

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 394 455**

51 Int. Cl.:

A23K 1/17 (2006.01)

A23K 1/18 (2006.01)

A61K 35/76 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.11.2005 E 05804032 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la solicitud europea: **01.08.2007 EP 1812025**

54 Título: **Formulaciones de bacteriófagos estabilizados**

30 Prioridad:

02.11.2004 US 624576 P

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

31.01.2013

73 Titular/es:

**CHR. HANSEN A/S (100.0%)
Boge Allé 10-12
2970 HÖRSHOLM, DK**

72 Inventor/es:

**MURTHY, KISHORE y
ENGELHARDT, RAINER**

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 394 455 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

Formulaciones de bacteriófagos estabilizados

5 [0001] La presente invención se refiere a formulaciones de bacteriófagos estabilizados y a su uso en forma de sistemas de entrega. Más particularmente, la presente invención se refiere a formulaciones de bacteriófagos estabilizados, a métodos para preparar estas formulaciones de bacteriófagos estabilizados, y a usos de formulaciones de bacteriófagos estabilizados en forma de sistemas de entrega.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0002] La terapia bacteriófaga tiene la capacidad de proporcionar un método eficaz para controlar específicamente la multiplicación de varias cepas de bacterias. No obstante, para ser comercialmente viables, los bacteriófagos deben mostrar un cierto grado de estabilidad para permitir su almacenamiento.

15 [0003] Se han utilizado varios métodos para el almacenamiento de fagos, incluyendo refrigeración a bajas temperaturas, liofilización, y almacenamiento en medio líquido. Todos los métodos han demostrado tener varios niveles de éxito en cuanto al mantenimiento de un alto título de bacteriófagos viables.

20 [0004] Prouty (1953, Appl Microbiol, 1:250-351) reportó que los bacteriófagos desecados de *Streptococci* que producen ácido láctico se mantenían viables a 0°C durante 42 meses, a 37°C durante 72 meses y a 12°C y 25°C durante al menos 78 meses. No obstante, no se menciona el efecto de almacenamiento de bacteriófagos desecados en la título del bacteriófago.

25 [0005] Keogh y Pettingill (1966, Appl Microbiol, 14:4421-424) muestran que los bacteriófagos para los *Streptococci* que producen ácido láctico en presencia de una proteína de lactosuero son resistentes a la congelación y al almacenamiento en frío. Unos fagos almacenados a 4°C y -18°C exhibieron una pequeña reducción del título de bacteriófago; los ciclos de congelación-descongelación tampoco exhibieron ninguna pérdida significativa de título. Warren y Hatch (1969, Appl Microbiol, 17:256-261) revelaron una reducción significativa del título y viabilidad de una suspensión de bacteriófagos almacenados (sin estabilizadores) a 4°C, mientras que el almacenamiento a -20°C y a 20°C permitía la mayor supervivencia de fagos. También revelaron que el almacenamiento a largo plazo de bacteriófagos a -20°C tenía tendencia a producir la formación de aglutinaciones.

35 [0006] Waddell et al. (US 2004/0208854) describen una forma de dosificación farmacéutica de liberación controlada para bacteriófagos. Los bacteriófagos se estabilizan por liofilización en presencia de un polímero metacrílico y un lioprotector.

[0007] Loomis y Fischetti (WO 2004/064732) revelan métodos y composiciones para tratar infecciones bacterianas con proteínas de fagos asociadas a bacterias, enzimas o péptidos y/o fragmentos peptídicos de los mismos y revelan la adsorción de lisinas de fagos mediante pulverización de la proteína en el alimento.

40 [0008] Jepson y March (2004, Vaccine, 22:2413-2419) revelan que una suspensión líquida de bacteriófagos (en un tampón SM o en una dilución 1/200 de tampón SM en agua) era estable durante 6 meses a 4°C y -70°C, con el fago manteniendo intacto por congelación-descongelación. La temperatura aumentada, entre 20°C y 42°C, producía una pérdida significativa del título. La liofilización y reconstitución inmediata de bacteriófagos en presencia o en ausencia de estabilizadores producía una pérdida del título de 80-95%. De los bacteriófagos restantes después de la liofilización en presencia de polvo de leche desnatada seco, el almacenamiento a temperaturas entre 20°C y 42°C producía una pérdida de título similar a la de la suspensión líquida. No obstante, la liofilización en presencia de trehalosa producía un aumento de la vida media del bacteriófago de entre 20°C y 42°C. El efecto del pH del medio de almacenamiento también fue examinado. No se produjo ningún cambio del título de bacteriófago después de un periodo de 24 horas en un pH de 3 a 11. No obstante, del título se redujo rápidamente cuando se almacenaba durante 5 minutos en valores de pH inferiores a 2,4.

55 [0009] Scott et al (WO 03/093462) divulga la estabilización e inmovilización de virus, incluyendo bacteriófagos, por enlace covalente del virus con un sustrato. Este proceso requiere el uso de productos químicos para activar el sustrato y agentes de acoplamiento para ayudar a la formación de enlaces covalentes entre el sustrato y el virus. El uso de estos reactivos aumenta los gastos necesarios para la inmovilización. Además, los virus o bacteriófagos no son capaces de liberarse en el entorno debido a su unión covalente con el sustrato. Por lo tanto, el fago inmovilizado sólo puede actuar en lugares discretos.

60 [0010] La congelación o liofilización de suspensiones de bacteriófagos, o suspensiones de bacteriófagos que contienen opcionalmente estabilizadores, son métodos poco adecuados que requieren equipamiento especializado e incrementan los costes de una preparación comercial. Aunque es deseable almacenar los bacteriófagos en un estado desecado, el proceso de liofilización da lugar a una pérdida significativa del título. Además, la unión covalente de bacteriófagos a un sustrato no permite la liberación de los bacteriófagos del sustrato y limitan su utilidad para nuestras aplicaciones.

Métodos alternativos para estabilización de bacteriófagos son necesarios.

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

5 [0011] La presente invención se refiere a formulaciones de bacteriófagos estabilizados y a su uso en forma de sistemas de entrega. Más particularmente, la presente invención se refiere a formulaciones de bacteriófagos estabilizados, a métodos para preparar formulaciones de bacteriófagos estabilizados, y a los usos de formulaciones de bacteriófagos estabilizados.

10 [0012] Un objeto de la presente invención consiste en proporcionar una formulación de bacteriófagos estabilizada con una estabilidad mejorada.

15 [0013] La presente invención proporciona un método para la producción de una composición antibacteriana comprendiendo la adsorción de una solución acuosa de uno o más bacteriófagos sobre una matriz sólida o en polvo para producir una composición, y el secado de la composición para producir una composición antibacteriana.

[0014] La presente invención también pertenece al método descrito anteriormente donde la matriz puede ser seleccionada en el grupo que consiste en polvo de leche desnatada, polvo de proteína de soja, y peptona vegetal.

20 [0015] La presente invención también provee una composición antibacteriana comprendiendo una o más cepas de bacteriófago adsorbido en la matriz.

[0016] La presente invención incluye el material antibacteriano tal como se ha definido anteriormente, donde la matriz soluble se selecciona en el grupo que consiste en polvo de leche desnatada y proteína de soja.

25 [0017] Las composiciones antibacterianas de la presente invención son fáciles de preparar y muestran la propiedad de ser estables durante varios periodos de tiempo en un frigorífico y a temperatura ambiente, de aproximadamente -10°C hasta aproximadamente 25°C, o de cualquier temperatura comprendida entre éstas. Además, uno o más bacteriófagos, componentes de fago, o ambos, pueden ser liberados fácilmente de las composiciones antibacterianas de la presente invención con poca o ninguna pérdida de título. Las composiciones antibacterianas de la presente invención se pueden utilizar en lociones, lubricantes, geles y cremas, pasta dental, mezclar con un soporte farmacéuticamente aceptable para aplicaciones orales, nasales o tópicas por ejemplo pero sin limitarse a éstos, en aplicaciones sobre la piel, vaginales, oftálmicas, nasales, auditivas, anales, rectales, y otros tipos de administración, o bien ser usadas al interior de apósitos para heridas, y exhibir una actividad antimicrobiana.

35 [0018] La presente invención provee preparaciones de fagos estabilizadas en una forma seca como un sistema de entrega para inhaladores en polvo. La presente invención provee también una matriz adecuada para preparar fagos o composiciones de fagos para la encapsulación y la entrega en el intestino pasando por los ácidos de estómago.

