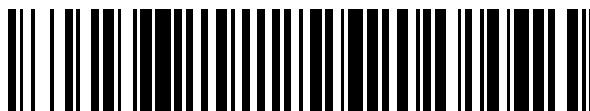


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 401 162**

51 Int. Cl.:

C12N 7/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.10.2007 E 07827735 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.12.2012 EP 2195418**

54 Título: **Procedimiento y sistema para la purificación a escala industrial de bacteriófagos destinados para terapia con bacteriófagos**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.04.2013

73 Titular/es:

**PTC PHAGE TECHNOLOGY CENTER GMBH
(100.0%)
Im Kompetenzzentrum Bio-Security,
Siemensstrasse 42
59199 Bönen , DE**

72 Inventor/es:

**LEHNHERR, HANSJÖRG y
BARTSCH, REINHARD**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 401 162 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

Procedimiento y sistema para la purificación a escala industrial de bacteriófagos destinados para terapia con bacteriófagos

5 La presente invención se refiere a un procedimiento y a un sistema para la purificación a escala industrial de bacteriófagos destinados para terapia con bacteriófagos.

10 Como adaptación al entorno selectivo con el que se encuentran, muchas bacterias patógenas se han vuelto resistentes a una amplia gama de antibióticos [9]. Por lo tanto, existe una alta demanda de formas alternativas de tratar tales bacterias resistentes. La terapia con bacteriófagos es una de las alternativas en consideración hoy en día. A nivel mundial, el interés en la terapia con bacteriófagos se encuentra en alza, después de que este haya estado latente en el mundo occidental durante casi 60 años [6]. Las aplicaciones anteriores de la terapia con bacteriófagos se han visto obstaculizadas por la incapacidad para purificar las preparaciones de bacteriófagos con el fin de retirar las exo- y endotoxinas, así como para preservar la actividad biológica de los bacteriófagos [8]. Los procedimientos actuales para producir y purificar bacteriófagos se derivan de procedimientos de laboratorio y no son adecuados para preparaciones a gran escala. La presente invención se refiere a la producción y a la purificación a gran escala de preparaciones de bacteriófagos con el fin de combatir enfermedades infecciosas, en especial, pero no exclusivamente, cuando las bacterias que dan lugar a estas enfermedades son resistentes a los antibióticos. Esta describe un procedimiento para producir, a escala industrial, unas composiciones de bacteriófagos que están sumamente concentradas y libres de cualquier resto tóxico (residuos bacterianos, endo- y exotoxinas bacterianas), que son el producto secundario del procedimiento de producción.

20 El uso de bacteriófagos para combatir las infecciones bacterianas ya lo ha propuesto d'Hérelle, el codescubridor de los bacteriófagos [2]. No obstante, a pesar de que parte de las aplicaciones tempranas mostraron ser exitosas, otras no lo fueron, debido principalmente, de manera retrospectiva, a la falta de conocimiento acerca de las interacciones entre los bacteriófagos y sus bacterias huésped [11]. Con la aparición del campo de los antibióticos, se abandonó todo intento de establecer bacteriófagos como agentes antimicrobianos en la medicina occidental. Por otro lado, los bacteriófagos se usaron ampliamente en la antigua Unión Soviética y en Polonia, pero desafortunadamente, la mayor parte de los estudios orientales que muestran la eficacia de la terapia con bacteriófagos no cumplen las normas de nuestros actuales sistemas médicos. No obstante, los bacteriófagos sirvieron como herramientas de estudio principales en el campo de la biología molecular tanto en Oriente como en Occidente y, por lo tanto, se han investigado de manera intensiva en muchos laboratorios a lo largo de los últimos ochenta años [1]. El conocimiento adquirido a partir de esta investigación básica debería mostrarse ahora útil para preparar unas preparaciones de bacteriófagos mejoradas que cumplan los estrictos criterios que requieren las aplicaciones tanto en animales como en seres humanos [7, 11].

35 En la presente invención, los bacteriófagos se amplifican en fermentadores a gran escala o, como alternativa, sobre un medio semisólido (véase la solicitud de patente de los Estados Unidos 2007/001001), produciendo cientos de litros de solución enriquecida en bacteriófagos, pero contaminada con residuos bacterianos, toxinas y componentes del medio de crecimiento bacteriano. Una solución de este tipo se pasa a continuación a través de una serie de filtros con el fin de separar los bacteriófagos de estas sustancias contaminantes. En el procedimiento, el medio de crecimiento bacteriano que contiene los bacteriófagos se sustituye por una solución adecuada para el envasado y el almacenamiento a largo plazo de los bacteriófagos.

