, O144 y O104 (3 cepas). El porcentaje de las especies de bacterias sensibles a los cócteles se recoge en la tabla 6 que viene a continuación:

Ejemplo 3.1: Eficacia del cóctel I

Tal y como se muestra en la siguiente tabla 6 que viene a continuación, el cóctel I es capaz de destruir el 100 % de las bacterias de *E. coli* hemorrágicas analizadas.

20 Tabla 6

| | BP953 | BP1168 | Cóctel I |
|----------|-------|--------|----------|
| O157:133 | | + | + |
| O144:227 | | + | + |
| O104:H4 | + | | + |

Además, el cóctel I también puede destruir aproximadamente el 70 % de las 25 cepas bacterianas de *E. coli* de la tabla 2.

Ejemplo 3.2: Eficacia del cóctel II

25 Tal y como se muestra en la siguiente tabla 7, el cóctel II es capaz de destruir el 100 % de las bacterias de *E. coli* hemorrágicas analizadas.

Tabla 7

| | BP953 | BP1168 | BP1229 | Cóctel II |
|----------|-------|--------|--------|-----------|
| O157:133 | | + | + | + |
| O144:227 | | + | + | + |
| O104:H4 | + | | | + |

Además, el cóctel II también es capaz de destruir el 76 % de las 25 cepas bacterianas de *E. coli* de la tabla 2.

Ejemplo 3.3: Eficacia del cóctel III

5 Tal y como se muestra en la siguiente tabla 8, el cóctel III es capaz de destruir al menos el 80 % de las cepas analizadas de *E. coli* que se aislaron de pacientes hospitalizados.

Tabla 8

| | BP953 | BP1151 | B1155 | BP1176 | Cóctel III |
|-------|-------|--------|-------|--------|------------|
| NDM-1 | | | | + | + |
| SH1 | + | | | + | + |
| SH4 | | + | | | + |
| SH5 | | + | | + | + |
| SH7 | | + | | +/- | + |
| SH9 | | + | | + | + |
| SH11 | | | | | |
| SH12 | | | | + | + |
| SH25 | | | | | |
| SH76 | | + | + | | + |
| SH78 | + | | | | + |
| SH79 | | | | | |
| SH80 | | | | | |
| SH81 | +/- | | | | + |
| SH84 | | +/- | +/- | | + |
| SH86 | | | + | | + |
| SH87 | | + | + | | + |
| SH88 | | +/- | | + | + |
| SH90 | | + | +/- | + | + |
| SH92 | | | | + | + |
| SH95 | | +/- | | | + |
| SH96 | | + | | | + |
| SH100 | + | + | | +/- | + |
| SH102 | + | + | | + | + |
| SH103 | + | | | +/- | + |
| SH104 | | | | + | + |
| SH105 | | + | | + | + |
| SH107 | | | | | |
| SH112 | | | | + | + |
| SH113 | | + | | + | + |
| SH117 | | +/- | | + | + |
| SH118 | | | + | | + |
| SH119 | | | | | |
| SH120 | + | | | + | + |
| SH123 | | | | | |

Ejemplo 3.4: Eficacia del cóctel IV

Tal y como se muestra en la siguiente tabla 9, el cóctel IV es capaz de destruir las cepas de *E. coli* de tipo ST131 y

BLAE.

Tabla 9

| | BP700 | BP953 | BP970 | BP1002 | BP1176 | Cóctel IV |
|---------------|-------|-------|-------|--------|--------|-----------|
| ST131 TN03 | + | + | + | + | + | + |
| ST131 RD20873 | | | +/- | | + | + |
| ST131 RD 5530 | + | + | +/- | +/- | + | + |
| ST131 XXF | | | +/- | +/- | + | + |
| ST131 XXT | + | + | +/- | + | + | + |
| ST131 6601 | + | + | | + | + | + |
| ST131 27144 | | | | + | + | + |
| ST131 28678 | | | | +/- | + | + |
| ST131 30151 | + | + | +/- | | + | + |
| | | | | | | |
| BSE3 | + | | | + | | + |
| BSE4 | | | | + | +/- | + |
| BSE7 | | | + | | | + |
| BSE9 | +/- | + | +/- | | + | + |
| BSE12 | | | | | | |

Ejemplo 3.5: Eficacia del cóctel V

- 5 Tal y como se muestra en la siguiente tabla 10, el cóctel V fue capaz de destruir el 100 % de las bacterias de *E. coli* que causan la meningitis de la colección de R. Debré.