40 [0019] Las composiciones antibacterianas de la presente invención se pueden utilizar para fines humanos, veterinarios, agrícolas o acuícolas. Además las composiciones como se describen en este caso, se pueden utilizar para el tratamiento de árboles y plantas, y en aplicaciones medioambientales. La composición antibacteriana se puede utilizar al interior de una crema, loción o gel, ser mezclada con un soporte farmacéutico y ser administrada tópicamente, por vía oral, nasal, usada como un inhalador en polvo, o la composición antibacteriana se puede añadir a un alimento usado en piensos animales, aviares o acuáticos.

45 [0020] Este resumen de la invención no describe obligatoriamente todas las características necesarias de la invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

50 [0021] Estas y otras características de la invención serán más aparentes en la descripción siguiente en la que se hace referencia a los dibujos anexos en los que:

[0022] La figura 1 muestra el título de fagos aplicado al polvo de leche desnatada (Antes) y el que se obtiene después de la inmovilización y la resuspensión (Después).

55 [0023] La figura 2 muestra el título de fagos aplicado al polvo de proteína de soja (Antes) y el que se obtiene después de la inmovilización y la resuspensión (después).

[0024] La figura 3 muestra la estabilidad de fagos inmovilizados durante un periodo de 4,5 meses (131 días) y de 10 meses (311 días) cuando se almacenan a temperatura ambiente (RT) o a 4°C.

60 [0025] La figura 4 muestra el título de fagos aplicado al polvo de proteína de peptona vegetal (Antes) y el que se obtiene después de la inmovilización y la resuspensión (Después).

DESCRIPCIÓN DE LA FORMA DE REALIZACIÓN PREFERIDA

[0026] La presente invención se refiere a formulaciones de bacteriófagos estabilizados. Más particularmente, la presente invención se refiere a formulaciones de bacteriófagos estabilizados, métodos para preparar formulaciones de bacteriófagos estabilizados, y a usos de formulaciones de bacteriófagos estabilizados.

[0027] La siguiente descripción se refiere a una forma de realización preferida.

[0028] La presente invención proporciona una composición antibacteriana que comprende una o más cepas de bacteriófago adsorbido sobre una matriz. La presente invención provee también un método para producir una composición antibacteriana comprendiendo la adsorción de una solución acuosa de bacteriófagos sobre una matriz para producir una composición antibacteriana, y el secado de la composición antibacteriana. La solución de bacteriófago puede comprender una o más cepas de bacteriófago que son capaces de infectar esta última o distintos objetivos bacterianos. Este método es simple de ejecutar, no requiere equipamiento especializado, y los componentes de bacteriófagos, de fago, o una combinación de los mismos, preparados de esta manera son estables.

[0029] La composición antibacteriana se puede utilizar de varias maneras para controlar el crecimiento bacteriano, y se puede utilizar para una gran variedad de aplicaciones. Por ejemplo, de manera no limitativa, las composiciones antibacterianas se pueden utilizar en aplicaciones humanas, veterinarias, agrícolas y acuícolas. Además, las composiciones se pueden utilizar para el tratamiento de árboles y plantas, y aplicaciones medioambientales. En un ejemplo adicional no limitativo, las composiciones antibacterianas de la presente invención se pueden utilizar en lociones, lubricantes, geles y cremas para aplicaciones dermatológicas o de lesiones, aplicadas directamente con aplicaciones tópicas, por ejemplo pero sin limitarse a esto, ser aplicadas en la piel, en áreas vaginales, oftálmicas, nasales, auditivas, anales, o rectales, o bien ser usadas al interior de un dentífrico o ser aplicadas en hilo dental con fines de higiene oral. La composición antibacteriana también se puede aplicar en un apósito para curar heridas. La composición antibacteriana también se puede encapsular y usar en forma de aditivo alimentario o de tratamiento oral para el control de bacterias en una especie humana, mamífera, o aviar.

[0030] El término "bacteriófago" o "fago" es bien conocido en la técnica y indica generalmente un virus que infecta bacterias. Los bacteriófagos son parásitos que se multiplican en las células bacterianas mediante el uso de algunos o de todos los huéspedes de maquinaria biosintética, y éstos pueden ser líticos o bien lisogénicos. Los bacteriófagos usados de acuerdo con la presente invención pueden ser cualquier bacteriófago, lítico o lisogénico eficaz contra un patógeno objetivo de interés.

[0031] Con el término "patógeno objetivo" o "bacteria objetivo", se hace referencia a bacterias patógenas que pueden causar enfermedades en seres humanos, animales, peces, pájaros, o plantas. El patógeno objetivo puede ser cualquier tipo de bacterias patógenas en seres humanos, animales, peces, pájaros, y plantas.

[0032] Con el término "animal" o "animales", se hace referencia a cualquier animal que puede ser afectado por, o ser portador de un patógeno. Por ejemplo, pero sin deseo de limitarse a éstos, animales puede incluir humanos, aves de corral como el pollo o el pavo, etc; el cerdo; la ganadería, término que incluye todos los animales ungulados como caballos, ganado, cabras, y ovejas, etc; y animales domésticos como gatos y perros.

[0033] Un fago específico para uno o más patógenos objetivo puede ser aislado usando técnicas estándar en el arte, por ejemplo tal y como se expone en Maniatis et al (1982, Molecular cloning: a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.; incorporado aquí como referencia). Si se desea, se puede utilizar un cóctel de bacteriófagos diferentes para tener como objetivo uno o más patógenos tal y como se describe en la presente.

[0034] El término "componente de fago" o "componentes de fago" se refiere a cualquier componente de fago que incluye pero sin limitarse a éstos, una proteína de fago u otro ensamblaje molecular eficaz para la eliminación, reducción de crecimiento o reproducción de una bacteria objetivo, o bien de una pluralidad de bacterias objetivo.

[0035] Si se desea, se puede utilizar un cóctel de bacteriófagos contra un único objetivo bacteriano, u objetivos bacterianos múltiples. Las bacterias objetivo pueden ser cualquier tipo de bacterias, por ejemplo pero sin limitarse a estas especies bacterianas y cepas de *Escherichia coli*, *Streptococci*, *Humicola*, *Salmonella*, *Campylobacter*, *Listeria*, *Lawsonia*, *Staphylococcus*, *Pasteurella*, *Mycobacterium*, *Hemophilus*, *Helicobacter*, *Mycoplasma*, *Nisseria*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Proteus*, *Bacteroides*, *Pseudomonas*, *Borrelia*, *Citrobacter*, *Propionobacter*, *Treponema*, *Chlamydia*, *Trichomonas*, *Gonorrhoea*, *Clostridium*, *Shigella*, *Enterococcus*, *Leptospirex*, *Bacillii* incluyendo *Bacillus anthracis* y otras bacterias patogénicas para seres humanos, el ganado, o las aves de corral. Unas bacterias de interés son aquellas conocidas por contaminar alimentos para animales, alimentos líquidos para animales, o en general explotaciones ganaderas de engorde. Bacterias de interés particular son las que infectan también el ganado, incluyendo cerdos y aves de corral destinados a consumo humano, por ejemplo pero sin limitarse a éstas, la *Salmonella*, *Campylobacter* y *E. coli* O157:H7.

[0036] Uno o más bacteriófagos pueden estar provistos en una solución acuosa. La solución acuosa puede ser cualquier

solución adecuada para el fin de la presente invención. Por ejemplo, uno o más bacteriófagos pueden estar provistos en agua o en un medio apropiado conocido en el arte de la técnica, por ejemplo un caldo LB, SM, TM, PBS, TBS u otros tampones comunes conocidos en el arte de la técnica (ver Maniatis et al., 1982, Molecular cloning: a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.; incorporado aquí como referencia). Por ejemplo, pero sin limitarse a esto, los bacteriófagos se pueden almacenar en un caldo LB.

[0037] Con el término "matriz", se hace referencia a cualquier matriz sólida adecuada que puede ser soluble en agua, ingerible por un mamífero, o bien adecuada para un uso en lociones, lubricantes, geles o cremas o geles. Adicionalmente, la matriz puede ser no soluble en agua, siempre que cualquiera de los fagos absorbidos se puedan liberar de la matriz. La matriz puede ser capaz de adsorber uno o más bacteriófagos en su superficie y de liberar uno o más bacteriófagos en un entorno apropiado. No conviene que uno o más bacteriófagos se adhieran tan fuertemente a la matriz ya que no se podrán liberar en resuspensión apropiada en un medio. Si los bacteriófagos se asocian de una manera no liberable con la matriz, es preferible que la matriz esté presente en forma de partículas, de un tamaño de aproximadamente 0,1 nm a aproximadamente 100µm, para minimizar cualquier impedimento estérico entre el bacteriófago y su acción sobre el huésped objetivo.