40 La presente invención puede usarse para purificar cualquier bacteriófago a gran escala, lo que da como resultado unas preparaciones que pueden usarse directamente como agentes desinfectantes o productos médicos para su uso tanto en animales como en seres humanos.

45 Los bacteriófagos son omnipresentes en el entorno. Por lo tanto, los expertos en la materia conocen procedimientos para aislar y enriquecer nuevos bacteriófagos con las gamas de huéspedes deseadas [4, 5, 10]. En teoría, es posible aislar bacteriófagos que crezcan sobre cualquier patógeno bacteriano conocido. No obstante, no todos los bacteriófagos encontrados en la naturaleza son adecuados también para las aplicaciones prácticas. Una caracterización genética precisa de los fagos aislados será esencial para seleccionar aquellos que destruyan sus bacterias huésped con una alta eficacia y que no transfieran rasgo no deseado alguno [8]. La identificación de aquellos bacteriófagos que son los más adecuados para una tarea específica constituye una destreza técnica en sí misma (véase, por ejemplo, el documento WO 2004/004495). Asimismo, existen diversos procedimientos para mejorar los aislados naturales o para modificar sus propiedades, tal como se describe en las patentes de los Estados Unidos 5811093 o 7087226.

55 Habitualmente, los bacteriófagos se hacen crecer en cultivos líquidos usando unos fermentadores de diversos tamaños [3]. Como alternativa, se puede hacer que los bacteriófagos crezcan también sobre un medio semisólido, según se divulga en la solicitud de patente de los Estados Unidos 2007/0010001. No obstante, cualquiera de estos dos procedimientos crea unos volúmenes igualmente grandes de soluciones que contienen fagos líquidas que necesitan purificarse para su uso adicional. Se han descrito diferentes procedimientos para la purificación de las partículas de tipo virus y los virus, en especial de bacteriófagos, por ejemplo, en los documentos EP 1736 538 A, EP 1780 269 A y por Smrekar y col. [12]. El procedimiento de laboratorio convencional actual, tal como se perfila a

continuación, sigue un protocolo de múltiples etapas que requiere mucho trabajo y, por lo tanto, es adecuado solo para volúmenes más pequeños de líquido.

1. La solución que contiene bacteriófagos se aclara por centrifugación.
- 5 2. Se añade polietilenglicol al líquido con el fin de hacer que precipiten los bacteriófagos. El polietilenglicol es un agente reticulante reversible no específico, que hace que precipite la totalidad de las proteínas presentes en la solución. El procedimiento de precipitación toma aproximadamente 12-18 horas a 4 grados centígrados.
3. Precipitación de los bacteriófagos por centrifugación.
4. Resuspensión de los bacteriófagos precipitados en la cantidad mínima de un líquido adecuado. Durante la presente etapa, habitualmente los bacteriófagos se concentran aproximadamente 50 veces.
- 10 5. Esta solución se estratifica cuidadosamente a continuación sobre un gradiente en densidad de CsCl₂ y se procesa por centrifugación en una ultracentrífuga. En la presente etapa, los bacteriófagos se separan de otras proteínas e impurezas de acuerdo con su densidad específica. Este procedimiento toma aproximadamente 24 horas.
6. Aislamiento de los bacteriófagos usando una jeringuilla con una aguja de punta afilada. Este procedimiento requiere un pulso firme y un cierto grado de destreza técnica experimental.
- 15 7. Retirada de la solución de CsCl₂ por diálisis (de 12 a 24 horas) frente a un tampón de elección.

A pesar de que este procedimiento da como resultado unas preparaciones de bacteriófagos sumamente puras, parece obvio que este no puede aplicarse para purificar bacteriófagos a escala industrial. El procedimiento no solo consume mucho tiempo, sino que requiere una cantidad desmesurada de trabajo manual y tampoco es rentable.