Tabla 10

| | BP1002 | BP1151 | BP1155 | BP1168 | BP1176 | BP1197 | Cóctel V |
|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|----------|
| CFT073 | +/- | + | | | | | + |
| J96 | +/- | +/- | | | + | | + |
| 536 | + | + | +/- | + | | + | + |
| S5 | + | + | + | + | | + | + |
| S11 | + | + | + | + | | + | + |
| S12 | + | + | + | + | + | + | + |
| S13 | + | +/- | | | | | + |
| S15 | | + | | | +/- | | + |
| S22 | + | + | | | | | + |
| S25/C5 | + | +/- | | | | | + |
| S39 | + | + | | | + | | + |
| S41 | | +/- | +/- | + | + | + | + |
| S43 | + | +/- | | | | | + |
| S49 | + | | + | + | | + | + |
| S51 | | + | + | + | | + | + |
| S55 | +/- | + | | | + | | + |
| S63 | + | + | | | | | + |
| S69 | + | +/- | + | + | | + | + |
| S88 | +/- | +/- | +/- | +/- | +/- | +/- | + |
| S97 | +/- | + | +/- | +/- | + | +/- | + |
| S102 | | + | + | | + | + | + |
| S104 | +/- | + | | +/- | + | +/- | + |
| S105 | +/- | + | | | + | | + |
| S106 | +/- | + | + | + | + | + | + |
| S113 | + | + | | | + | | + |

| | | | | | | | |
|-------------|-----|-----|--|--|-----|--|---|
| S120 | | +/- | | | | | + |
| S123 | +/- | + | | | +/- | | + |
| S124 | | + | | | + | | + |
| S130 | | +/- | | | + | | + |
| S133 | +/- | + | | | | | + |
| S138 | + | +/- | | | | | + |
| S149 | + | + | | | + | | + |
| S176 | +/- | +/- | | | | | + |
| S182 | + | + | | | + | | + |
| S191 | +/- | + | | | + | | + |
| S192 | + | + | | | + | | + |
| S242 | | + | | | + | | + |

Ejemplo 3.6: Eficacia del cóctel VI

El cóctel VI es capaz de destruir aproximadamente el 96 % de las 24 cepas bacterianas de *E. coli* de la colección ECOR que se recogen en la tabla 2.

5 Ejemplo 3.7: Eficacia de los cócteles A y B

Los cócteles A y B son ambos capaces de destruir el 100 % de las 25 cepas bacterianas de *E. coli* recogidas en la tabla 2.

10 Las bacterias se enumeraron adicionalmente y se utilizaron para calcular la tasa de resistencia (número de bacterias después de la incubación dividido por el número de bacterias sembradas en placa). La tasa de resistencia con el cóctel A que comprende los 15 tipos diferentes de bacteriófagos es tal y como se muestra en la siguiente tabla 11:

Tabla 11

| Bacterias | Tasa (bacterias/ml) |
|------------------|----------------------------|
| ECOR1 | >1,00E-02 |
| ECOR24 | 2,00E-05 |
| ECOR60 | 4,00E-06 |
| S22 | 1,18E-04 |
| S106 | <1,00E-06 |
| S182 | 2,00E-06 |
| SH5 | 1,00E-06 |
| SH113 | 1,00E-06 |
| Astrid 9 | <1,00E-06 |
| BSE 3 | 8,50E-05 |
| BSE 7 | 5,00E-06 |
| 0157:133 | 2,63E-04 |
| XXT | 1,74E-04 |

Todas las bacterias analizadas son sensibles a las composiciones de la invención.

Ejemplo 4: Especificidad de los cócteles

15 La especificidad de los cócteles se confirmó mediante el análisis de diez especies de bacterias, entre ellas *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Enterobacter aerogenes* C, *Enterobacter asburiae*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus aureus*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Serratia marcescens*.