[0038] Uno o más bacteriófagos adsorbidos, inmovilizados, se asocian de manera no covalente con la matriz de manera a ser liberados de la matriz cuando se desee. Ejemplos no limitativos de una matriz que se pueden utilizar según la presente invención incluyen polvo de leche desnatada, peptona vegetal, polvo de proteína de soja. Preferiblemente, la matriz se considera en generalmente segura (GRAS). En la presente descripción, uno o más bacteriófagos que se asocian a, o son adsorbidos en, la matriz, se indicarán como "fagos inmovilizados" o "bacteriófagos inmovilizados".

[0039] Uno o más bacteriófagos en solución acuosa se pueden aplicar en la matriz por cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo por goteo o pulverización, siempre que la cantidad de la matriz exceda la cantidad de solución acuosa de bacteriófagos, componentes de fagos, o de ambos. Se prefiere que la matriz permanezca en un estado seco o semi-seco, y que no se forme una suspensión líquida de bacteriófagos (o componentes de fagos) y de matriz. De estos métodos, la pulverización de la solución de bacteriófago sobre la matriz es la preferida.

[0040] La composición antibacteriana comprendiendo uno o más bacteriófagos y la matriz se puede secar a una temperatura de aproximadamente 0°C hasta aproximadamente 50°C o cualquier temperatura comprendida entre éstas, por ejemplo a una temperatura de 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, o 50°C. La composición antibacteriana se puede secar a una temperatura de aproximadamente 10°C hasta aproximadamente 30°C, o cualquier temperatura comprendida entre éstas, o de aproximadamente 15°C hasta aproximadamente 25°C o cualquier temperatura comprendida entre éstas. El proceso de secado también se puede acelerar por medio de flujo de aire encima o a través de la composición antibacteriana. Alternativamente, el secado se puede realizar por calentamiento del material inmovilizado al vacío.

[0041] Después de un periodo de secado, la solución acuosa adicional se puede aplicar a la matriz si se desea, y la matriz se puede volver a secar. Este proceso se puede repetir según sea necesario para obtener la cantidad deseada de fagos en la matriz. La graduación de fagos en la matriz se puede determinar fácilmente mediante el uso de técnicas estándar.

[0042] Además, uno o más bacteriófagos adsorbidos en una matriz se pueden introducir en un soporte sólido. Adicionalmente, una solución acuosa de bacteriófagos se puede introducir al interior de un soporte sólido y secar. Se puede utilizar cualquier soporte sólido adecuado conocido en la técnica para proporcionar una liberación retardada. Por ejemplo, pero sin limitarse a éstos, microesferas, material a base de celulosa, material a base de carbohidratos, goma laca, polímeros, metacrilato, azúcares, por ejemplo pero sin limitarse a éstos, manitol y sorbitol, proteína de soja, proteína de lactosuero, proteína algal y otra proteína unicelular, caseína, gelatina, leche en polvo, ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa (HPMCP), ftalato de acetato de celulosa (CAP), y succinato de acetato de hidroxipropilmetilcelulosa (HPMCAS) se pueden utilizar como soporte sólido.

[0043] Las composiciones antibacterianas descritas anteriormente, que sea un bacteriófago inmovilizado o bien bacteriófagos inmovilizados introducidos en un soporte sólido, se puede indicar también en la presente como "bacteriófagos o componentes de fago estabilizados" o "fagos o componentes de fago estabilizados". Los fagos estabilizados descritos aquí pueden, cuando se introducen en el entorno líquido apropiado, liberar preferiblemente los bacteriófagos de tal modo que los bacteriófagos sean libres en la solución.

[0044] Los bacteriófagos estabilizados y descritos anteriormente se pueden formular usando cualquier método adecuado conocido en la técnica. Por ejemplo, pero de manera no limitativa, los bacteriófagos estabilizados pueden ser encapsulados, incorporados en una cápsula, en comprimidos, o una combinación de los mismos.

[0045] El término "encapsulado" indica que la composición antibacteriana se reviste con una sustancia que aumenta la resistencia de los fagos a las tensiones físico-químicas de su entorno. Los fagos o componentes de fagos estabilizados se pueden revestir con cualquier sustancia conocida en la técnica, por cualquier método adecuado conocido en la técnica, por ejemplo, pero sin limitarse a éste, el método descrito en la publicación estadounidense US 2003/0109025

(Durand et al., que se incorpora aquí como referencia). En este método, unas microgotas de la sustancia de revestimiento se inyectan en una cámara con el componente a encapsular, y éstas son enfriadas rápidamente. Alternativamente, una composición de revestimiento se puede mezclar con uno o más bacteriófagos o componentes de fago estabilizados, de la presente invención, en agitación o agitación constante, y ésta es secada o enfriada según se necesite.

[0046] En otro método alternativo de encapsulación de los bacteriófagos estabilizados, se puede usar una pulverización de disco giratorio (p. ej. patentes US 5,643,594; US 6,001,387; US 5,578,314; Senuma Y et. al. 2000, Biomaterials 21:1135-1144; Senuma Y., at. al. 2000, Biotechnol Bioeng 67:616-622; que se incorporan aquí como referencia). Como lo entenderá bien un experto en la técnica, los fagos estabilizados se pueden dispersar en una mezcla caliente o una solución orgánica comprendiendo la sustancia de revestimiento deseada. La dispersión se puede colocar después en el centro de un disco giratorio y el material se pulveriza al salir de la periferia del disco, produciendo así bacteriófagos encapsulados estabilizados. El material encapsulado se puede después coleccionar usando un separador ciclónico, o un lecho de almidón alimenticio modificado. La composición encapsulada se puede reintroducir en el pulverizador de disco giratorio para aumentar el espesor del revestimiento. De esta manera, se puede obtener composiciones de bacteriófagos encapsuladas con un espesor de revestimiento diferente, las cuales exhiben diversas propiedades de liberación temporizada en un entorno adecuado.

[0047] Un revestimiento de suspensión en aire es otro ejemplo de un método de encapsulación que se puede utilizar. En este método, un revestidor de pulverización en lecho fluidizado se utiliza para aplicar un revestimiento uniforme sobre partículas sólidas (p. ej. Jones, D. 1994, Drug Development and Industrial Pharmacy 20:3175-3206 ; Hall et al. 1980, The Wurster Process, in "Controlled Release Technologies: Methods, Theory, and Applications", Kyonius A.F. ed. Vol 2, pp. 133-154, CRC Press, Boca Raton FL; Deasy, P.B., 1988, Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst. S(2):99-139 ; que se incorpora aquí como referencia). La composición antibacteriana se puede suspender por medio de una corriente de aire destinada a inducir un corriente cíclica regular, de paso por una boquilla usada para pulverizar la sustancia de revestimiento. Una vez pulverizadas, las partículas de composición antibacteriana pueden ser elevadas por la corriente de aire durante el secado del revestimiento. Las partículas pueden circular después para pasar por la boquilla hasta que se aplique un revestimiento uniforme. Las partículas pueden circular hasta que se aplique el espesor de película deseado. Las partículas pueden circular después para pasar por la boquilla hasta obtener un revestimiento uniforme, o hasta aplicar el espesor de película deseado. De esta manera, se puede obtener composiciones de bacteriófagos encapsuladas con un espesor de revestimiento diferente que exhiben distintas propiedades de liberación temporizada en un entorno adecuado.

[0048] Alternativamente, se puede utilizar un solvente orgánico comprendiendo el compuesto o sustancia de revestimiento. Ejemplos no limitativos de solventes orgánicos incluyen cloruro de metileno, acetato de metilo, acetato de etilo, metil éter cetona, acetona, alcoholes y otros solventes o combinaciones de los mismos.

[0049] La sustancia de revestimiento puede ser cualquier sustancia de revestimiento adecuada conocida en la técnica. Por ejemplo, pero sin limitarse a esto, la sustancia de revestimiento puede comprender una sustancia con una temperatura de fusión comprendida entre aproximadamente 20°C y aproximadamente 100°C, o cualquier temperatura entre éstas, por ejemplo entre aproximadamente 30°C y aproximadamente 80°C, o cualquier temperatura entre éstas, o entre aproximadamente 60°C y aproximadamente 80°C, o cualquier temperatura entre éstas; por ejemplo, la temperatura de fusión puede ser de 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, o 100°C, o cualquier temperatura entre éstas. Si la sustancia de revestimiento se debe ingerir o usar para una administración oral, entonces se prefiere que la sustancia sea una sustancia de grado alimenticio. No obstante, los bacteriófagos estabilizados de la presente invención también se pueden revestir con otras sustancias que no son de grado alimenticio, en función del uso previsto de la composición antibacteriana. Por ejemplo, la composición antibacteriana se puede encapsular en un revestimiento de emulsión compatible para un uso en lociones o lubricantes o en cremas o geles. Otras moléculas aditivas se pueden añadir a la sustancia de revestimiento; tal aditivo puede incluir antioxidantes, azúcares, proteínas u otro material sintético.

