

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 773 149**

51 Int. Cl.:

**A61K 35/76**

(2015.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.05.2013 PCT/GB2013/051163**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.11.2013 WO13164640**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.05.2013 E 13722007 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.12.2019 EP 2874635**

54 Título: **Composiciones terapéuticas con bacteriófagos**

30 Prioridad:

**04.05.2012 GB 201207910**  
**09.10.2012 GB 201218083**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**09.07.2020**

73 Titular/es:

**ARMATA PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)**  
**4503 Glencoe Avenue**  
**Marina del Rey, CA 90292, US**

72 Inventor/es:

**HARPER, DAVID y**  
**BLAKE, KATY**

74 Agente/Representante:

**SALVÀ FERRER, Joan**

**ES 2 773 149 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Composiciones terapéuticas con bacteriófagos

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a procedimientos para preparar paneles de bacteriófagos (ya sea como un cóctel premezclado o para mezclar antes de su uso).

10 **Antecedentes de la invención**

La resistencia a antibióticos es visto ahora como uno de los grandes retos de la medicina moderna. Dada la escasez de nuevos antibióticos, se están investigando una serie de enfoques alternativos, incluyendo el uso de bacteriófagos como agentes terapéuticos (Harper, Anderson & Enright, *Therapeutic Delivery* (2011), 2, 935-947; Hausler T, *Viruses vs. Superbugs: A Solution to the Antibiotics Crisis?* (2006) Macmillan, Nueva York).

Los bacteriófagos (a menudo conocidos simplemente como "fagos") son virus que crecen dentro de bacterias. El nombre se traduce como "comedores de bacterias" y refleja el hecho de que a medida que crecen la mayoría de los bacteriófagos matan al huésped bacteriano ya que se libera la próxima generación de bacteriófagos. Los primeros trabajos con bacteriófagos estaban obstaculizados por muchos factores, uno de los cuales era la creencia generalizada de que sólo había un tipo de bacteriófago, un virus no específico que mataba todas las bacterias. Por el contrario, ahora se entiende que la gama de huéspedes de bacteriófagos (el espectro de bacterias que son capaces de infectar) es a menudo muy específica. Esta especificidad, sin embargo, tiene la desventaja de que es difícil de lograr amplitud de eficacia adecuada de bacteriófagos a través de especies/cepas bacterianas diana. Por tanto, existe una necesidad en la técnica de procedimientos de identificación de combinaciones mejoradas de bacteriófagos que tengan una capacidad de reconocimiento efectiva en relación con especies/cepas bacterianas - véase, por ejemplo, Pirsí, *The Lancet* (2000) 355, 1418. Por estas razones, los ejemplos de composiciones de fagos que demuestran una eficacia clínica sólida son muy limitados. A modo de ejemplo, se hace referencia a los ensayos clínicos exitosos del solicitante (veterinarios y humanos) realizados con un panel de bacteriófagos que reconocen *Pseudomonas aeruginosa* - ver Wright et al, *Clinical Otolaryngology* (2009) 34, 349-357. Por tanto, existe una necesidad en la técnica de desarrollar nuevos paneles de bacteriófagos que tengan una aplicabilidad clínica óptima.

En particular, existe una necesidad en la técnica para diseñar paneles de dos o más bacteriófagos que reconozcan la misma especie/cepa huésped bacteriana, en que dicho panel de bacteriófagos proporciona una eficacia adecuada contra una especie/cepa diana bacteriana en comparación con la eficacia individual de dicho bacteriófago contra dicha especie/cepa diana bacteriana. A este respecto, es necesario que los miembros bacteriófagos del panel trabajen juntos en una combinación (por ejemplo, el panel demuestra la eficacia equivalente o mejorada vis-à-vis los miembros individuales de los mismos).

La presente invención aborda uno o más de los problemas anteriores.

**Descripción resumida de la invención**

La presente invención resuelve los problemas anteriormente descritos al proporcionar procedimientos para el diseño de paneles de bacteriófagos, tal como se especifica en las reivindicaciones.

Un procedimiento para el diseño de un panel terapéutico óptimo de bacteriófagos (que comprende dos o más bacteriófagos) se enseña en este documento. Dicho procedimiento incluye someter a ensayo la actividad de bacteriófagos individuales en cultivos líquidos de una especie/cepa bacteriana diana para determinar la cinética de crecimiento bacteriano, junto con el desarrollo y la especificidad de resistencia desarrollada por la diana bacteriana en dicho cultivo. El procedimiento incluye además determinar la eficacia de paneles de bacteriófagos en dicho cultivo, e identificar de este modo un panel de bacteriófagos ventajoso para su uso contra la especie/cepa bacteriana diana.

Los bacteriófagos que infectan la misma especie/cepa bacteriana pueden emplear mecanismos similares de infección, lo que significa que la resistencia de la especie/cepa bacteriana a un bacteriófago confiere resistencia cruzada a otros bacteriófagos - ver Gill & Hyman, *Curr. Pharm. Biotech.* (2010) 11, 2-14; y Guidolin y Manning, *Eur. J. Biochem* (1985) 153, 89-94. Es evidente que esto no es deseable. Además, los presentes inventores han identificado inesperadamente que los bacteriófagos pueden ser antagonistas uno hacia el otro cuando se reconoce una especie/cepa bacteriana determinada, lo que limita el efecto de bacteriófagos coinfectantes.

Un procedimiento que se enseña en el presente documento para el diseño de un panel de bacteriófagos (que comprende dos o más bacteriófagos), lo que minimiza la resistencia de la especie/cepa bacteriana diana a cada uno de dichos bacteriófagos individuales (es decir, la resistencia cruzada) en el panel, y/o antagonismo entre dichos bacteriófagos cuando reconoce la especie/cepa bacteriana. Dicho procedimiento emplea un proceso de medición de las características de crecimiento de la diana bacteriana y/o características de crecimiento de bacteriófagos cuando está

presente en cultivos líquidos de su bacteria huésped (diana), seguido por selección de un panel terapéutico de bacteriófagos.

Se pueden analizar bacteriófagos líticos individuales en el ensayo de placa y/o en cultivo líquido (caldo) con su huésped bacteriano - se emplean preferiblemente ambas pruebas (por ejemplo, una prueba se puede realizar secuencialmente o antes de la siguiente, o ambas se pueden realizar sustancialmente de forma simultánea). Los que muestran la destrucción eficiente del huésped bacteriano en estos dos sistemas no son necesariamente idénticos. A modo de ejemplo, la placa de ensayo es un proceso dinámico complejo (Abedon & Yin, *Methods Mol. Biol.* (2009) 501, 161-174), mientras que el caldo de cultivo proporciona un ambiente menos estructurado en el que monitorizar la lisis (matar) el huésped bacteriano.

El número de bacterias en tales cultivos líquidos se puede monitorizar directamente mediante el recuento viable de una alícuota del medio de cultivo. Alternativamente, el número de bacterias se puede medir mediante el ensayo de la densidad óptica del cultivo. A modo de ejemplo, los sistemas de lector de placas permiten monitorizar tales cultivos directamente en los sistemas de alto rendimiento, típicamente con una densidad óptica medida a 600 nm.

En cultivos líquidos no tratados con bacteriófago, el número de bacterias aumenta durante varias horas, disminuyendo finalmente ya que los nutrientes se agotan y el número de bacterias alcanza un nivel máximo. Cuando se trata con bacteriófago, el número de bacterias aumenta típicamente durante un tiempo corto, después disminuye rápidamente. Sin embargo, cuando se tratan con un único (por ejemplo, un primer) bacteriófago (o una mezcla de bacteriófagos en que se produce resistencia cruzada) después de varias horas, empiezan a aparecer bacterias resistentes y el número de bacterias aumenta de nuevo.

Mediante el muestreo de estas bacterias resistentes y el ensayo del efecto de bacteriófagos diferentes (por ejemplo, segundo/o tercer bacteriófagos, etc., y) sobre las mismas, se identifican bacteriófagos (por ejemplo, segundos y/o terceros bacteriófagos diferentes, etc.) donde la resistencia bacteriana a un fago (por ejemplo, el primer fago) no confiere resistencia a otros fagos (por ejemplo, segundos y/o terceros bacteriófagos diferentes, etc.) - denominado en este documento como una falta de resistencia cruzada a los fagos. La selección y el uso de paneles de bacteriófagos que comprenden bacteriófagos que demuestran una falta de resistencia cruzada a una especie/cepa bacteriana diana son altamente deseables en paneles de bacteriófagos diseñados para su uso como un agente terapéutico antimicrobiano.