20 En la tabla 12 se resume la actividad lítica observada para cada bacteriófago utilizado de manera independiente o en combinación como un cóctel de 15 bacteriófagos.

Tabla 12

| Bacteria | E54 | E55 | E56 | E55 | E55 | E35 | DH5 | E56 | E56 | E59 | E59 | E60 | DH5 | E59 | DH5 | Cóctel |
|-------------------------------------|--------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|------|------|------|------|------|------|------|----------|
| Fago EC | 539 | 700 | 753 | 814 | 953 | 954 | 970 | 1002 | 1151 | 1155 | 1168 | 1176 | 1197 | 1226 | 1229 | 15 fagos |
| <i>E. coli</i> | SH 213 | +/- | | | | | +/- | +/- | +/- | + | + | | + | +/- | + | + |
| | SH 141 | | | | | | +/- | | | +/- | +/- | | +/- | | +/- | +/- |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | SH 85 | | | | | | | | | | | | | | | - |
| | SH 224 | | | | | | | | | | | | | | | - |
| <i>Acinebacter baumannii</i> | SH 32 | | | | | | | | | | | | | | | - |
| | SH 34 | | | | | | | | | | | | | | | - |
| <i>Enterobacter aerogenes C</i> | SH 97 | | | | | | | | | | | | | | | - |
| | SH 98 | | | | | | | | | | | | | | | - |
| <i>Enterobacter asburiae</i> | SH 74 | | | | | | | | | | | | | | | - |
| <i>Enterobacter cloacae</i> | SH 111 | | | | | | | | | | | | | | | - |
| | SH 121 | | | | | | | | | | | | | | | - |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | SH 89 | | | | | | | | | | | | | | | - |
| | SH 283 | | | | | | | | | | | | | | | - |
| <i>Proteus mirabilis</i> | SH 82 | | | | | | | | | | | | | | | - |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | SH 14 | | | | | | | | | | | | | | | - |
| | SH 129 | | | | | | | | | | | | | | | - |
| <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> | SH 286 | | | | | | | | | | | | | | | - |
| | SH 290 | | | | | | | | | | | | | | | - |
| <i>Serratia marcescens</i> | SH 314 | | | | | | | | | | | | | | | - |

La tabla de más arriba muestra con claridad que no se produjo ninguna actividad lítica sobre bacterias que no eran cepas de *E. coli*. Los bacteriófagos y el cóctel de la invención son, por lo tanto, muy específicos de las cepas de *E. coli*.

5 Ejemplo 5: Eficacia de los bacteriófagos sobre cepas de *E. coli in vitro*

Se escogieron varias cepas de la colección ECOR para representar la diversidad genética de *E. coli* y diferentes formas de resistencia a los antibióticos. Las cepas eran sensibles o bien resistentes a uno o varios antibióticos. Se hicieron crecer de manera individual o en combinación con 2 a 8 cepas. El cóctel de bacteriófagos se añadió a una MDI de 1 a 10^{-6} , a saber, a una razón de dilución (bacteria/fago) de 1 entre 1 millón.

10 Los resultados se presentan en la figura 1 y en la tabla 13 que viene a continuación.

Tabla 13: Eficacia del cóctel de bacteriófagos que se obtuvo *in vitro* sobre una mezcla de *E. coli* a 2×10^{10} ufc/ml y a varias diluciones:

| Mezcla: | MDI 1 | MDI 0,1 | MDI 0,01 | MDI 0,001 | MDI 0,0001 | MDI 0,000001 |
|-------------|-------|---------|----------|-----------|------------|--------------|
| 1 bacteria | ++ | ++ | ++ | ++ | + | + |
| 2 bacterias | ++ | ++ | + | +/- | +/- | +/- |
| 3 bacterias | ++ | ++ | + | + | +/- | +/- |
| 4 bacterias | ++ | ++ | ++ | + | +/- | +/- |
| 5 bacterias | ++ | ++ | ++ | + | + | +/- |
| 6 bacterias | ++ | ++ | + | +/- | +/- | +/- |
| 7 bacterias | ++ | ++ | ++ | + | +/- | +/- |
| 8 bacterias | ++ | ++ | ++ | + | +/- | |

15 Las composiciones de la invención son capaces de destruir una mezcla de 8 cepas diferentes de bacterias de *E. coli*. El cóctel permanece eficaz contra 8 cepas a una dilución de 1/1 000.