[0050] Ejemplos no limitativos de sustancias de revestimiento adecuadas incluyen materiales a base de lípidos tal como ácidos grasos vegetales; ácidos grasos tales como el ácido palmítico y ácido esteárico, por ejemplo Stéarine™; ceras animales, por ejemplo cera de abejas; ceras vegetales, por ejemplo cera Carnauba o cera de Candelilla; derivados de cera; otros lípidos o derivados lipídicos; y goma laca.

[0051] También se puede usar sustancias de revestimiento adicionales, por ejemplo, materiales sin base de lípidos (ver por ejemplo, patente Estadounidense N.º. 6,723,358; y N.º. 4,230,687, las cuales se incorporan aquí como referencia), por ejemplo azúcares, componentes a base de celulosa, u otros componentes a base de carbohidratos que pueden ser solubles en agua. Por ejemplo, y sin limitarse a éstos, se puede utilizar ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa (HPMCP), ftalato de acetato de celulosa (CAP), y succinato de acetato de hidroxipropilmetilcelulosa (HPMCAS) como materiales sin base lipídica adecuados para la encapsulación.

[0052] También se puede usar polímeros para encapsular los bacteriófagos estabilizados. Cualquier polímero conocido en la técnica se puede utilizar, y se puede elegir para una liberación inmediata de los bacteriófagos o para una liberación controlada. Por ejemplo, y sin limitarse a ello, unos polímeros apropiados pueden incluir los que están

descritos por Mehta (patente U.S. n.º. 6,926,909), Hussain et al (patente U.S. n.º. 6,649,187), o Yang et al (patente U.S. n.º. 5,576,022), todas incorporadas aquí como referencia. En un ejemplo no limitativo, se puede utilizar polímeros tales como ftalato poli(vinil acetato) (PVAP), a base de metacrilato, o goma laca.

5 [0053] Como lo entenderá un experto en la técnica, se puede utilizar una o más sustancias de revestimiento. Por ejemplo, los bacteriófagos estabilizados se pueden encapsular o introducir en un tipo de sustancia de revestimiento, seguido de una segunda encapsulación, o sobre-revestimiento, mediante el uso de otra sustancia de revestimiento. En un ejemplo no limitativo, los bacteriófagos estabilizados en primer lugar pueden ser encapsulados o introducidos en un componente a base de celulosa, seguido de un sobre-revestimiento con un material a base de lípidos; alternativamente, los bacteriófagos estabilizados en primer lugar pueden ser encapsulados o introducidos en un polímero, seguido de un sobre-revestimiento con un material a base de lípidos.

15 [0054] El proceso de encapsulación a base de lípidos protege hasta cierto punto uno o más bacteriófagos de un entorno hostil, el o más bacteriófagos pueden ser expuestos, por ejemplo, a un entorno de pH bajo en una serie de condiciones de fermentación de alimentos líquidos, o al sistema digestivo de un animal. El material a base de lípidos seleccionado para la encapsulación también debe exhibir la propiedad de destruirse en un entorno deseado de manera a liberar uno o más bacteriófagos para proporcionar una forma de liberación temporizada. Por ejemplo, unas enzimas digestivas pueden degradar el material de encapsulación y ayudar a liberar uno o más bacteriófagos, componentes de fago, o los dos en el intestino de un animal, o bien enzimas en el alimento líquido de fermentación, por ejemplo, puede ayudar a liberar algunos del uno o más bacteriófagos de la encapsulación. Otros mecanismos de liberación incluyen en base al pH, una reacción con productos químicos liberados al interior de una cámara definida tal como ácidos biliares. El resultado es que se puede utilizar diferentes materiales para la encapsulación del uno o más bacteriófagos de modo que, si se desea, se produce una liberación seleccionada del bacteriófago, al mismo tiempo que se protege uno o más bacteriófagos. Mediante la variación del espesor del revestimiento de bacteriófagos encapsulados también se puede proporcionar características de liberación temporizada adicionales.

25 [0055] Además, un material de base no lipídica o de encapsulación de polímeros se puede disolver en agua, de manera a liberar inmediatamente uno o más bacteriófagos, o poco después de la mezcla con el medio de alimento líquido. Uno o más bacteriófagos también se pueden liberar de una forma controlada temporizada dependiendo del material y formulación seleccionados, o según las preparaciones provistas en forma de cápsula o de pastilla. Las formulaciones en cápsula o pastilla pueden ayudar a la liberación temporizada de los bacteriófagos o componentes de fago estabilizados en el animal u otro entorno. Por lo que, mezclas de bacteriófagos de liberación controlada, mezclados, encapsulados, o ambos, con materiales diferentes se pueden combinar y mezclar con alimentos para animales, alimentos líquidos para animales, o bien ser administrados de otra manera a un animal.

35 [0056] El bacteriófago estabilizado, los bacteriófagos encapsulados o una mezcla de ambos fagos, encapsulado y estabilizado, también se puede proveer en forma de cápsula. Por "forma de cápsula", se entiende que los bacteriófagos estabilizados, fagos encapsulados, se proveen en una cápsula, por ejemplo una cápsula blanda, que se puede solubilizar en un entorno acuoso. La cápsula puede estar hecha de cualquier sustancia adecuada conocida en la técnica, por ejemplo, pero no de manera limitada, gelatina, goma laca, derivados de metacrilato, un sintético, u otros compuestos, y puede comprender componentes adicionales tales como estabilizadores y colorantes, como es bien conocido por un experto en la técnica.

45 [0057] Los bacteriófagos estabilizados o los bacteriófagos encapsulados se pueden proveer también en forma de pastilla. Por "forma de pastilla", se entiende que los fagos estabilizados o fagos encapsulados y estabilizados se proveen en una pastilla prensada que se disuelve en un entorno acuoso. La pastilla puede estar hecha de cualquier sustancia adecuada conocida en la técnica, por cualquier método adecuado conocido en la técnica. Por ejemplo, la pastilla puede comprender ligantes y otros componentes necesarios para la producción de una pastilla como conocido por un experto en la técnica. La pastilla puede ser una pastilla de liberación inmediata, donde los bacteriófagos se liberan en el alimento líquido tras la disolución de la pastilla, o puede comprender una composición de liberación temporizada, donde los bacteriófagos se liberan en un entorno acuoso en función del tiempo. Véase las patentes WO 02/45695; WO 03/051333; US 4,601,894; US 4,687,757, US 4,680,323, US 4,994,276, US 3,538,214, US (incorporadas aquí como referencia) para varios ejemplos de formulaciones de liberación temporizada utilizadas para permitir la liberación controlada temporizada de bacteriófagos en medios acuosos.

55 [0058] Unas formulaciones de pastilla pueden comprender por ejemplo un polímero hidrodinámico de embebido de fluidos pero sin limitarse a polímeros de ácido acrílico de reticulación derivada de alilsacarosa o allilpentaeritritol, incluyendo resinas de polímero acrílico insolubles en agua. Compuestos solos o una mezcla de compuestos de este grupo de polímeros incluyen por ejemplo, pero sin limitarse a éstos, Carbopol®971-P, Carbopol®934-P, Carbopol®974P y Carbopol®EX-507 (GF Goodrich, o cualquier otra marca comercialmente disponible con propiedades similares, se puede usar). Preferiblemente, los polímeros de ácido acrílico tienen una viscosidad de aproximadamente 3.000 centipoise hasta aproximadamente 45.000 centipoise en 0,5% p/p de concentración en agua a 25EC, y un gama de tamaño de partícula primario de aproximadamente 3,00 hasta aproximadamente 10,00 micras de diámetro, como determinado por un contador Coulter; derivados de almidón altamente reticulados o ligeramente reticulados por medio de epíclorhidrina o de oxícloruro de fósforo (POCl₃) o de trimetafosfato de sodio sea individualmente o bien en mezclas;

5 poliglucanos tales como amilosa, dextrano, succinatos de pululano y glutaratos con reticulaciones de diéster sea individualmente o bien en mezclas; poliglucanos reticulados de diéster como descritos en las patentes estadounidenses 3,208,994 y 3,042,667 (incorporadas aquí como referencia); resinas de poliácido reticuladas tales como, pero sin limitarse a éste, poliácido de potasio; y composiciones poliméricas reticuladas inflables en agua de polietilimina reticulada y/o de polialilamina reticulada.