Una vez un panel de bacteriófagos (que tiene características deseadas como se han identificado anteriormente), el panel puede entonces probarse en cultivo líquido. Sorprendentemente, algunas mezclas de bacteriófagos individuales no necesariamente producen efectos aditivos. En particular, el antagonismo se produce cuando los efectos de fagos combinados son menos eficaces en la reducción del número de bacterias que se consiguen con los correspondientes bacteriófagos individuales aislados. La monitorización de la eficacia de tales mezclas en la reducción del número de bacterias en cultivo líquido proporciona un medio para identificar tales combinaciones antagónicas, que se consideran no óptimas para el desarrollo posterior como agentes terapéuticos candidatos.

Los procedimientos para determinar el crecimiento de las bacterias (tales como especie o cepa bacteriana diana) son conocidos en la técnica. A modo de ejemplo, el crecimiento puede determinarse de una especie o cepa bacteriana diana que crece en un cultivo, tal como un cultivo líquido. En este sentido, a medida que las bacterias se multiplican y aumentan en número, aumenta la densidad óptica del cultivo líquido (debido a la presencia de un número creciente de células bacterianas). Por lo tanto, un aumento en la densidad óptica indica crecimiento bacteriano. La densidad óptica puede medirse a 600 nm ( $DO_{600}$ ). Por ejemplo, la densidad óptica a 600 nm se puede determinar dentro de los pocillos de una placa de múltiples pocillos (por ejemplo, una placa de 96 pocillos) utilizando un lector de placas automatizado (por ejemplo un lector de placas BMG Labtech FLUOstar Omega).

El crecimiento de una especie o cepa bacteriana diana se puede determinar y/o monitorizar durante un período de tiempo definido (por ejemplo, al menos 2, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 36 o 48 horas).

En algunas realizaciones, un período de tiempo puede definirse como a partir de la adición de uno o más bacteriófagos diferentes a una especie o cepa bacteriana diana. Alternativamente, un periodo de tiempo puede definirse como a partir de un punto predeterminado después de la adición de uno o más bacteriófagos diferentes a una especie o cepa bacteriana diana (por ejemplo, a partir de al menos 0,25, 0,5, 1, 1,5, 2, 3, 4, 6, 8, 10 o 12 horas después).

Los procedimientos para determinar si un bacteriófago o una combinación de bacteriófagos retrasa el crecimiento (es decir, efectúa el retraso del crecimiento efectos) de una determinada población de bacterias (por ejemplo, una especie o cepa bacteriana diana), tal como se especifica en las reivindicaciones, son conocidos en la técnica.

Como un bacteriófago (o combinación de bacteriófagos) se multiplica en bacterias huésped, tiene lugar la lisis bacteriana, matando las bacterias y conduciendo a una disminución en el crecimiento bacteriano. Una disminución en el crecimiento bacteriano puede incluir una disminución en la velocidad de crecimiento (por ejemplo, la velocidad a la que aumenta el número de células bacterianas), un cese del crecimiento (de manera que el número de células bacterianas se mantiene constante), o una disminución en el número total de células bacterianas.

En una realización, el retraso del crecimiento (es decir, cuando un bacteriófago o combinación de bacteriófagos retrasa el crecimiento) significa que el crecimiento bacteriano en presencia de un bacteriófago o una combinación de bacteriófagos determinados disminuye en comparación con el crecimiento bacteriano de una población equivalente de bacterias (bajo condiciones idénticas o equivalentes) en ausencia de dicho bacteriófago o combinación de bacteriófagos.

Los procedimientos para determinar el crecimiento bacteriano son conocidos en la técnica, tal como se describe anteriormente. Por lo tanto, los procedimientos utilizados para determinar el crecimiento bacteriano (por ejemplo a través de la medición del número de bacterias) también pueden usarse para determinar el retraso del crecimiento. Por lo tanto, a modo de ejemplo, el retraso del crecimiento se puede determinar en un punto de tiempo determinado o durante un periodo de tiempo especificado después de la adición de un bacteriófago o una combinación de bacteriófagos a una población bacteriana (por ejemplo, al menos 2, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 36 o 48 horas). A modo de ejemplo, el período de tiempo especificado puede abarcar la fase logarítmica de crecimiento bacteriano.

En una realización, en la que la invención proporciona un procedimiento de diseño de un panel de bacteriófagos como una composición terapéutica contra una infección bacteriana, tal como se especifica en cualquiera de las reivindicaciones 1-4, si una combinación de bacteriófagos retrasa el crecimiento de la especie o cepa bacteriana diana al menos igual al mayor retraso en el crecimiento logrado independientemente por uno cualquiera de dichos bacteriófagos diferentes o diferentes adicionales en el mismo punto de tiempo dado, el panel se acepta como un panel de bacteriófagos, y los bacteriófagos que constituyen dicho panel se considera que carecen de antagonismo.

Los procedimientos para determinar el desarrollo de la resistencia bacteriana contra un bacteriófago o una combinación de bacteriófagos son conocidos en la técnica. A modo de ejemplo, el desarrollo de resistencia bacteriana puede determinarse mediante la monitorización del crecimiento bacteriano en presencia de un bacteriófago o una combinación de bacteriófagos. El crecimiento bacteriano se puede monitorizar tal como se describe anteriormente. Por lo tanto, en ausencia de resistencia bacteriana contra el bacteriófago o combinación de bacteriófagos, se puede observar el retraso del crecimiento (tal como se describe anteriormente). A medida que se desarrolla la resistencia bacteriana, los efectos del retraso del crecimiento se superan y aumenta el crecimiento bacteriano. El desarrollo de la resistencia bacteriana puede determinarse mediante la monitorización del crecimiento de las bacterias durante un período determinado de tiempo, tal como se describe anteriormente (por ejemplo, al menos 2, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 36 o 48 horas).

La determinación del desarrollo de resistencia bacteriana también puede permitir la identificación de combinaciones de bacteriófagos en la que la resistencia bacteriana a un bacteriófago no confiere resistencia a otro bacteriófago en la combinación (referido como una falta de resistencia cruzada, tal como se describe más arriba).

### **Ejemplos**

Se desarrolló una mezcla para uso *in vivo* contra la cepa PAK de *Pseudomonas aeruginosa*. Las etapas de este desarrollo ejemplifican las etapas de la presente invención.

#### **Cribado inicial:**

La cepa PAK de *Pseudomonas aeruginosa* se utiliza en estudios de infección pulmonar de ratón utilizando un gen informador luminiscente insertado para identificar de forma no invasiva los sitios y los niveles de infección.

Para identificar bacteriófagos para una mezcla terapéutica de bacteriófagos para su uso contra la cepa PAK, los bacteriófagos desarrollados en cepas huésped permisivas se ensayaron a continuación contra la cepa PAK mediante ensayos con puntos ("spots") en céspedes bacterianos, ensayo de placa enumerativa y caldo de cultivo utilizando un sistema de ensayo con lector de placas. El lector de placas monitoriza intensamente la densidad óptica de un cultivo en caldo que contiene bacteriófagos con un huésped adecuado en un formato de placas con múltiples pocillos. Este último procedimiento permite una cinética detallada del proceso de infección a evaluar.

El cribado de bacteriófagos individuales mediante ensayo de placa y en cultivo líquido produjo los resultados mostrados en la Tabla 1. [MOI = multiplicidad de infección (relación de bacteriófagos que infectan con respecto a las células huésped bacterianas)].

La marcada discrepancia entre la poca formación de placa por bacteriófago BCP37 y su eficacia en cultivo líquido debe destacarse.

Basándose en los datos mostrados en la Tabla 1, se seleccionaron los bacteriófagos BCP1, BCP12, BCP14 y BCP37 para análisis adicionales.