Ejemplo 6: Eficacia de los bacteriófagos sobre la cepa de *E. coli in vivo*

Para los experimentos que vienen a continuación se utilizó una cepa SH113 aislada, recuperada de un paciente quemado en 2011.

20 La cepa SH113 es resistente a ampicilina, ticarcilina, cefalotina, cefotaxima, ácido nalidíxico, norfloxacino, ofloxacino, ciprofloxacino.

Se utilizó el ratón SKH1 (o ratón sin pelo) como modelo murino de infección de *E. coli*.

Procedimiento: (véase la tabla 14 que viene a continuación)

- Se inmunodeprimieron los ratones con 3 inyecciones i.p. de 1,5 mg de ciclofosfamida (Cy), cada 2 días desde el día 3 antes de la infección.
- A los ratones se les quemó la piel con 2 µl de gas mostaza líquido a 30 mg/kg.
- Infección dos días después de la quemadura mediante inyección subcutánea de una suspensión de la bacteria en el sitio quemado.

5

Tabla 14

| Día | -3 | -2 | -1 | 0 | 1 |
|-------------------------|-----------|-------------|-----------|---|-----------|
| | 1,5 mg Cy | Quemadura | 1,5 mg Cy | Infección | 1,5 mg Cy |
| Vía de inyección | i.p. | Gas mostaza | i.p. | s.c. 10 ⁷ ufc | i.p |
| FAGO | | | | Inyección s.c., i.v. o i.p. del cóctel (100 µl, a saber, 10 ⁸ ufp) 6 h después de la infección | |

Las composiciones en cóctel se prepararon de acuerdo con el ejemplo 2 y se empaparon compresas con el cóctel de bacteriófagos a 10⁹ fagos/ml antes de la aplicación el día 0.

10 Se analizaron diferentes concentraciones de cepas de *E. coli* con 100 µl del cóctel de bacteriófagos. Tal y como se muestra en la figura 2, todas las cepas de *E. coli* fueron destruidas 6 h después del tratamiento.

15 Tras la administración de la cepa de *E. coli* SH113 mediante inyección subcutánea a los ratones SKH1, todos los ratones murieron en ausencia de más tratamiento. En los ratones tratados con la inyección de un cóctel de bacteriófagos como el presentado en la tabla 9 de más arriba, se observó una tasa de supervivencia notable (véase la figura 3): supervivencia del 100 % para los ratones SKH1 tratados por vía subcutánea o intravenosa, y supervivencia del 65 % para el tratamiento por la vía intraperitoneal. Al compararlos, se observó una tasa de supervivencia del 80 % para los ratones SKH1 tratados con una dosis doble del antibiótico gentamicina el día 0 + 6 h durante 7 días consecutivos, que incluía 2 inyecciones en el día 1.

20 Se obtuvo una notable tasa de supervivencia del 100 % después del tratamiento subcutáneo con diluciones 1/10, 1/100 y 1/1000 (a saber, 10⁵ ufp por ratón) del cóctel de la invención (véase la figura 4).

En consonancia, las composiciones de la invención pueden tratar una infección *in vivo* y pueden inducir una tasa de supervivencia del 100 % en los ratones infectados.