10 [0059] Métodos de preparación, por ejemplo de Carbopol®934-P, de un polímero de ácido acrílico ligeramente reticulado con éter de polialilo de sacarosa con un promedio de 5,8 grupos alilo por cada molécula de sacarosa, se pueden encontrar en las patentes US 2,909,462, 3,033,754, 3,330,729, 3,458,622, 3,459,850; y 4,248,857. Cuando se usa Carbopol®971-P, la viscosidad preferida de 0,5% p/p de una solución acuosa es de 2.000 centipoise a 10.000 centipoise. Más preferiblemente, la viscosidad de 0,5% p/p de una solución acuosa es 3.000 centipoise a 8.000 centipoise. Cuando se usa Carbopol®934-P, la viscosidad preferida de 0,5% p/p de una solución acuosa es 20.000 centipoise a 60.000 centipoise, más preferiblemente, la viscosidad de 0,5% p/p de una solución acuosa es 30.000 centipoise a 45.000 centipoise

15 [0060] Derivados de almidón reticulado (reticulado por epíclorhidrina u oxícloruro de fósforo (POCl₃) o trimetafosfato de sodio) incluyen almidón de alto contenido en amilosa con varios grados de reticulación. Estos compuestos y sus métodos de preparación se conocen en la técnica, por ejemplo, de las patentes US 5,807,575 y US 5,456,921 (incorporadas aquí como referencia), y Rutenberg y Solarek (M.W. Rutenberg y D. Solarek, "Starch derivatives: production and uses" en Starch Chemistry and Technology, 2nd Edition, Chapter X, Pages 311-379, R.L. Whistler, J.N. BeMiller and E.F. Paschall, Academic Press, 1984; incorporado aquí como referencia).

20 [0061] Formulaciones de pastilla comprendiendo el polímero hidrodinámico de embebido de fluidos también se pueden formular con un agente que se expande rápidamente después de una exposición a un fluido, por ejemplo, un polímero de expansión rápida. Por ejemplo, este agente puede comprender polímeros reticulados hidrófilos capaces de realizar una rápida absorción capilar del agua y una expansión de volumen limitado. Ejemplos no limitativos de polímeros de expansión rápida incluyen: compuestos únicos o combinaciones derivadas de N-vinil-2-pirrolidona (PVP) reticulado seleccionado en un grupo de polivinilpirrolidona químicamente idéntica tal como Poliplasdone®XL, Polyplasdone®XL-10; Polyplasdone®INF-10 (International Specialty Products). Preferiblemente, el N-vinil-2-pirrolidona reticulado tiene un tamaño de partícula de aproximadamente 9 micras a aproximadamente 150 micras; y derivados de celulosa reticulados seleccionados en un grupo de compuestos hidrofílicos tales como la celulosa de carboximetilo reticulado (por ejemplo croscarmelosa), glicolato de almidón de sodio o una combinación de los mismos.

25 [0062] Las formulaciones de cápsulas o de pastillas pueden comprender uno o más bacteriófagos encapsulados de bacteriófago estabilizado o una mezcla de bacteriófagos encapsulados y estabilizados. Por ejemplo, la cápsula o pastilla puede comprender: bacteriófagos adsorbidos en una matriz; bacteriófagos adsorbidos en una matriz y encapsulados; bacteriófagos adsorbidos en una matriz e integrados en un soporte sólido; bacteriófagos adsorbidos en una matriz, integrados en un soporte sólido, y encapsulados; o mezclas de cualquiera de los anteriores.

30 [0063] Se entiende por "liberación controlada" o "liberación temporizada" que el agente administrado al animal se libera de la formulación en función del tiempo. Por ejemplo, uno o más bacteriófagos puede ser bacteriófagos estabilizados, bacteriófagos de bacteriófagos encapsulados provistos en forma de cápsulas, bacteriófagos provistos en forma de pastillas, bacteriófagos encapsulados, en cápsulas, en comprimidos, o una combinación de éstos, donde las formas encapsuladas, de cápsulas o de comprimidos de los bacteriófagos comprenden composiciones que liberan los bacteriófagos en diferentes niveles en el medio apropiado, por ejemplo un medio acuoso. Las composiciones del material de encapsulación, cápsulas o comprimidos, pueden incluir polímeros, ceras, geles, compuestos que embeben el agua, rechazan el agua, o ambos, ácidos grasos, azúcares, proteínas o materiales sintéticos, de manera a efectuar la liberación de un agente en la composición en una manera controlada. Varias composiciones de liberación controlada comprendiendo uno o más bacteriófagos se pueden utilizar de tal forma que los bacteriófagos se puedan liberar antes de la administración a un animal, en su paso a través del tracto digestivo del animal, o después de salir del animal.

35 [0064] Las composiciones antibacterianas de la presente invención exponen propiedades de almacenamiento deseables y se pueden utilizar en una variedad de aplicaciones. Por ejemplo, sin considerarlas en ningún modo de manera limitativa, las composiciones antibacterianas se pueden utilizar en aplicaciones humanas, veterinarias, acuícolas y agrícolas. Por ejemplo, bacteriófagos estabilizados, o bacteriófagos estabilizados integrados en un soporte sólido se pueden mezclar con un alimento para peces usado en aplicaciones de acuicultura, incluyendo el cultivo y mantenimiento de peces destinados a la alimentación y peces para usos decorativos como los peces tropicales. Además, las composiciones se pueden utilizar para el tratamiento de árboles y plantas, y aplicaciones medioambientales. Por ejemplo, la composición antibacteriana se puede mezclar con el alimento de ganado, pájaros, ave, animales domésticos y peces, para ayudar a reducir la propagación de bacterias objetivo. Las composiciones de fago de la presente invención se pueden mezclar con otros aditivos o suplementos aplicados a alimentos para animales como parte del régimen de alimentación diaria, según las necesidades. Se podría así evitar la proliferación de bacteriófagos, o de componentes de fagos, en los alimentos. Alternativamente, la adhesión de alimentos, bacteriófagos, o de ambos, se puede mejorar para proporcionar una mejor mezcla y entrega. En otro ejemplo, el material antibacteriano, solo o en combinación con un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable que no afectará la actividad o especificidad del

5 uno o más bacteriófagos, componentes de fagos o ambos, se puede usar en forma de medicamento por vía oral para humanos, mamíferos, o especies aviares. Los bacteriófagos encapsulados también se pueden usar en aplicaciones de terapia por fagos, incluyendo aplicaciones humanas, veterinarias, agrícolas. Además, un bacteriófago encapsulado se puede mezclar con alimentos para peces usados en aplicaciones de acuicultura, incluyendo el cultivo y el mantenimiento de peces destinados a la alimentación y peces para usos decorativos, tales como peces tropicales.

10 [0065] Por lo tanto, la presente invención proporciona una composición antibacteriana que comprende una o más cepas de bacteriófago, o uno o más componentes de fago, o ambos adsorbidos en una matriz, y opcionalmente, en forma de ejemplo de 0% a aproximadamente 95% (por peso) o cualquier porcentaje comprendido entre éstos, un portador farmacéuticamente aceptable, una crema, loción, gel, o una combinación de los mismos. La presente invención provee también una composición antibacteriana que comprende una o más cepas de bacteriófago, uno o más componentes de fago, o una combinación de los mismos, adsorbida en una matriz, encapsulada o presente en una formulación de liberación controlada. La formulación de bacteriófagos encapsulados o de liberación temporizada se puede dispersar en un portador farmacéuticamente aceptable, una crema, loción, gel, o una combinación de los mismos.

15 [0066] También se describe aquí un equipo comprendiendo un frasco estéril que comprende una composición antibacteriana, la cual comprende una o más cepas de bacteriófago adsorbidas en una matriz, y un frasco de agua estéril o un medio estéril para la disolución de la composición. Se describe también un equipo comprendiendo una composición antibacteriana, la composición antibacteriana comprendiendo una o más cepas de bacteriófago adsorbidas en una matriz y encapsuladas o bien dentro de una formulación de liberación temporizada, y un frasco de agua estéril o un medio estéril para la disolución de la composición.

20 [0067] La presente invención proporciona también un método para tratar una herida o una infección cutánea comprendiendo, la aplicación sobre la herida o infección cutánea de una composición antibacteriana o de una composición antibacteriana encapsulada tal y como se describe en la presente, comprendiendo una o más cepas de bacteriófagos adsorbidas en una matriz, un portador farmacéuticamente aceptable, una crema, loción, gel, o una combinación de los mismos. La presente invención proporciona también un método para tratar una lesión o una infección cutánea comprendiendo, la aplicación sobre la herida o infección cutánea de una composición antibacteriana como se describe en este caso, por ejemplo una composición antibacteriana encapsulada, o una composición antibacteriana de liberación temporizada, comprendiendo una o más cepas de bacteriófago de un portador farmacéuticamente aceptable, una crema, loción, gel, o una combinación de los mismos. Además, la composición antibacteriana de la presente invención se puede utilizar para tratar una infección bacteriana en un animal, incluyendo humanos. Tal tratamiento puede implicar la administración de la composición antibacteriana al animal por vía nasal o por vía oral, por ejemplo la composición se puede administrar en forma de inhalador en polvo, o como un aditivo en el alimento.