#### **Propagación y purificación de bacteriófagos:**

65

Los bacteriófagos candidatos se propagaron en cultivo (caldo) líquido y se prepararon lisados a partir de éstos para el trabajo posterior. Los lisados depurados se purificaron mediante centrifugación a través de un colchón de sacarosa (27 ml de cada lisado se colocan cuidadosamente en capas sobre 5 ml de un "colchón" de sacarosa al 10 % p/v estéril, en tubos de polipropileno de 36 ml antes de la centrifugación. El "colchón" de sacarosa ayuda a eliminar endotoxinas, permitiendo al mismo tiempo que las partículas de virus se sedimenten en el fondo del tubo. Los sedimentos de bacteriófagos se resuspendieron en solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se pasaron a través de un filtro de jeringa de 0,2 µM para asegurar la esterilidad.

#### Prueba inicial de mezclas de bacteriófagos:

Los bacteriófagos individuales BCP12, BCP14 y BCP37 a continuación se volvieron a probar de forma individual a MOI superior y como una mezcla, cuyos resultados se muestran en la [Tabla 2](#).

Los resultados de estas pruebas fueron sorprendentes. Como puede verse a partir de los datos mostrados en la [Tabla 2](#), el bacteriófago BCP37 produjo una reducción efectiva de cantidades de huéspedes bacterianas con un desarrollo muy limitado de la resistencia. Los bacteriófagos BCP12 y BCP14 permitieron más desarrollo de la resistencia. Sin embargo, cuando se utilizó una mezcla de los tres bacteriófagos, mientras que el número de bacterias se controló inicialmente, el desarrollo de formas resistentes fue claramente más rápido que con BCP37 solo, lo que indica efectos antagonistas en la infección del bacteriófago mixto que permiten un escape bacteriano mejorado.

Una prueba adicional aclaró que el bacteriófago BCP14 parecía ser específicamente antagónica a los efectos del bacteriófago BCP37 en la reducción del desarrollo de la resistencia bacteriana; los datos se muestran en la [Tabla 3](#).

El valor final de densidad óptica (DO600) proporcionada en la [Tabla 3](#) refleja el desarrollo de la resistencia bacteriana después de 24 horas. Con mezclas de BCP 37 con BCP1 o BCP12, ésta se redujo considerablemente en comparación con los controles no tratados. Se redujo aún más cuando se utiliza una mezcla de los tres bacteriófagos (BCP1, BCP12, BCP37). Sin embargo, cuando se utiliza el bacteriófago BCP14 en lugar de BCP1, la DO600 final (y de este modo el número de bacterias) es marcadamente superior, lo que ilustra el efecto antagonista.

#### Identificación de resistencia cruzada:

La bacteria huésped que presentaba resistencia desarrollada al bacteriófago con el que fueron tratados mostró un crecimiento marcado en 24 horas después de la infección. Con el fin de determinar si los efectos observados con mezclas iniciales de bacteriófagos eran debido a la resistencia cruzada, se recogieron mutantes resistentes ("escape") de cada ensayo y se trataron con los otros bacteriófagos candidatos. Esto demostró que las formas resistentes a cada uno de los cuatro bacteriófagos también eran resistentes a todos los otros; los datos se muestran en la [Tabla 4](#).

Por lo tanto, los cuatro bacteriófagos (BCP1, BCP12, BCP14, BCP37) cayeron en el mismo grupo de complementación y permiten la generación de formas de resistencia cruzada comunes de la bacteria huésped. Era por lo tanto deseable identificar al menos un bacteriófago que no permitía el desarrollo de dicha resistencia cruzada.

#### Evaluación de bacteriófagos adicionales:

Dado que los mutantes de PAK que desarrollaron resistencia a bacteriófagos candidatos individuales mostraron resistencia cruzada a otros bacteriófagos en el grupo de ensayo, se cribaron bacteriófagos adicionales para identificar candidatos a partir de las reservas existentes que no se verían comprometidos por el mismo mecanismo de resistencia. La prueba de sensibilidad identificó que los bacteriófagos BCP6, BCP21L, BCP26, BCP28 y BCP45 mostraban actividad contra mutantes de PAK resistentes a BCP12 y resistentes a BCP37. Se evaluó la actividad de estos bacteriófagos contra PAK en cultivo líquido; los datos se muestran en la [Tabla 5](#).

Estos resultados indicaron que BCP28 era el candidato más prometedor, mostrando efectos similares a BCP37 con un desarrollo mínimo de resistencia.

A continuación, se evaluaron todos los bacteriófagos candidatos en mezclas con BCP12 y BCP37; los datos se muestran en la [Tabla 6](#).

A pesar de los efectos limitados de BCP6, BCP21L, BCP26 y BCP45 en ensayos individuales, fueron relativamente eficaces en las mezclas. BCP6 y BCP 28 mostraron el desarrollo más limitado de resistencia.

En vista de su aparente superioridad en cultivo individual, se seleccionó BCP28 para la mezcla terapéutica candidata, para combinarse con BCP12 y BCP37. Esta mezcla (la mezcla de tres fagos), por lo tanto, tiene tres bacteriófagos de dos grupos de complementación.

#### Evaluación final de la mezcla terapéutica candidato *in vitro*:

Los datos de la evaluación final se muestran en la [Tabla 7](#).

De este modo, se identificó una mezcla de candidatos de tres bacteriófagos que "eran invariables" en el crecimiento de la bacteria huésped, produciendo una muerte rápida y eficaz de la diana bacteriana y limitaron marcadamente el desarrollo de resistencia bacteriana.

5

#### **Evaluación *in vivo* de la mezcla de tres fagos:**

Los tres bacteriófagos fueron purificados tal como se señaló anteriormente y se combinaron para su uso en un estudio *in vivo* en el que se estableció la infección usando una cepa luminiscente de PAK (PAK-lumi).

10

Los bacteriófagos líticos con eficacia contra la cepa PAK de *P. aeruginosa* se ensayaron en cultivos líquidos de bacterias huésped, abordando tanto la resistencia cruzada como el antagonismo aparente entre bacteriófagos específicos en el desarrollo de una mezcla terapéutica optimizada. Tres bacteriófagos seleccionados se mezclaron y se utilizaron en un estudio *in vivo* en el que se estableció la infección usando una cepa luminiscente de PAK (PAK-lumi).

15

Se infectaron cuatro grupos de ocho ratones BALB/C por vía intranasal con PAK-lumi y se trataron de la siguiente manera:

Los 32 ratones fueron infectados por vía intranasal con  $9 \times 10^6$  UFC en 25  $\mu$ l de PAK Lumi en PBS

Grupo 1 (n = 8): se tomaron imágenes y se sacrificaron en t = 2 horas después de la infección

20

Grupo 2 (n = 8): se tomaron imágenes y se trataron con PBS en t = 2 horas después de la infección

Grupo 3 (n = 8): se tomaron imágenes y se trataron con 200 mg/kg de ciprofloxacina 2 horas después de la infección en inyección subcutánea, se tomaron imágenes a las 2, 4, 6, 8 y 24 horas después de la infección y se sacrificaron a las 24 horas después de la infección (ésta es una dosis extremadamente alta)

25

Grupo 4 (n = 8): se tomaron imágenes y se trataron por vía intranasal con 30  $\mu$ l de la mezcla de tres fagos, a las 2 horas después de la infección, se tomaron imágenes a las 6 y 8 horas después de la infección y se sacrificaron a las 24 horas después de la infección. Los ratones se observaron para los signos clínicos y la luminiscencia de la infección, medidos utilizando un sistema de imágenes *in vivo* IVIS. A las 24 horas, los animales se sacrificaron y se determinó UFC/UFP del homogeneizado de pulmón.

30

La eficacia de la mezcla de tres fagos *in vivo* se demostró mediante imágenes de fluorescencia y mediante enumeración de bacterias en el pulmón (antibiótico = ATB = Ciprofloxacina, tal como se indica) [Figuras 1-5].

La eficacia de la mezcla de tres fagos derivado utilizando el procedimiento, tal como se presenta, se confirmó *in vivo*.