20 En Georgia y en la antigua Unión Soviética, los bacteriófagos no se purificaron hasta este punto [3]. Habitualmente, las soluciones de bacteriófagos solo se esterilizaron por filtración y, a continuación, se envasaron directamente para las aplicaciones. No obstante, un procedimiento de este tipo no retira un gran número de proteínas bacterianas, entre las mismas toxinas y casi la totalidad de los componentes del medio de crecimiento bacteriano, lo que hace que tales soluciones no sean adecuadas para las presentes aplicaciones.

25 Los anteriores objetivos y ventajas, así como otros, de la invención, según será evidente a partir de la siguiente descripción, se obtienen con un procedimiento y un sistema tal como se divulga, respectivamente, en las reivindicaciones independientes. Las realizaciones preferentes y variaciones no triviales de la presente invención son la materia objeto de las reivindicaciones dependientes.

30 La presente invención se describirá mejor mediante algunas realizaciones preferentes de la misma, que se proporcionan como ejemplo no limitante, con referencia a los dibujos adjuntos, en los que:

- la figura 1 es una vista esquemática de una realización preferente del sistema al que puede aplicarse el procedimiento de la presente invención;
- la figura 2 es una vista esquemática de la primera parte de otra realización preferente del sistema al que puede aplicarse el procedimiento de la presente invención; y
- 35 - la figura 3 es una vista esquemática de la segunda parte de otra realización preferente del sistema al que puede aplicarse el procedimiento de la presente invención.

40 Las realizaciones preferentes del procedimiento y del sistema de la presente invención se muestran y se describen con referencia a las figuras. Será inmediatamente obvio que pueden hacerse numerosas variaciones y modificaciones (por ejemplo, en relación con la forma, los tamaños y las partes con funcionalidad equivalente) a lo que se ha descrito, sin apartarse del alcance de la invención según se muestra a partir de las reivindicaciones adjuntas.

45 La presente invención se refiere a un procedimiento de purificación novedoso que se basa en una serie de etapas de filtración que no requieren una entrada manual, es adecuado por lo tanto para la producción industrial a gran escala y da como resultado unas composiciones de bacteriófagos que son sumamente puras y se encuentran esencialmente libres de cualquier resto tóxico residual. Estas preparaciones de bacteriófagos purificadas pueden envasarse entonces de cualquier forma adecuada para sus aplicaciones agrícolas o clínicas apropiadas.

50 Como promedio, los bacteriófagos tienen un diámetro de 50 a 100 nanómetros y una longitud de 100 a 300 nanómetros. Están compuestos por unas proteínas que forman una cubierta protectora alrededor del material genético. Esta cubierta protectora contiene unas estructuras delicadas a escala nanométrica, las cuales, cuando se rompen, dan como resultado la pérdida de la actividad biológica de los bacteriófagos. Ha de tenerse, por lo tanto, un cuidado especial con el fin de no dañar los bacteriófagos durante el procedimiento de purificación.

El procedimiento de producción y purificación puede dividirse en las siguientes etapas.

Etapa 1. Amplificación de bacteriófagos.

55 Los expertos en la materia conocen procedimientos para producir grandes números de bacteriófagos. Normalmente, se permite que las bacterias huésped crezcan en un fermentador 1 con el fin de alcanzar unas densidades celulares elevadas. Otro fermentador 3 que contiene tales bacterias suministradas por una unidad de bombeo 2 se siembra a

continuación con una cantidad alta o baja de bacteriófagos (la flecha A en la figura 1) dependiendo de si debería tener lugar una amplificación de única etapa o una amplificación de múltiples etapas. Como alternativa, se puede hacer que los bacteriófagos crezcan también sobre un medio semisólido, según se divulga en la solicitud de patente de los Estados Unidos 2007/0010001. Dependiendo del bacteriófago que va a amplificarse y la bacteria huésped que se está usando, cualquiera de estos procedimientos da como resultado unos volúmenes igualmente grandes de preparaciones de bacteriófagos que contienen de 10^9 a 10^{12} bacteriófagos por mililitro. En la presente invención, se propone una preparación que usa dos fermentadores 1, 3, lo que será inmediatamente ventajoso cuando haya de purificarse más de un bacteriófago.

Etapa 2. Prepurificación.