30 [0068] La presente invención proporciona también una composición comprendiendo un alimento para animales mezclado con una composición antibacteriana inmovilizada, una composición antibacteriana que ha sido encapsulada, o una formulación de composición antibacteriana de liberación temporizada o de liberación controlada, donde la composición comprende una o más cepas de bacteriófago. El alimento para animales puede ser seleccionado en el grupo que consiste en un alimento para pájaros, peces, cerdos, ganado, aves de corral, animales domésticos, y un alimento para la acuicultura.

35 [0069] La presente invención será además ilustrada en los siguientes ejemplos.

45 EJEMPLOS

Ejemplo 1: Aislamiento, amplificación y titulación de fago

50 [0070] Unos bacteriófagos fueron aislados de muestras de estiércol obtenidas de granjas lecheras y bovinas de Canadá. Muestras de abono fueron dispuestas para reaccionar con E. coli O157:H7 y se dispusieron en placas de agar. Todas las placas de fago obtenidas fueron aisladas y purificadas según protocolos estándar de purificación de fagos (Maniatis et al (1981) Molecular cloning: a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.).

55 [0071] Los fagos purificados y aislados como se indica en el ejemplo 1 fueron amplificados usando la cepa de aislamiento de E. coli O157: H7. Se mezcló el fago purificado con bacterias, se dejó reposar a temperatura ambiente durante 10 minutos, y se amplificó según protocolos estándar comúnmente usados en la técnica (Maniatis et al (1981) Molecular cloning: a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.). Muestras amplificadas en caldo LB fueron esterilizadas por filtración y usadas.

60 [0072] Concentraciones de soluciones de bacteriófagos fueron determinadas usando protocolos estándar de titulación de fago (Maniatis et al (1981) Molecular cloning: a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.). Unas preparaciones con fagos fueron diluidas con el LB, mezcladas e incubadas con E. coli O157:H7 durante 10 minutos y dispuestas sobre placas de agar. La concentración de fagos se determinó a partir del número de placas obtenidas en diluciones diferentes y multiplicando por el factor de dilución apropiado.

Ejemplo 2: Inmovilización de fagos

5 [0073] Fagos específicos E. coli O157:H7 P10 y R4, preparados como descrito en el ejemplo 1, fueron inmovilizados en tres matrices diferentes: leche en polvo (descremada), proteína de soja y peptona vegetal. La leche en polvo (Carnation) y proteína de soja (Supro) se obtuvieron en tiendas locales de alimentación. Se usaron protocolos idénticos para todos los materiales.

10 [0074] 50 g de polvo (leche en polvo, proteína de soja, o peptona vegetal) se colocaron en un plato de vidrio. Unos fagos en solución se pulverizaron uniformemente sobre cada matriz en polvo. Varios títulos de fagos, en una gama de 10^5 pfu/g a 10^9 pfu/g, se usaron con leche en polvo, cada uno exhibiendo resultados similares. El polvo de fago fue mezclado y secado a 37°C durante 2 horas, o hasta secado completo. La composición de bacteriófago resultante se trituró en polvo fino, con tamaños de partícula en el intervalo de 50-600 μm y un tamaño de partícula medio de 200 μm .
15 0,5 gramos de cada composición de bacteriófago en polvo fueron resuspendidos en 10 ml de agua de ósmosis inversa (RO) y se evaluó la recuperación de fagos testados. La leche en polvo, proteína de soja en polvo, o peptona vegetal, en ausencia de bacteriófagos se usaron en forma de control. Se observó una ligera aglutinación de la composición de bacteriófagos comprendiendo proteína de soja cuando se resuspendía en el agua RO. Los resultados para composiciones de bacteriófagos preparadas mediante el uso del polvo de leche seco en forma de matriz se presentan en la Figura 1. Los resultados para las composiciones de bacteriófagos preparadas mediante el uso de proteína de soja
20 en forma de matriz se presentan en la Figura 2, y los de la peptona vegetal se muestran en la Figura 4.

[0075] Para los fagos inmovilizados en leche en polvo, los resultados muestran que los fagos se pueden recuperar de la composición de bacteriófagos y no se observó ninguna pérdida de actividad. La Figura 1 muestra que el título de fago obtenido después de la inmovilización ("Después") es similar a la cantidad de fagos añadida al polvo ("Antes").
25 Resultados similares fueron observados para composiciones bacteriófagos comprendiendo la proteína de soja (Figura 2 Después - fago inmovilizado; Antes - cantidad de fagos añadida a la matriz). Para los fagos inmovilizados en la proteína de soja, una reducción ligera en la recuperación de fagos se observó, la cual se puede deber a la aglutinación de la proteína de soja después de la adición en agua RO. De nuevo, como se muestra en la Figura 4, el título de fagos obtenido después de la inmovilización ("Después") es similar a la cantidad de fagos añadida al polvo ("Antes") mediante
30 el uso de peptona vegetal en forma de matriz.

[0076] Estos resultados también muestran que los fagos inmovilizados se liberan fácilmente de una matriz cuando se introducen en un medio acuoso.

35 Ejemplo 3: Encapsulación de composiciones de bacteriófagos

[0077] Unas composiciones de bacteriófagos se preparan como descrito en el ejemplo 2, y se proveen en forma de microcápsulas o microesferas. Generalmente, las microcápsulas se producen incorporando la composición de bacteriófagos en un soporte sólido, comprendiendo la proteína de soja, o el polvo de leche (otros soportes sólidos
40 incluyen microesferas, material a base de celulosa, material a base de carbohidratos, manitol, sorbitol, proteína de lactosuero, proteína algal, proteína de célula única, caseína, gelatina, goma laca) con un tamaño de partícula de aproximadamente 1mm. Microesferas se producen triturando la preparación de fago estabilizado y mezclando esta última en fusión lipídica para producir microesferas de aproximadamente 0,01mm hasta aproximadamente 1mm.

45 [0078] Las microcápsulas son después encapsuladas por cualquier método adecuado, por ejemplo, por pulverización de disco giratorio, revestimiento por suspensión en aire usando un revestidor de pulverización en lecho fluido, un bacteriófago también se puede revestir usando el método descrito en US 2003/0109025 (que se incorpora aquí en su totalidad en forma de referencia), o mezclándolo en una solución orgánica comprendiendo un solvente, por ejemplo pero
50 sin limitarse a éstos, cloruro de metileno, acetato de metilo, acetato de etilo, cetona de éter metílico, acetona, alcoholes y otros solventes o combinaciones de los mismos, conteniendo la sustancia de revestimiento.

[0079] En resumen, para la pulverización de disco giratorio, las composiciones de fago se dispersan sea en una solución en alta fusión o solución orgánica conteniendo la sustancia de revestimiento. La dispersión se dispone al centro de un disco giratorio y el material se pulveriza al salir de la periferia del disco. El material encapsulado se colecta usando un
55 separador ciclónico o un lecho de almidón de alimento modificado. Durante el revestimiento por suspensión en aire, se usa un revestidor de pulverización en lecho fluido. Unas partículas sólidas se elevan por medio de una corriente de aire que induce una corriente cíclica regular que pasa por una boquilla que pulveriza la sustancia de revestimiento. Una vez pulverizadas, las partículas se elevan por medio de la corriente de aire durante el secado del revestimiento. Las partículas se difunden a través de la boquilla hasta aplicar un revestimiento uniforme. Las partículas se difunden hasta
60 que obtener el espesor de película deseado. Las microesferas son encapsuladas mediante el uso de la pulverización de disco giratorio.

[0080] Cada una de las microcápsulas y microesferas se encapsulan con cada una de las siguientes sustancias de revestimiento: ácido palmítico, ácido esteárico, goma laca sobre-revestida con ácido palmítico, ácido esteárico, HPMCP sobre-revestido con ácido palmítico, ácido esteárico, CAP sobre-revestido con ácido palmítico, ácido esteárico,
65

HPMCAS sobre-revestido con ácido palmítico, ácido esteárico, PVAP sobre-revestido con ácido palmítico, ácido esteárico, y metacrilato sobre-revestido con ácido palmítico, ácido esteárico. Otros ácidos grasos también se puede usar para el sobre-revestimiento.

5 [0081] Una vez completada la operación de revestimiento, las partículas de fago estabilizadas encapsuladas se colectan y se almacenan en recipientes herméticos.