35

La mezcla de bacteriófagos mostró una potente actividad y no resistencia *in vitro* a las 24 horas. Los ratones tratados con bacteriófagos *in vivo* mostraron una marcada disminución de la luminiscencia después de 6 horas con una reducción mayor en general en comparación con el grupo de ciprofloxacina. Esto fue particularmente notable en el área nasofaríngea, aunque las reducciones también se observaron en la luminiscencia con el área abdominal. La luminiscencia en los pulmones era comparable en términos generales, pero se redujo notablemente con la ciprofloxacina y la mezcla de bacteriófagos. En 24 horas, todos los ratones tratados con fagos y antibióticos sobrevivieron con una reducción de ~ 3 log en las UFC de pulmón observadas para ambos grupos.

40

En conclusión:

La mezcla de tres fagos es muy eficaz *in vitro*.

45

También es capaz de controlar rápidamente las bacterias en la orofaringe y los pulmones de los ratones infectados por la cepa PAK de *P. aeruginosa* en un modelo de fase aguda.

50

Su eficacia es equivalente o superior a una alta dosis de un antibiótico que se demuestra que es activo contra el organismo infeccioso.

Su acción parece ser más rápida que el antibiótico, y la diseminación de la infección se reduce.

55

Continuando desde este modelo agudo, los estudios de biopelículas de laboratorio y datos de ensayos clínicos del oído crónicamente infectado sugiere que un entorno fuertemente colonizado rico en biopelícula puede proporcionar las condiciones óptimas para la terapia con bacteriófagos.

El pulmón con fibrosis quística puede proporcionar dicho entorno.

60

**REIVINDICACIONES**

1. Procedimiento de diseño de un panel de bacteriófagos como una composición terapéutica contra una infección bacteriana, comprendiendo el procedimiento:
- 5 (a) proporcionar dos o más bacteriófagos diferentes, en el que cada uno de dichos dos o más bacteriófagos diferentes independientemente retrasa el crecimiento de una especie o cepa bacteriana diana;
- (b) combinar al menos dos de dichos dos o más bacteriófagos diferentes;
- 10 (c) determinar el crecimiento de la especie o cepa bacteriana diana en presencia de dicha combinación de dos o más bacteriófagos diferentes, en el que las condiciones de crecimiento de la especie o cepa bacteriana diana son las mismas o equivalentes en las etapas (a) y (c);
- (d) en el que, cuando dicha combinación retrasa el crecimiento de la especie o cepa bacteriana diana menos que el mayor retraso en el crecimiento logrado independientemente por uno cualquiera de dichos dos o más bacteriófagos diferentes, la combinación es rechazada inicialmente como un panel de bacteriófagos;
- 15 (e) proporcionar al menos un bacteriófago diferente adicional que independientemente retrasa el crecimiento de la especie o cepa bacteriana diana,
- (f) sustituir al menos un bacteriófago de una combinación especificada en la parte (d) por el al menos un bacteriófago diferente adicional para formar una combinación adicional;
- (g) determinar el crecimiento de la especie o cepa bacteriana diana en presencia de dicha combinación adicional;
- 20 (h) en el que, cuando dicha combinación adicional retrasa el crecimiento de la especie o cepa bacteriana diana al menos igual al mayor retraso en el crecimiento logrado independientemente por uno cualquiera de dichos bacteriófagos diferentes o diferentes adicionales, la combinación se acepta como un panel de bacteriófagos; y
- (i) en el que, cuando dicha combinación adicional retrasa el crecimiento de la especie o cepa bacteriana diana menos que el mayor retraso en el crecimiento logrado independientemente por uno cualquiera de dichos bacteriófagos diferentes o diferentes adicionales, la combinación se rechaza posteriormente como un panel de bacteriófagos.
- 25 2. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que el crecimiento se determina en un cultivo líquido de bacterias.
3. Procedimiento, según la reivindicación 2, en el que el crecimiento se determina en un cultivo líquido de bacterias mediante la medición de la densidad óptica del cultivo líquido; preferiblemente, en el que la densidad óptica se mide a
- 30 600 nm.
4. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la especie o cepa diana bacteriana se selecciona de: *Acinetobacter baumannii*, *Clostridium difficile*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia*, especies bacterianas causantes de olor corporal, *Staphylococcus aureus* y
- 35 *Streptococcus mutans*.

Tabla 1

			Prueba de sensibilidad	¿Buenas eficacia al poner en placas en base a los resultados del ensayo de placas?	
Fago	Huésped bacteriano	Título de reserva (ufp/ml)	Formación de placas en PAK	PAK	Ensayo con lector de placas (MOI 0,1 en PAK)
BCP1	BC12	4.3E+10	S	Sí	
BCP2	BC254	1.0E+08	I	No	
BCP3	BC15	6.0E+09	R	No	
BCP4	BC207	5.0E+09	I	Sí	
BCP6	BC15	4.5E+10	S	No	
BCP12	BC3	3.7E+10	S	Sí	
BCP14	BC207	6.0E+09	S	Sí	
BCP21L	BC178	1.6E+10	S	No	
BCP29	BC14	1.4E+10	S	Moderada	
BCP33	BC230	6.2E+10	I	No	
BCP37	BC193	3.5E+08	S/I	No	
BCP62	BC191	2.8E+08	R	No	
BCP69	BC254	1.9E+10	I	No	
BCP154	BC725	1.1E+10	S	No	