El fin de esta primera etapa de purificación es retirar los contaminantes que sean más grandes que los bacteriófagos procedentes de las preparaciones de bacteriófagos. Después de la etapa de amplificación, que da como resultado la destrucción de la mayor parte de las bacterias huésped, las preparaciones de bacteriófagos están contaminadas con células bacterianas intactas, fragmentos de pared celular bacteriana, lípidos bacterianos en vesículas de membrana de diversos tamaños, proteínas bacterianas, entre las mismas exo- y endotoxinas y diversos componentes del medio de crecimiento bacteriano (sales, azúcares, proteínas). Esta solución es rica en sólidos y sumamente viscosa. El esquema de purificación del estado de la técnica usando precipitación de polietilenglicol y centrifugación por densidad (tal como se ha descrito anteriormente) requiere mucho trabajo y no es adecuado para volúmenes grandes. Las técnicas de filtración tradicionales, como la filtración estéril convencional, que usa unos filtros con poros de 200 nm, son muy poco eficientes, debido a que estos se obstruyen con rapidez cuando se encuentran ante tales soluciones sumamente viscosas. Como resultado se forman grandes agregados, los cuales atrapan los bacteriófagos y reducen drásticamente el rendimiento. En la presente invención se describe el uso de un sistema de filtración de rotación de flujo cruzado con dos unidades de filtración 5, 9, pero en su lugar podría (o podrían) usarse una única unidad de filtración 9 (o más de dos unidades de filtración), no obstante, con un riesgo aumentado de aglutinamiento. La preparación de bacteriófagos se bombea, con una unidad de bombeo 4, directamente desde el fermentador 3 hasta la unidad de filtración 5, tal como se muestra en la figura 1, y usando bajas presiones (1 bar (100 kPa)) la unidad de bombeo 4 hace que pase la solución a través de un filtro 5 de Teflón, que tiene un tamaño de poro de ≈ 1.000 nanómetros y rota con una velocidad de 400 rotaciones por minuto. Las partículas pequeñas, entre las mismas los bacteriófagos, pasan a través de la membrana como filtrado, mientras que las células bacterianas intactas, los fragmentos de pared celular bacteriana grandes y los lípidos bacterianos en grandes vesículas de membrana quedan atrás en el material retenido. La baja presión y la rotación de los discos del filtro 5 evitan que las partículas grandes obstruyan los poros del filtro. Las fuerzas de cizalla que tienen lugar durante una etapa de filtración de este tipo son relativamente bajas y no afectan a la viabilidad de los bacteriófagos.

El filtrado de la primera unidad de filtración 5 sirve entonces directamente como la alimentación para una segunda unidad de filtración 9, alimentándose mediante una unidad de bombeo 6. Esta segunda unidad de filtración 9 tiene una preparación equivalente, pero el tamaño de poro del filtro de Teflón se reduce a ≈ 200 nanómetros. De nuevo, los bacteriófagos, las proteínas bacterianas, los azúcares y las sales pasan este segundo filtro, mientras que los residuos bacterianos residuales quedan retenidos en el material retenido. Las fuerzas de cizalla que tienen lugar durante esta segunda etapa de filtración son ya considerables, pero los experimentos mostraron que más de un 95 % de los bacteriófagos logran pasar intactos un filtro de este tipo. Podrían usarse otros sistemas de filtro, pero con un riesgo aumentado de aglutinamiento y, por lo tanto, un menor rendimiento.

Etapa 3. Purificación.

El filtrado procedente de la prepurificación se usa como alimentación para una tercera unidad de filtración 7 a través de una unidad de bombeo 10. El fin de la presente etapa es limpiar las preparaciones de bacteriófagos de los contaminantes que sean más pequeños que los bacteriófagos. Esto se consigue haciendo pasar la solución a través de un filtro 7 con un tamaño de poro de ≈ 60 nanómetros. Los bacteriófagos se mantienen en solución en el material retenido, mientras que las proteínas pequeñas, entre las mismas las toxinas, los azúcares y las sales pasan el filtro y pueden descartarse y recogerse en un depósito colector 20. En una filtración convencional, se da poca importancia al destino del material retenido, debido a que el filtrado es, en general, el producto. En el presente caso, no obstante, los bacteriófagos se retienen en el material retenido y ha de tenerse un cuidado especial con el fin de evitar que los mismos se aglutinen o se inactiven mediante las fuerzas de cizalla. Los sistemas de filtración de flujo cruzado del estado de la técnica no son adecuados para un procedimiento de este tipo, debido a que las fuerzas de cizalla que se crean mediante un flujo a través de un filtro con un tamaño de poro de ≈ 60 nanómetros se encuentran en un intervalo suficiente para inactivar los bacteriófagos. Por lo tanto, en la presente invención se describe una forma más suave de filtración. Usando muy baja presión (0,2 bares (20 kPa)), las preparaciones de bacteriófagos se hacen pasar a través de un filtro 7 cerámico que gira lentamente (200 rotaciones por min). La baja presión y la rotación del filtro 7 evitan que los bacteriófagos se coagulen sobre la superficie del filtro.