10 [0082] El efecto de encapsulación en el título de composiciones de bacteriófagos se evalúa mediante la determinación de la actividad de la preparación de fagos estabilizada antes ("Antes") y después ("Después") de la encapsulación. Para este análisis, los bacteriófagos encapsulados son resuspendidos y triturados con una mezcladora. Los bacteriófagos estabilizados, encapsulados y resuspendidos son mezclados o tratados con el mecanismo de liberación apropiado, por ejemplo por alternancia de pH, o exposición a un medio acuoso, para quebrar las partículas encapsuladas y liberar los bacteriófagos. Para la liberación de bacteriófagos por mezcla, se mezcla 0,5 g de fagos estabilizados y encapsulados con 45,5 ml de medio de resuspensión (caldo LB o agua RO), y se añade 250µl de agente antiespumante para impedir la formación de espuma durante la trituración.

15 [0083] Los resultados demuestran que se puede recuperar los bacteriófagos de una composición de bacteriófagos encapsulados, y la encapsulación no desactiva el fago inmovilizado.

20 **Ejemplo 4: Estabilidad y liberación de bacteriófagos encapsulados**

[0084] Los fagos se encapsulan como descrito en el ejemplo 3. La liberación de fagos estabilizados y encapsulados durante una ruptura química o física se evalúa de la siguiente manera: 0,5 g de fago estabilizado y encapsulado se mezcla con 45,5 ml de medio de resuspensión (caldo LB o agua RO). Se utiliza 250 µl de agente antiespumante para impedir la formación de espuma durante la trituración. Una muestra de control de fagos estabilizados y encapsulados se prepara como se ha descrito anteriormente, pero no se somete a trituración, para determinar la lixiviación no-específica de bacteriófagos encapsulados en el medio de resuspensión.

30 [0085] La estabilidad de los bacteriófagos encapsulados en pH bajo se examinó también. Después de la resuspensión (como se describe más arriba), los fagos estabilizados encapsulados se incuban durante 30 o 60 min en pH 2,15, neutralizados en pH 7,0 usando NaOH, se Trituran después usando una mezcladora; otra muestra (de control) se resuspende y se Tritura inmediatamente. Tanto las muestras de control como las de prueba se esterilizan por filtración usando un filtro de jeringa de 0,45 µm antes del uso.

35 [0086] Los resultados demuestran que los bacteriófagos se pueden liberar después de la ruptura de partículas de bacteriófagos encapsulados. Además, estos resultados muestran que los bacteriófagos encapsulados se pueden exponer a un pH de 2,15 durante periodo de tiempo prolongado, con poca o ninguna pérdida en la actividad (título). Los resultados para bacteriófagos no encapsulados y no estabilizados corresponden a los resultados de Jepson y March (2004, Vaccine, 22:2413-2419), donde una pérdida importante de viabilidad de los bacteriófagos se observó después de sólo 5 minutos con un pH inferior a pH 2.2. Esta pérdida de actividad se impide por encapsulación de los bacteriófagos tal y como se describe en la presente invención.

Ejemplo 5: Estabilidad de fago inmovilizado

45 [0087] Se inmovilizaron bacteriófagos en una matriz, en este caso el polvo de leche como se describe en el ejemplo 2 y el material se almacenaron a temperatura ambiente (RT) o bien a 4°C (4C) en recipientes herméticos. Unas muestras fueron obtenidas en diferentes momentos, y se determinaron unos títulos de fago, durante un periodo de 10 meses. La concentración de fago inicial era de 3×10^6 pfu/g.

50 [0088] La Figura 3 muestra que los fagos inmovilizados (composición de bacteriófagos) son estables a temperatura ambiente como a 4°C durante al menos 131 días (4 meses y medio), y es estable durante al menos 311 días (10 meses) a 4°C. La adición de un desecante, o el almacenamiento de los bacteriófagos en un entorno desecado puede aumentar también la viabilidad de la composición de bacteriófagos.

55 Ejemplo 6: Fago inmovilizado en crema y loción

[0089] La viabilidad de fagos inmovilizados (composición de bacteriófagos) incorporados en una loción o crema se investigó también.

60 [0090] Dos gramos de loción (loción para manos Vaseline) o crema (crema GlicoMed) se dispusieron en una caja Petri estéril. La pfu/g deseada de fago inmovilizado, P10 y R26, se añadió a la loción o crema y se mezcló minuciosamente. Bacterias fueron esparcidas en placas LB agar y se dejaron crecer a 37°C durante dos a tres horas para formar un lecho uniforme. Dos cm² de trozos de papel filtrante, dos por placa, fueron dispuestos sobre el lecho y la loción comprendiendo bacteriófagos, o la crema comprendiendo bacteriófagos fueron cada uno esparcida sobre un papel filtrante. Partes alícuotas de la loción o crema sin fago (de control) se extendieron sobre el otro papel filtrante para determinar si la

loción o crema tenía propiedades antimicrobianas. Una gota de loción o de crema conteniendo bacteriófagos se también se dispuso directamente sobre el lecho bacteriano. Se evaluaron varias diluciones de bacteriófagos en cada loción o crema. Las placas fueron incubadas durante toda la noche a 37°C. Cada tratamiento se indicó por un "Sí" o un "No", en función de la presencia o de la ausencia de la zona de inhibición, respectivamente, y los resultados se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1: Eficacia de composiciones de bacteriófagos (fagos inmovilizados) en loción o crema de manos.

Material	Técnica	Fago	1,00E+07	1,00E+06	1,00E+05	1,00E+04
Loción	Filtro	P10	Sí	Sí	Sí	Sí (5/6)
Loción	Gota	P10	Sí	Sí	Sí	Sí (1/3)
Loción	Filtro	-	No	No	No	No
Crema	Filtro	P10	Sí	Sí	Sí	Sí
Crema	Gota	P10	Sí	Sí	Sí	Sí
Crema	Filtro	-	No	No	No	No
Material	Técnica	Fago	1,00E+07	1,00E+06	1,00E+05	1,00E+04
Loción	Filtro	R26	Sí	Sí	Sí (2/3)	Sí (1/3)
Loción	Gota	R26	Sí	Sí	Sí	No
Loción	Filtro	-	No	No	No	No
Crema	Filtro	R26	Sí	Sí	Sí	Sí
Crema	Gota	R26	Sí	Sí	Sí	Sí
Crema	Filtro	-	No	No	No	No

[0091] Una zona de inhibición de crecimiento bacteriano fue observada en la que la actividad de fagos se podía recuperar. Tanto la loción como la crema conteniendo fagos inmovilizados y encapsulados muestran una actividad antibacteriana, mientras que la loción o la crema sola no muestra ninguna inhibición de crecimiento bacteriano. Estos resultados indican que las composiciones de bacteriófagos preparadas según la presente invención se pueden mezclar en preparaciones para una loción y crema usadas en forma de lociones antibacterianas, lubricantes, geles o cremas.

[0092] Se observa una estabilidad mejorada de los bacteriófagos para bacteriófagos inmovilizados en cremas.

Ejemplo 7: Entrega de bacteriófagos activos

[0093] Unos bacteriófagos específicos *E. coli* 0157 se encapsulan como descrito previamente en el ejemplo 3. Los fagos encapsulados son después mezclados con otros suplementos y añadidos a alimentos para animales en una cantidad de aproximadamente 1 a 50g por animal por dosis. El alimento es después suministrado al animal una vez al día durante 5 días antes de ser sacrificado. Alternativamente, se da una dosis de mantenimiento al animal cada 1 a 3 días.

[0094] El análisis del estiércol del animal revela una reducción del *E. coli* 0157 en el animal, lo que indica que los bacteriófagos activos se liberan en el intestino del animal.

[0095] Todas las citaciones se han incorporado a la presente en forma de referencia.