Tabla 2

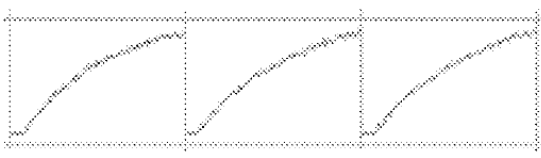
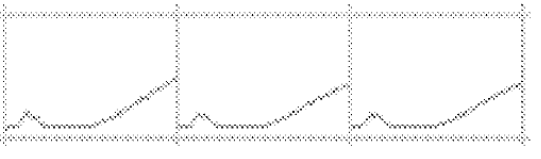
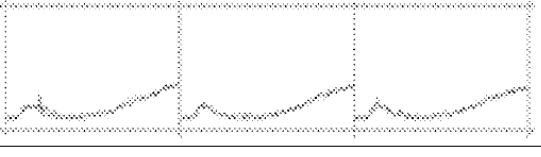
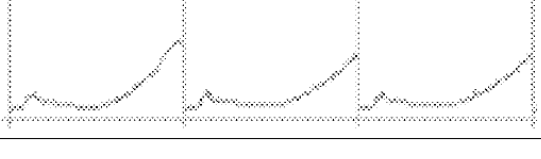
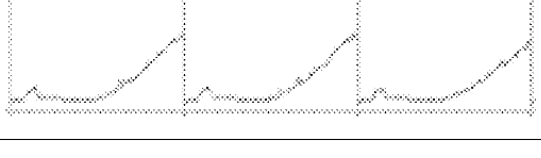
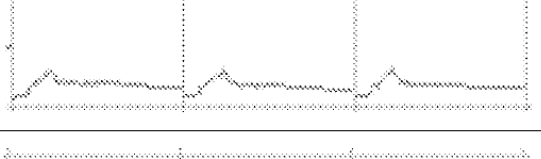
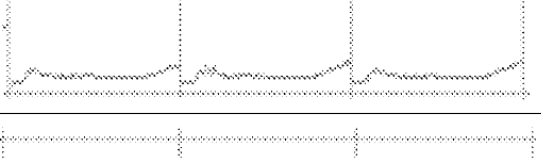
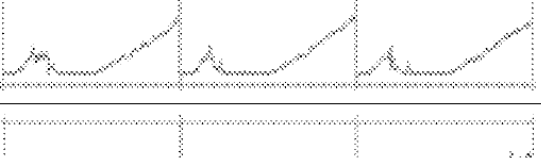
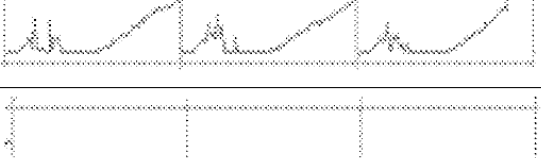
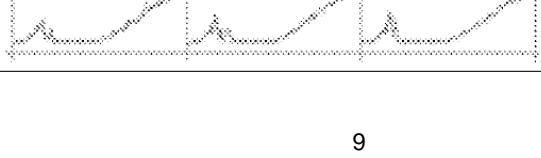
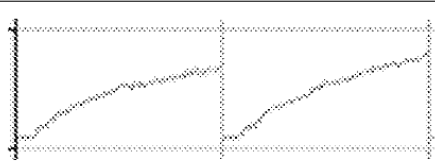
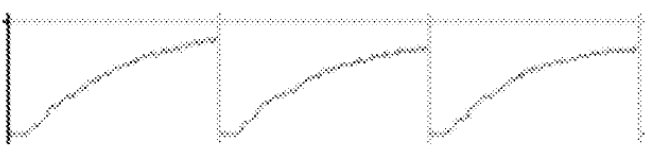
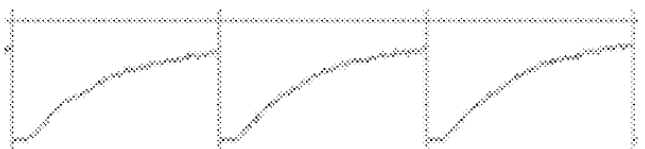
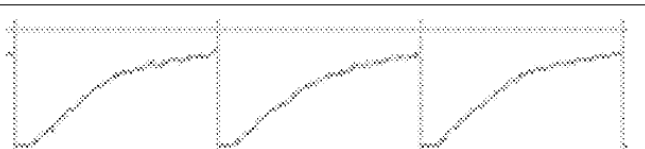
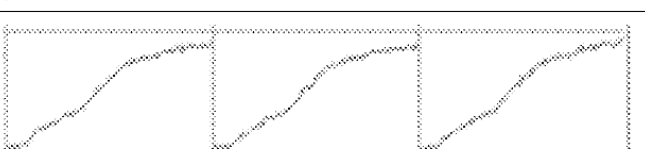
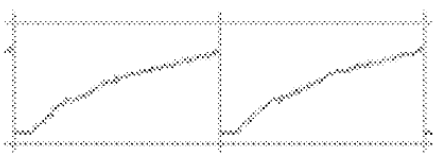
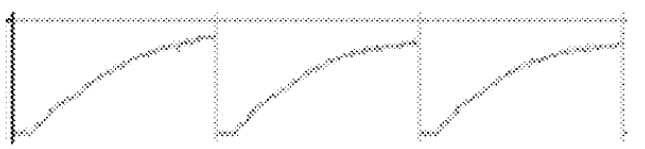
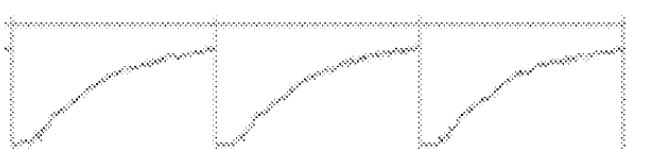
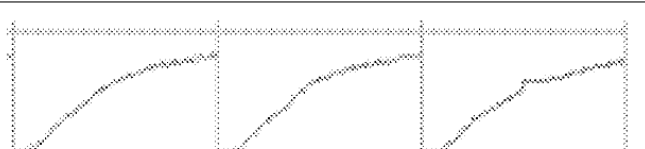
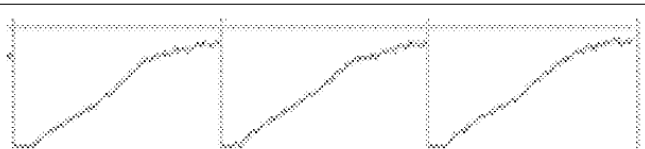
Fago	MOI	DO600 durante 24 horas
sin fago	-	
BCP12	1	
	10	
BCP14	1	
	10	
BCP37	1	
	10	
Mezcla BCP12 BCP14 BCP37	0.1	
	1	
	10	

Tabla 3

Fago	MOI	DO600 durante 24 horas y DO600 del punto final			DO600 promedio
sin fago	-				2.13
		2.09	2.12	2.19	
BCP1 BCP37	0.1				1.06
		1.04	1.10	1.05	
BCP12 BCP37	0.1				1.19
		1.11	1.18	1.28	
BCP1 BCP12 BCP37	0.1				0.95
		0.95	0.94	0.95	
BCP12 BCP14 BCP37	0.1				1.45
		1.39	1.57	1.38	

Tabla 4

Mutante de PAK	Fago	MOI	DO600 durante 24 horas
colonia A mutante resistente a BCP12	-	-	
	BCP1	1	
	BCP12	1	
	BCP14	1	
	BCP37	1	
colonia A mutante resistente a BCP14	-	-	
	BCP1	1	
	BCP12	1	
	BCP14	1	
	BCP37	1	

(continuación)

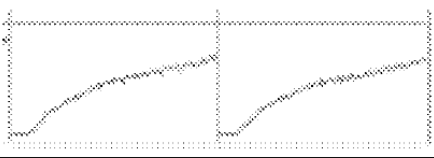
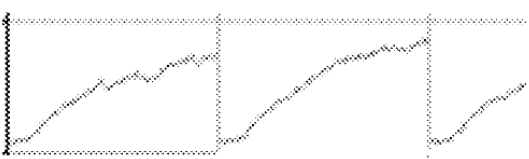
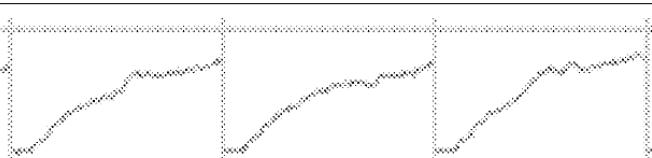
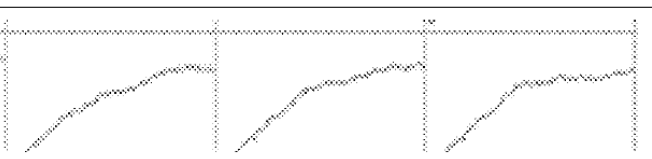
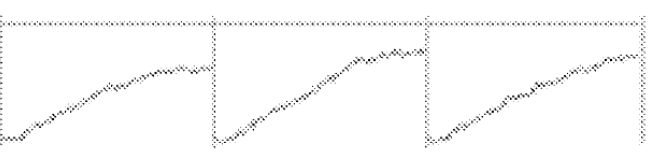
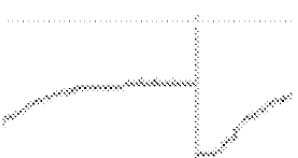
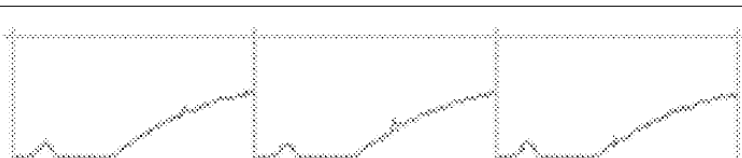
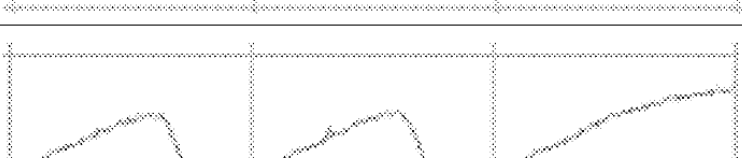


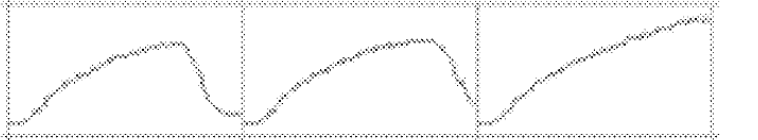
Mutante de PAK	Fago	MOI	DO600 durante 24 horas
Colonia A mutante resistente a BCP37	-	-	
	BCP1	1	
	BCP12	1	
	BCP14	1	
	BCP37	1	

Tabla 5

Fago	Cepa de crecimiento	MOI	DO600 durante 24 horas
-			
BCP6	BC00015	1	
BCP21_L	BC00178	1	
BCP26	BC00010	1	

(continuación)

Fago	Cepa de crecimiento	MOI	DO600 durante 24 horas
BCP28	BC00014	1	
BCP45	BC00237	1	