Referencias

- Affi, R. Y. y A. A. El-Hindawi. 2008. Acute necrotizing fasciitis in Egyptian patients: a case series. *Int. J. Surg.* 66-14.
- 25 Brzozowski D. y D. C. Ross. 1997. Upper limb Escherichia coli cellulitis in the immunocompromised. *J. Hand Surg.* 22678-680
- Clark WA, 1962, *Appl Microbiol.* Comparison of several methods for preserving bacteriophages. 1962 Sep; 10:466-71.
- Corredoira, J. M., J. Ariza, R. Pallares, J. Carratala, P. F. Viladrich, G. Rufi, R. Verdaguier y F. Gudiol. 1994. Gram-negative bacillary cellulitis in patients with hepatic cirrhosis. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 1319-24
- 30 Drulis-Kawa Z, Majkowska-Skrobek G, Maciejewska B, Delattre AS, 2012, Learning from bacteriophages - advantages and limitations of phage and phage-encoded protein applications.; 13(8):699-722.
- Fraser, N., B. W. Davies y J. Cusack. 2006. Neonatal omphalitis: a review of its serious complications. *Acta Paediatr.* 95519-522.
- 35 Krebs, V. L., K. M. Koga, E. M. Diniz, M. E. Ceccon y F. A. Vaz. 2001. Necrotizing fasciitis in a newborn infant: a case report. *Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. Sao Paulo* 5659-62.
- Needleman SB, Wunsch CD "A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins." 1970 Mar; 48(3):443-53.
- Rodgers, G. L., J. Mortensen, M. C. Fisher, A. Lo, A. Cresswell y S. S. Long. 2000. Predictors of infectious complications after burn injuries in children. *Pediatr. Infect. Dis.*; 19(10):990-5.
- 40 Stone R. 2002. Bacteriophage therapy. Stalin's forgotten cure. *Science* 298, 728-731 (DOI: 10.1126/science.298.5594.728)
- Tourmousoglou, C. E., E. C. Yiannakopoulou, V. Kalapothaki, J. Bramis y J. St. Papadopoulos. 2008. Surgical-site

infection surveillance in general surgery: a critical issue. *J. Chemother.* 20(3)312-318.

Weinbauer MG. Ecology of prokaryotic viruses. *FEMS Microbiol Rev* 2004; 28:127-81.

REIVINDICACIONES

1. Una composición antibacteriana que comprende al menos (a) un bacteriófago que tiene actividad lítica contra una cepa de *Escherichia coli* (*E. coli*), en donde dicho bacteriófago tiene un genoma que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID n.º 9 o una secuencia que tiene una identidad de al menos el 97 % con ella, y (b) un bacteriófago que tiene actividad lítica contra una cepa de *Escherichia coli* (*E. coli*) seleccionada de los bacteriófagos que tienen un genoma que comprende una secuencia de nucleótidos de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID n.ºs 1 a 8 y 10 a 15 o una secuencia que tiene una identidad de al menos el 97 % con ella.
2. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende al menos (a) un bacteriófago que tiene actividad lítica contra una cepa de *Escherichia coli* (*E. coli*), en donde dicho bacteriófago tiene un genoma que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID n.º 9 o una secuencia que tiene una identidad de al menos el 97 % con ella, y (b) dos, incluso más preferiblemente al menos tres, bacteriófagos distintos seleccionados de los bacteriófagos que tienen un genoma que comprende una secuencia de nucleótidos de cualquiera de las SEQ ID n.ºs 1 a 8 y 10 a 15 o una secuencia que tiene una identidad de al menos el 97 % con ella.
3. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende un combinación de bacteriófagos seleccionados de:
- un bacteriófago que tiene un genoma que comprende una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID n.º 5 o una secuencia que tiene una identidad de al menos el 97 % con ella, y un bacteriófago que tiene un genoma que comprende una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID n.º 9 o una secuencia que tiene una identidad de al menos el 97 % con ella, y un bacteriófago que tiene un genoma que comprende una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID n.º 10 o una secuencia que tiene una identidad de al menos el 97 % con ella, y un bacteriófago que tiene un genoma que comprende una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID n.º 12 o una secuencia que tiene una identidad de al menos el 97 % con ella; o
 - un bacteriófago que tiene un genoma que comprende una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID n.º 8 o una secuencia que tiene una identidad de al menos el 97 % con ella, y un bacteriófago que tiene un genoma que comprende una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID n.º 9 o una secuencia que tiene una identidad de al menos el 97 % con ella, y un bacteriófago que tiene un genoma que comprende una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID n.º 10 o una secuencia que tiene una identidad de al menos el 97 % con ella, y un bacteriófago que tiene un genoma que comprende una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID n.º 11 o una secuencia que tiene una identidad de al menos el 97 % con ella, y un bacteriófago que tiene un genoma que comprende una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID n.º 12 o una secuencia que tiene una identidad de al menos el 97 % con ella; o
 - un bacteriófago que tiene un genoma que comprende una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID n.º 1 o una secuencia que tiene una identidad de al menos el 97 % con ella, y un bacteriófago que tiene un genoma que comprende una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID n.º 2 o una secuencia que tiene una identidad de al menos el 97 % con ella, y un bacteriófago que tiene un genoma que comprende una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID n.º 3 o una secuencia que tiene una identidad de al menos el 97 % con ella, y un bacteriófago que tiene un genoma que comprende una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID n.º 4 o una secuencia que tiene una identidad de al menos el 97 % con ella, y un bacteriófago que tiene un genoma que comprende una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID n.º 9 o una secuencia que tiene una identidad de al menos el 97 % con ella, y un bacteriófago que tiene un genoma que comprende una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID n.º 12 o una secuencia que tiene una identidad de al menos el 97 % con ella, y un bacteriófago que tiene un genoma que comprende una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID n.º 11 o una secuencia que tiene una identidad de al menos el 97 % con ella.
4. La composición de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, que comprende una combinación del bacteriófago BP1151 (SEQ ID n.º 9) con al menos otro bacteriófago más seleccionado de BP700 (SEQ ID n.º 2), BP953 (SEQ ID n.º 5), BP970 (SEQ ID n.º 7), BP1002 (SEQ ID n.º 8) y BP1176 (SEQ ID n.º 12) o una combinación del bacteriófago BP1151 (SEQ ID n.º 9) con al menos BP539 (SEQ ID n.º 1).
5. La composición de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, que comprende una combinación de todos los bacteriófagos BP539, BP700, BP753, BP814, BP953, BP954, BP970, BP1002, BP1151, BP1155, BP1168, BP1176, BP1197, BP1226 y BP1229 que comprende la secuencia de nucleótidos de las SEQ ID n.ºs 1 a 15, respectivamente.
6. Una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que es lítica contra las cepas de *E. coli* resistentes a antibióticos.
7. Una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que además comprende un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable.
8. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que es una formulación líquida, semilíquida, sólida o liofilizada.

9. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que comprende entre 10^{e2} y 10^{e12} ufp de cada bacteriófago.
10. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, para ser usada en el tratamiento de una infección en un mamífero.
- 5 11. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, para ser usada para mejorar la afección de un mamífero mediante la modificación de la flora microbiana en dicho mamífero.
12. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, para ser usada para la descontaminación de un material.
- 10 13. Un método para preparar una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que comprende la producción por separado de dichos bacteriófagos y la combinación de dichos bacteriófagos con un vehículo o excipiente idóneo.
14. Un método para predecir o determinar la eficacia de un tratamiento con bacteriófagos en un sujeto, en donde el método comprende la etapa de determinar *in vitro* una actividad lítica de un bacteriófago que tiene un genoma que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID n.º 9 o un genoma que consiste en una secuencia que tiene una identidad de al menos el 99 % con ella contra una cepa de *E. coli* obtenida de una muestra de dicho sujeto, en donde una actividad lítica de dicho bacteriófago contra al menos una cepa de *E. coli* obtenida de dicha muestra de dicho sujeto es indicativa de un tratamiento eficaz.
- 15 15. Un método para seleccionar un sujeto o determinar si un sujeto puede obtener beneficio de un tratamiento con bacteriófagos, en donde el método comprende la etapa de determinar una actividad lítica de un bacteriófago que tiene un genoma que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID n.º 9 o un genoma que consiste en una secuencia que tiene una identidad de al menos el 99 % con ella contra una cepa de *E. coli* obtenida de una muestra de dicho sujeto, en donde la presencia de una actividad lítica de dicho bacteriófago es indicativa de un sujeto que responde.
- 20 16. Un bacteriófago que tiene actividad lítica contra una cepa de *E. coli* y que tiene un genoma que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID n.º 9 o un genoma que consiste en una secuencia que tiene una identidad de al menos el 99 % con ella.
- 25 17. El bacteriófago de acuerdo con la reivindicación 16, que es el BP1151 que tiene un genoma que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID n.º 9.
18. Un ácido nucleico aislado que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID n.º 9.
- 30