[0096] La presente invención se ha descrito con respecto a una o más formas de realización. No obstante, será aparente para personas expertas en la técnica que se puede efectuar un número de variaciones y modificaciones sin alejarse del ámbito de la invención tal y como se define en las reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Composición antibacteriana comprendiendo una o más cepas de bacteriófago adsorbidas en una matriz seca, donde la matriz se selecciona en el grupo que consiste en polvo de leche desnatada, proteína de soja y peptona vegetal.
2. Composición antibacteriana según la reivindicación 1, donde la matriz es la proteína de soja.
- 10 3. Composición antibacteriana según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el bacteriófago es eficaz contra una bacteria objetivo, donde la bacteria objetivo es un bacteria de *d'Escherichia coli*, *Streptococci*, *Humicola*, *Salmonella*, *Campylobacter*, *Listeria*, *Staphylococcus*, *Pasteurella*, *Mycobacterium*, *Hemophilus*, *Helicobacter*, *Mycobacterium*, *Mycoplasma*, *Nesseria*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Proteus*, *Bacteroides*, *Pseudomonas*, *Borrelia*, *Citrobacter*, *Propionobacter*, *Treponema*, *Chlamydia*, *Trichomonas*, *Gonorrhoea*, *Clostridium*, *Shigella*, *Enterococcus*, *Leptospirex* o *Bacillii* comprendiendo *Bacillus anthracis*
- 15 4. Composición antibacteriana según la reivindicación 3, donde la bacteria objetivo es *Escherichia coli*.
5. Composición antibacteriana según la reivindicación 4, donde la bacteria objetivo es *E. coli* O157:H7.
- 20 6. Composición antibacteriana según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la composición antibacteriana se reviste con una sustancia que aumenta la resistencia de fagos a las tensiones físico-químicas de su entorno.
- 25 7. Composición antibacteriana según la reivindicación 6, donde la sustancia es un polímero para la liberación controlada, preferiblemente un polímero a base de metacrilato.
8. Composición antibacteriana según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la composición antibacteriana se formula en una cápsula.
- 30 9. Composición comprendiendo un alimento para animales, mezclada con una composición antibacteriana según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
- 35 10. Composición antibacteriana según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 o la composición de la reivindicación 9 para su uso en el tratamiento de una infección bacteriana en un animal.
- 40 11. Composición antibacteriana según las reivindicaciones 1 a 9 para el uso según la reivindicación 10, donde el animal es un ser humano; aves de corral, como el pollo o el pavo, etc; el cerdo; todos los animales ungulados como caballos, ganado, cabras, y ovejas, etc; o animales domésticos como los gatos y los perros.
- 45 12. Método para la producción de una composición antibacteriana según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 comprendiendo,
 la adsorción de uno o más bacteriófagos, en una solución acuosa sobre una matriz seca para producir una composición estabilizada; y
 el secado de la composición estabilizada para producir la composición antibacteriana; y
 donde la matriz se selecciona en el grupo que consiste en polvo de leche desnatada, proteína de soja y peptona vegetal.
13. Método de producción de una composición antibacteriana según la reivindicación 12, donde la matriz permanece en un estado seco.

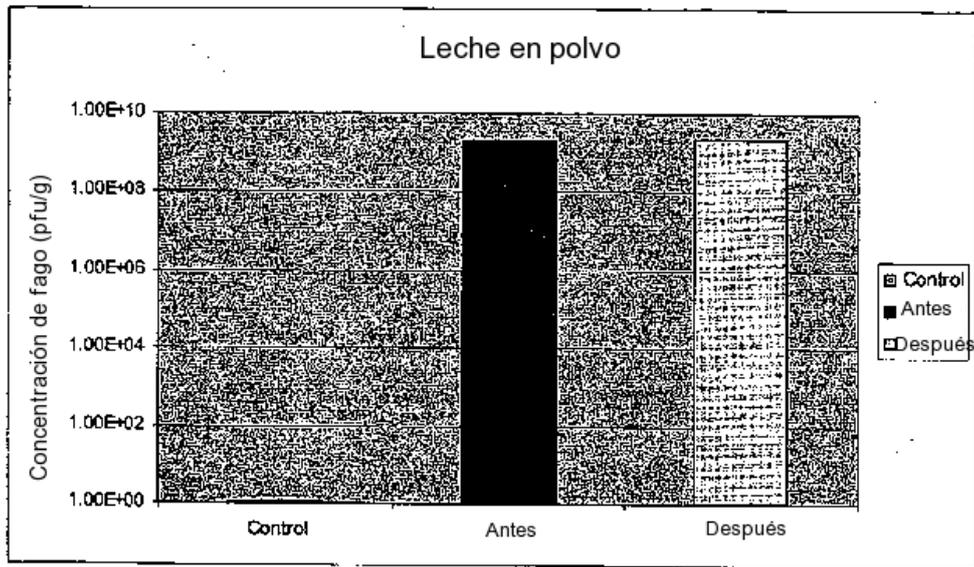


FIG. 1

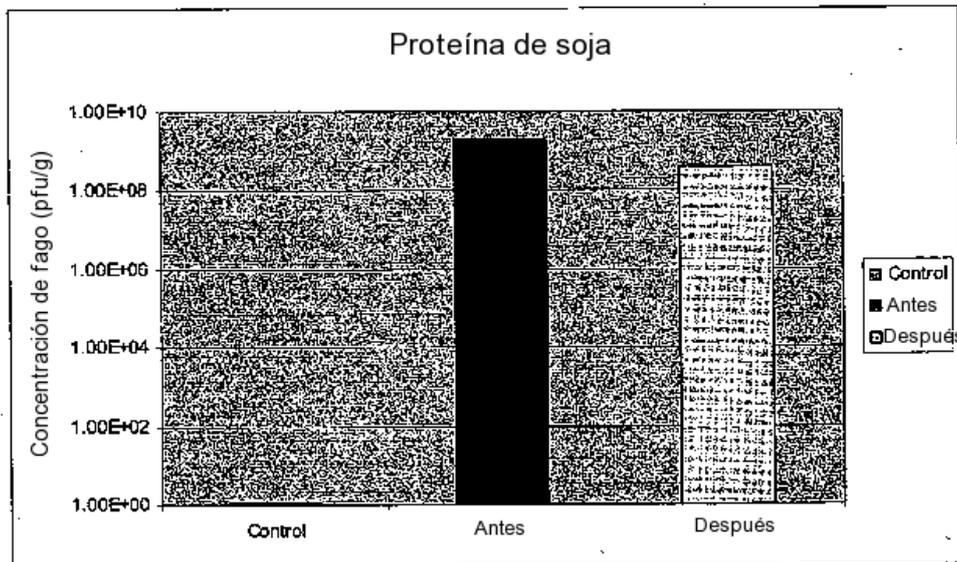


FIG. 2

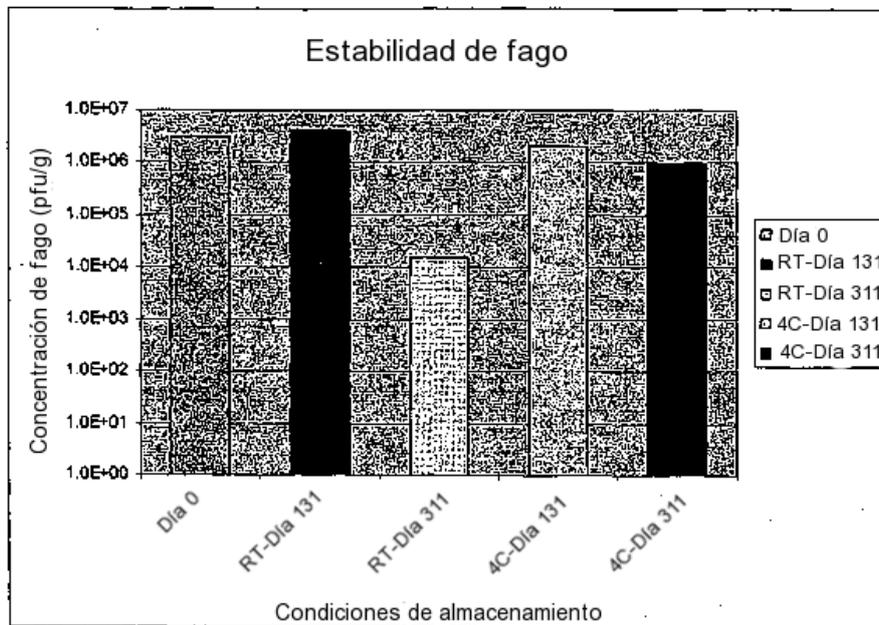


FIG. 3

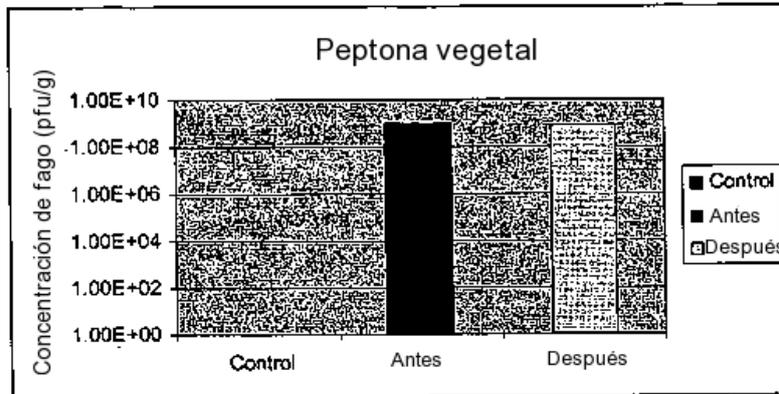


Figura 4