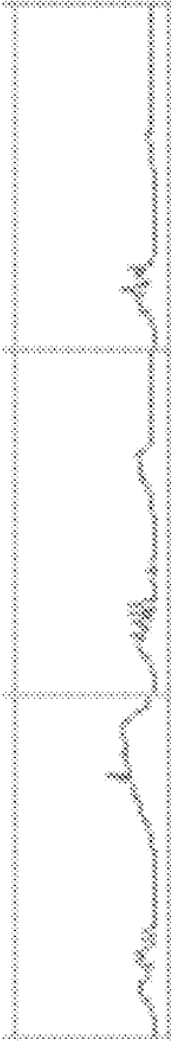
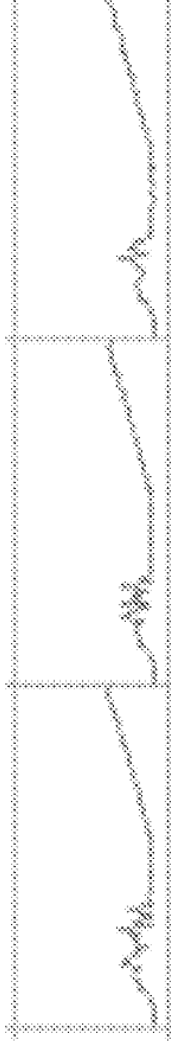

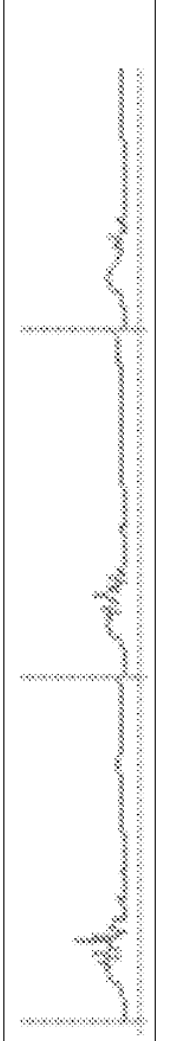
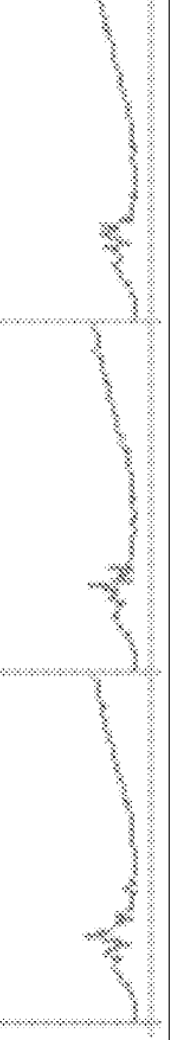
Fago	Cepa de crecimiento	MOI	DO600 durante 24 horas
BCP12_PAK BCP37_BC00193 BCP6_BC00015		1	
BCP12_PAK BCP37_BC00193 BCP21L_BC00178		1	
BCP12_PAK BCP37_BC00193 BCP26_BC00010		1	
BCP12_PAK BCP37_BC00193 BCP28_BC00014		1	
BCP12_PAK BCP37_BC00193 BCP45_BC00237		1	

Tabla 7

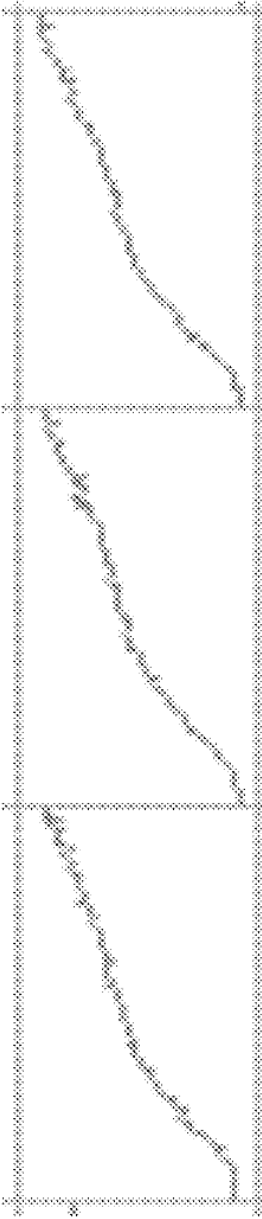
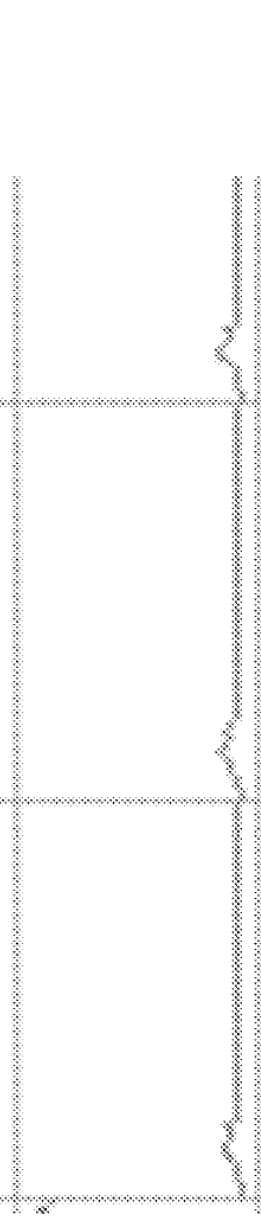
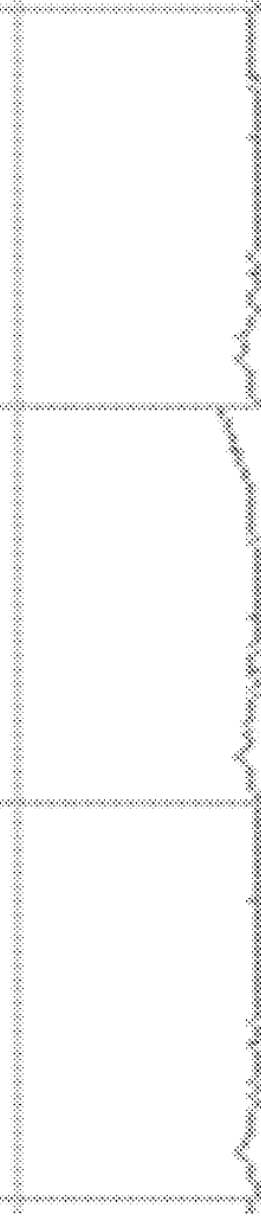
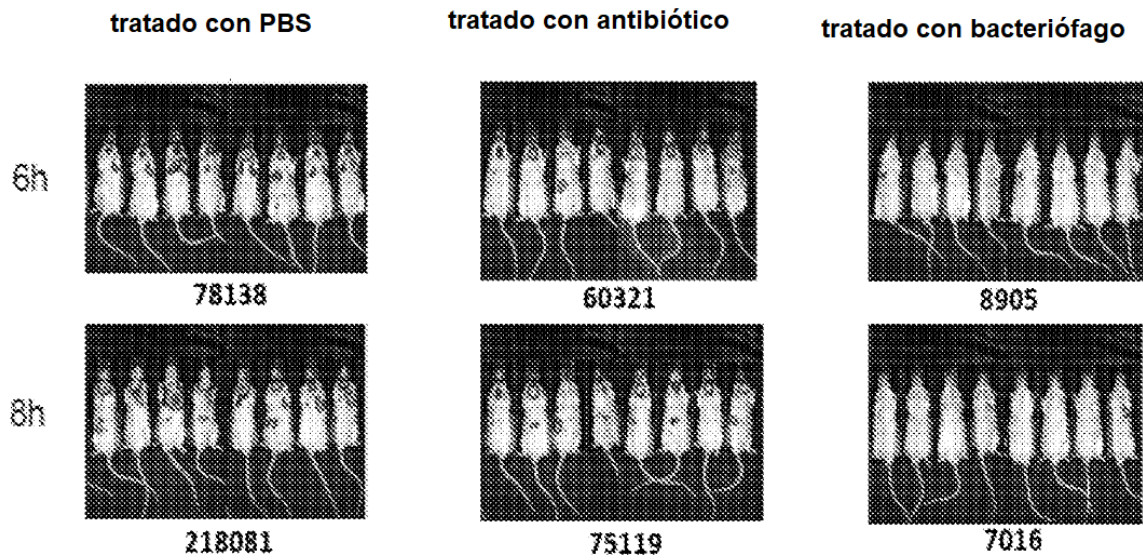
Fago	MOI	DO600 durante 24 horas
-	-	
BCP12_PAK BCP28_PAK BCP37_BC001 93	1	
BCP12_PAK BCP28_PAK BCP37_BC001 93	10	