Una vez que se ha procesado un lote de la preparación de fagos, la bomba de alimentación 10 se apaga y una segunda bomba 42 hace que pase una solución de limpieza, almacenada en un recipiente 40, a través de un grupo de válvulas 11 y al interior del filtro 7. La presente etapa de lavado con una solución de limpieza garantiza que ningún componente del medio de crecimiento bacteriano original se encuentre presente en el producto final, a la vez que se siguen manteniendo los bacteriófagos en solución en el material retenido.

Etapa 4. Elución.

Después de la limpieza, una tercera bomba 16 en la parte posterior de la unidad de filtración 7 se activa y bombea una solución de almacenamiento, contenida en un recipiente 18, a través de un grupo de válvulas 44, en el sentido opuesto (el sentido de "CONTRAFLUJO" en la figura 1), usando una presión de impulso. Por lo demás, se usan las mismas condiciones que durante la etapa 3. En esta solución de almacenamiento, los bacteriófagos sumamente puros se eluyen así a partir del filtro 7 de rotación. La presión de impulso se usa para retirar, de los poros y de la superficie del filtro, los depósitos potenciales. El uso de unas cantidades de solución de almacenamiento apropiadas para la elución proporciona un medio sencillo y seguro de ajuste de la concentración final de los bacteriófagos y garantiza, por lo tanto, un producto final de alta calidad normalizado.

- 5
- 10 Las soluciones de bacteriófagos purificados que salen del filtro 7 pasan a través del grupo de válvulas 11 y se bombean, a través de una cuarta unidad de bombeo 28 (tal unidad de bombeo 28 es opcional, a saber, su función puede realizarse, por ejemplo, por la unidad de bombeo 42), al interior de un recipiente 14 de almacenamiento intermedio. Desde el recipiente 14 de almacenamiento intermedio, las soluciones de bacteriófagos pueden envasarse entonces directamente, o bien en forma líquida o bien secadas después de la liofilización, siguiendo un
- 15 flujo de trabajo normal (la flecha B en la figura 1).

El procedimiento de filtración ideal se describe en la figura 1, con un flujo de trabajo completamente automatizado, lo que da como resultado unos bacteriófagos sumamente purificados, esencialmente sin pérdidas durante el procedimiento. No obstante, dependiendo de las condiciones de producción, podría ser necesario separar la etapa de filtración de "reflujo" del resto del procedimiento, con el fin de obtener más flexibilidad. Por lo tanto, las figuras 2 y

20 3 muestran una segunda realización del sistema de la invención. Las mismas referencias de designación se mantienen para las partes con la misma o idéntica funcionalidad.

La diferencia principal entre el sistema de la figura 1 y el sistema de las figuras 2 y 3 es que hay dos filtros rotatorios 7A, 7B idénticos pero separados, uno de los cuales realiza la operación designada con "FLUJO" en la figura 2 y el otro de los cuales realiza la operación designada con "CONTRAFLUJO" en la figura 3; mientras que el filtro rotatorio

25 7A en la figura 2 está conectado con el depósito colector 20 para desechos, el filtro rotatorio 7B en la figura 3 está conectado con el recipiente 18 con la solución de almacenamiento para el contraflujo, y con el depósito de almacenamiento intermedio 14 para la solución final de bacteriófagos purificados.

Como otra realización posible del sistema de la invención, derivada de nuevo de las figuras 2 y 3, el filtro rotatorio 7 podría ser de nuevo solo uno, como en la primera realización, que se muestra en la figura 1, pero este podría funcionar por separado en dos etapas diferentes, una similar a la de la figura 2, en la que la solución se mueve a lo largo del sentido de "FLUJO", y otra similar a la de la figura 3, en la que la solución se mueve a lo largo del sentido de "CONTRAFLUJO", realizando obviamente las dos etapas separadas que se describen anteriormente para estos dos sentidos y etapas de funcionamiento.