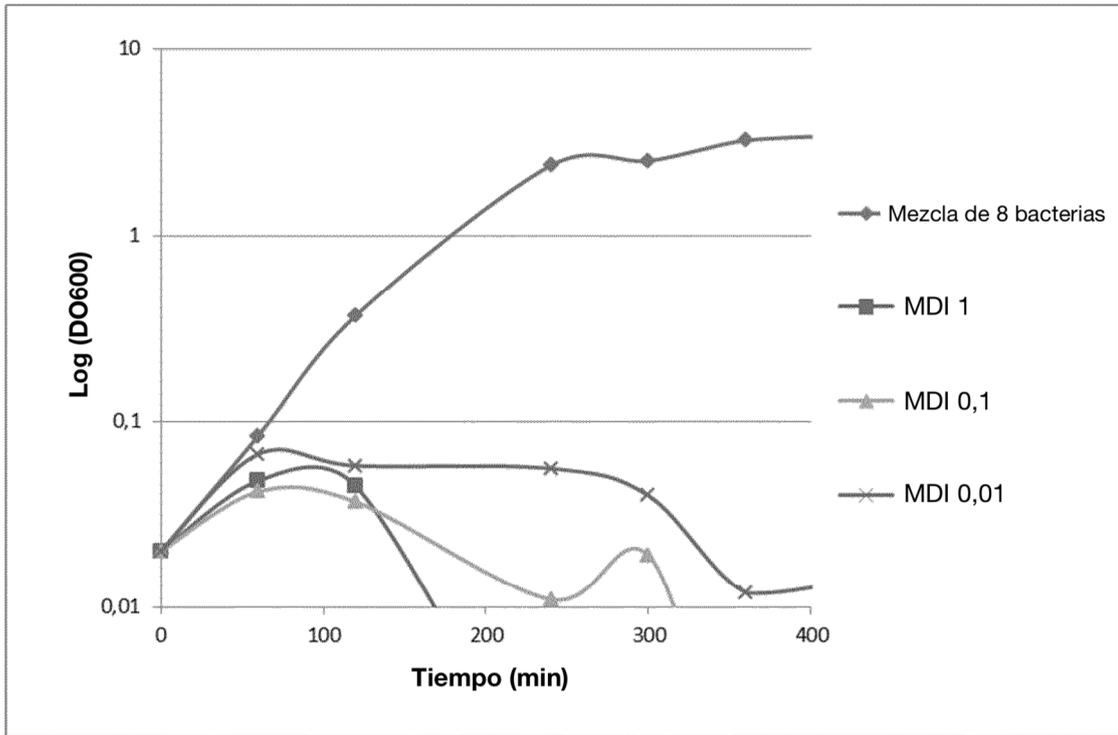


Figura 1

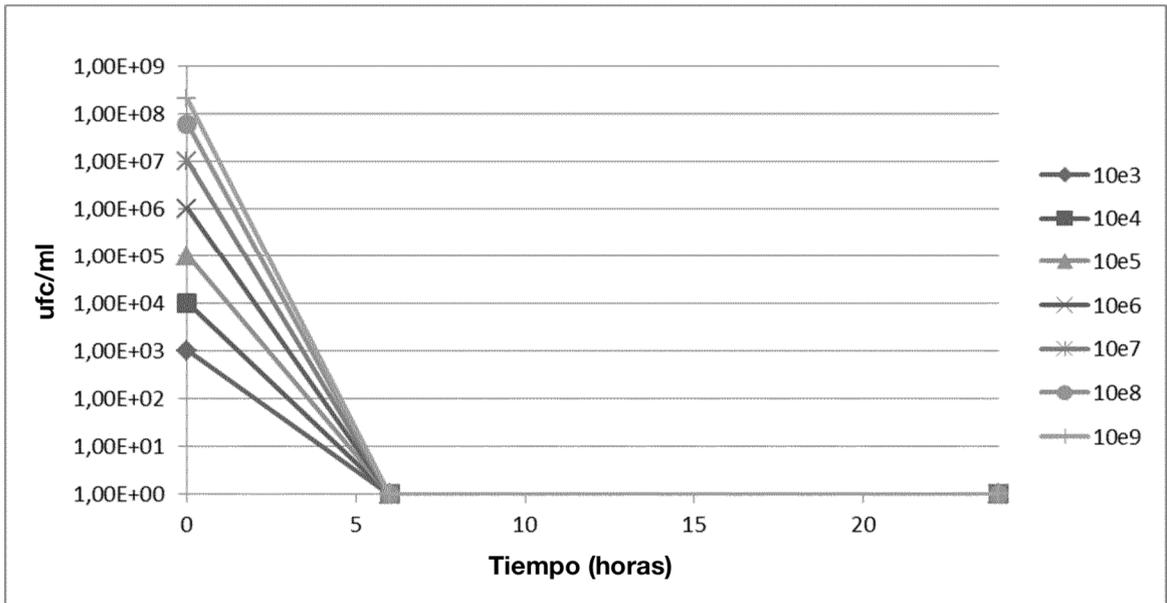


Figura 2

Supervivencia de los ratones infectados con *E. coli* SH113 (10^7 ufc/ml) después de diferentes tratamientos

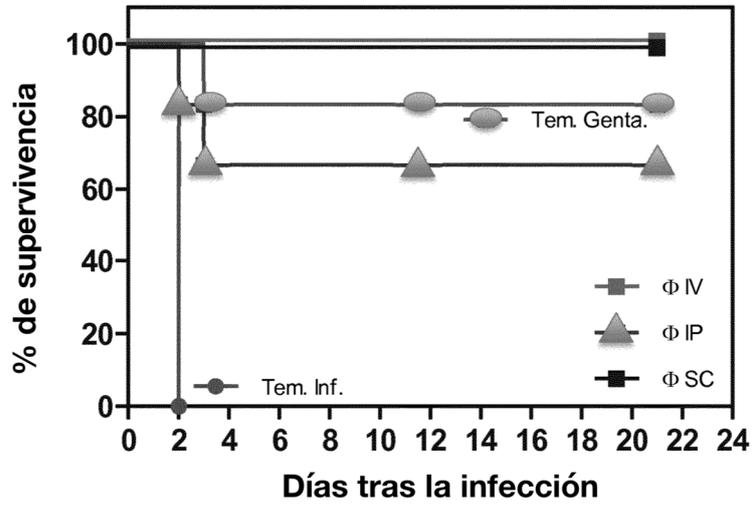


Figura 3

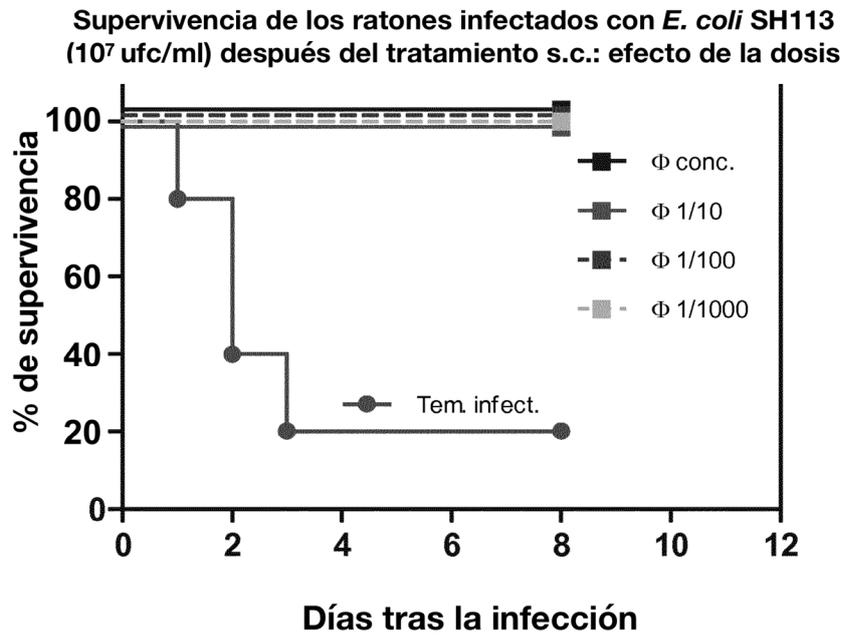


Figura 4