Figura 1



Los números muestran el recuento de fluorescencia corporal total promedio para cada grupo



Figura 2

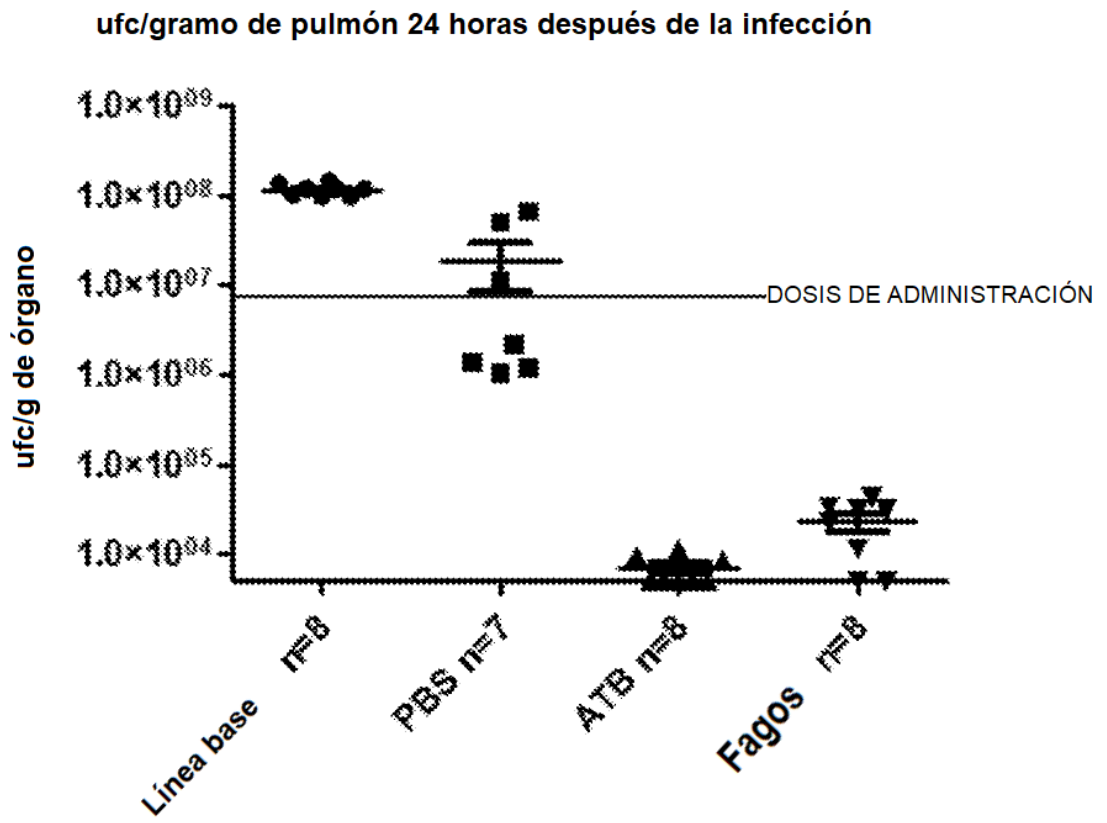


Figura 3

Luminiscencia en ratones infectados de 6 a 24 horas

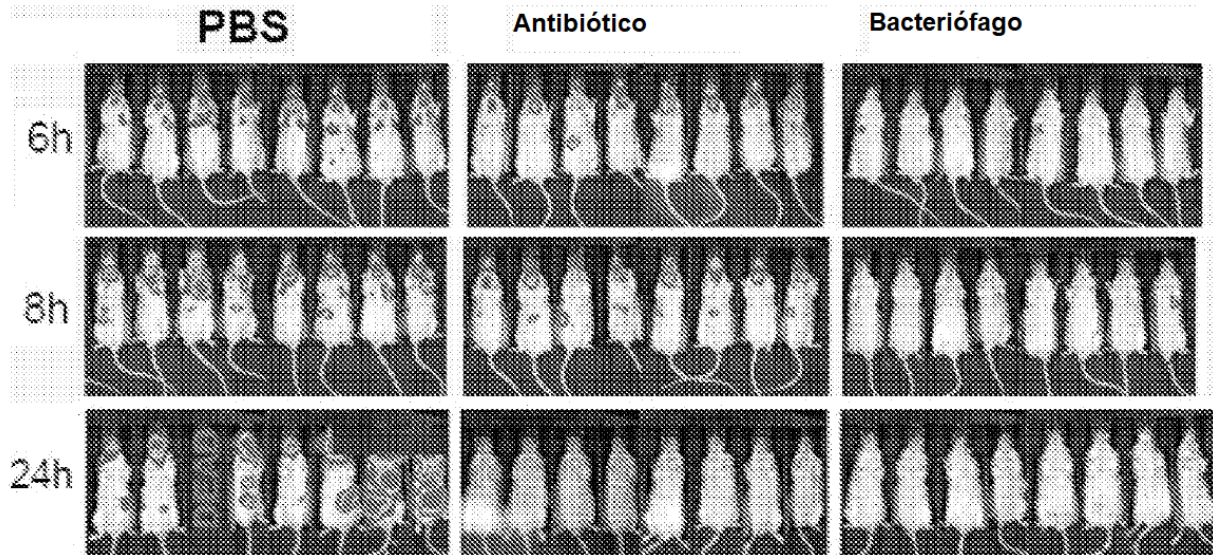
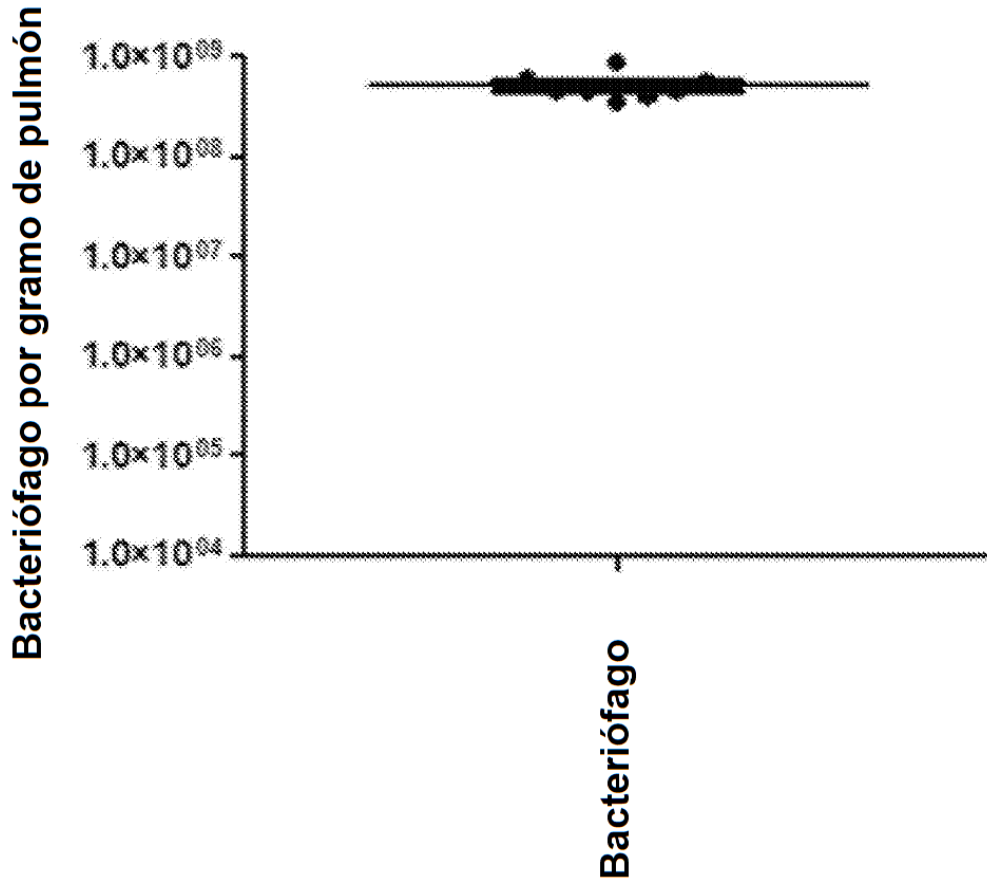


Figura 4

Recuento de bacteriófagos en el pulmón de ratón (muestra tratada solo con bacteriófagos)



**Figuras 5a-5c**

Luminiscencia en regiones de ratones infectados

Figura 5a

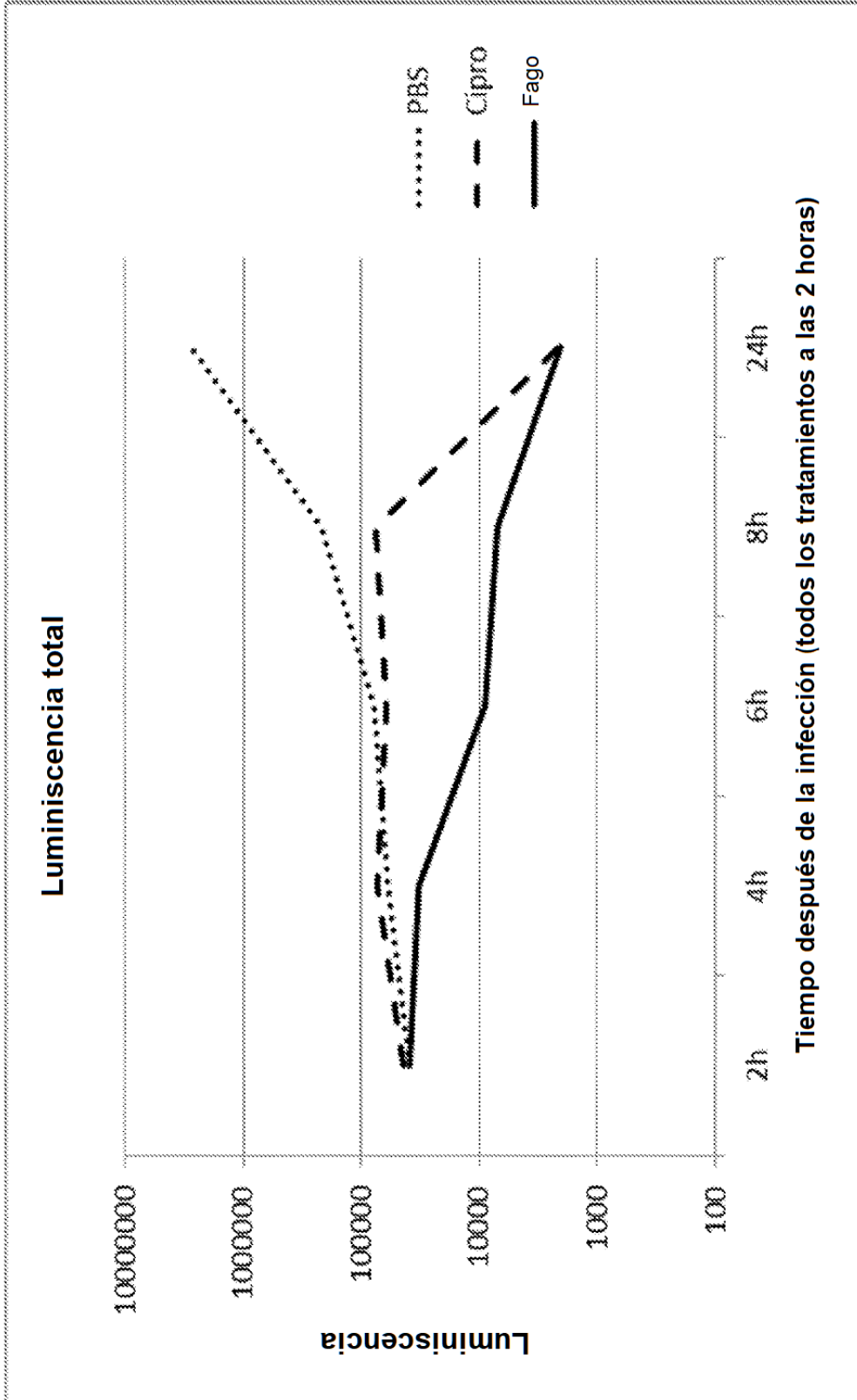


Figura 5b

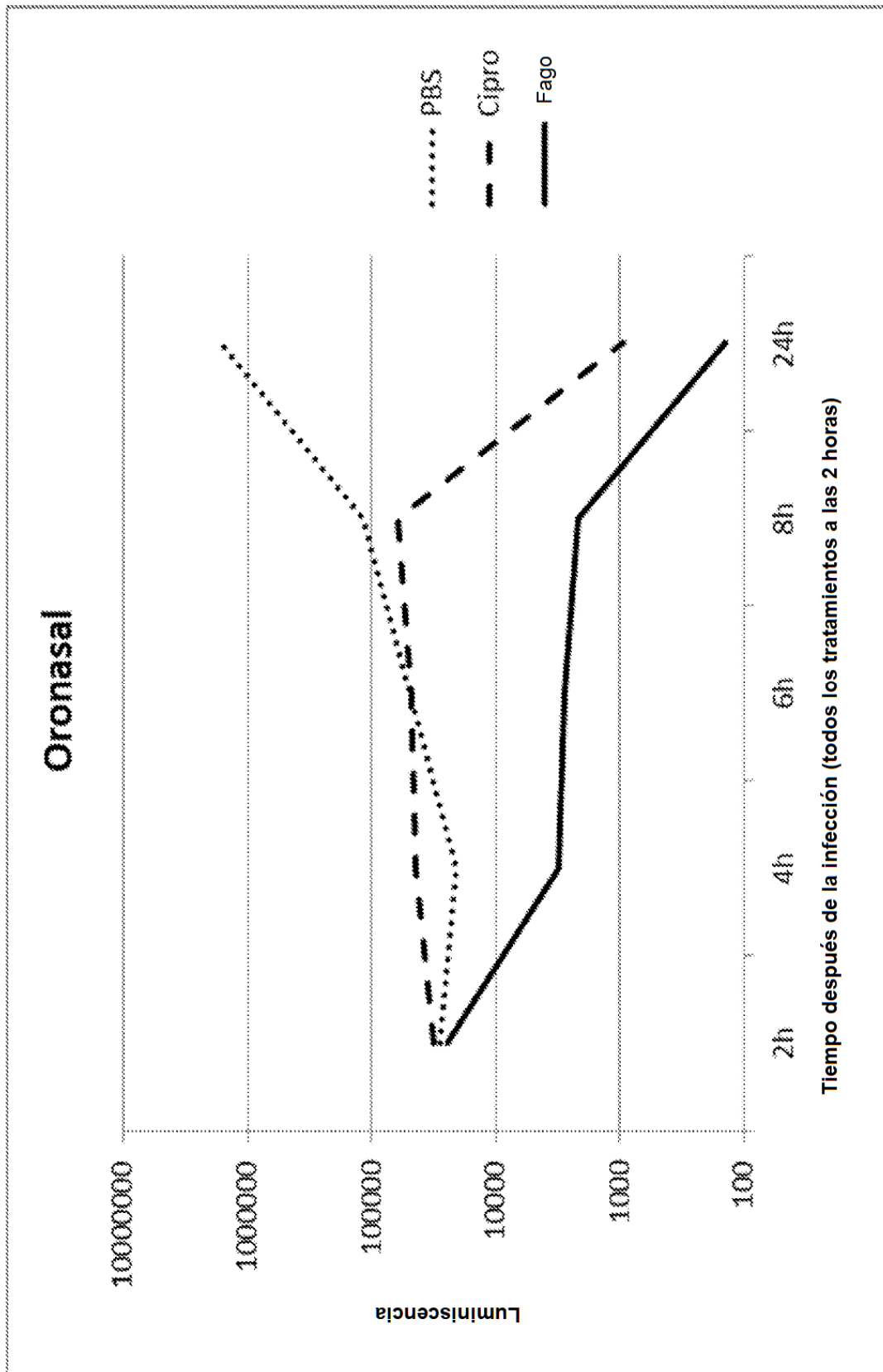


Figura 5c