30

Especialmente cuando han de procesarse de forma simultánea grupos enteros de fermentadores, podría ser necesario regenerar con rapidez el sistema de filtro. Mediante la retirada de la unidad de filtro rotatorio 7A, 7B, el enjuague y la inserción de una nueva unidad de filtro, la totalidad del sistema de filtración tal como se perfila en la figura 2 se encontrará disponible para procesar sin demora el contenido de un segundo fermentador. La unidad de filtro 7A, 7B retirada, que contiene los bacteriófagos purificados, puede procesarse entonces en una unidad de elución separada, tal como se perfila en la figura 3. El sistema de filtración tal como se perfila en la figura 1 se diseñará con el fin de permitir una elección entre las dos realizaciones de la invención.

35 40

Los sistemas que se muestran en las figuras obviamente son solo ejemplos de los diferentes sistemas que pueden usarse para poner en práctica el procedimiento de la invención. Por ejemplo, los filtros 5 y 9 podrían ser unos filtros rotatorios de flujo cruzado tal como se muestra en las figuras, o podrían ser unos filtros tradicionales adaptados para realizar las mismas funciones de filtración. Además, tales filtros podrían ser uno, dos o más, de acuerdo con la tarea de filtración deseada.

45

Además, el depósito de almacenamiento intermedio 14 podría ser el que se muestra en la figura 1, en el que la solución de bacteriófagos purificados se somete a un vórtice o rotación adaptado para obtener una distribución homogénea de bacteriófagos. Como alternativa, el depósito de almacenamiento intermedio 14 podría ser el tradicional que se muestra en la figura 3 (que puede usarse obviamente también en el sistema de la figura 1) en el que la solución final de bacteriófagos purificados no se somete a vórtice o rotación.

50

Lista de referencias

1. Calendar, R. 2006. The Bacteriophages. Oxford University Press, NY.
2. d'Hérelle, F. 1926. The Bacteriophage and its Behavior. Williams y Wilkins, Baltimore, Md.
3. Hauler, T. 2003. Gesund durch Viren. Ein Ausweg aus der Antibiotika-Krise. Piper Verlag GmbH, Munched.
- 5 4. Hoff, J. C. y C. H. Drake. 1962. Simplified method for isolation and purification of bacteriophages. J. Bacteriol. 83:929-92b.
5. Hook, A. E., D. Beard, A. R. Taylor, D. G. Sharp y J. W. Beard. 1946. Isolation wand characterization of the T2 bacteriophage of Escherichia coli. J. Biol. Chem. 165:241-258.
- 10 6. Kutter, E. 1997. Phage therapy: Bacteriophage as antibiotics. <http://www.evergreen.edu/user/T4/PhageTherapy/Phagethea.html>.
7. Lehnherr, H. 2006. Bacteriophage P1, páginas 351-364. In R. Calendar (ed.), The Bacteriophages. Oxford University Press, NY.
8. Merrill, C. R., D. Scholl y S. Adhya. 2006. Phage Therapy, páginas 725-742. In R. Calendar (ed.), The Bacteriophages. Oxford University Press, NY.
- 15 9. Neu, H. C. 1992. The crisis in antibiotic resistance. Science 257:1064-1073.
10. Putnam, F. W., L. M. Kozloff y J. C. Neil. 1949. Biochemical studies of virus reproduction. I. Purification and properties of Escherichia coli bacteriophage T6. J. Biol. Chem. 179:303-323.
11. Summers, W. C. 2001. Bacteriophage therapy. Annu. Rev. Microbiol. 55:437-451.
- 20 12. Smrekar, F. Ciringier, M., Peterka, M., Podgornik, A., Strancar, A. 2007. Purification and concentration of bacteriophage T chromatographic supports. J. Chrom. B. 861, 2:177-180

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para una purificación a escala industrial de bacteriófagos destinados para terapia con bacteriófagos, que comprende las etapas de:
 - 5 - hacer crecer bacterias huésped de dichos bacteriófagos;
 - mezclar bacterias y bacteriófagos con el fin de permitir que los bacteriófagos crezcan;
 - realizar una primera filtración por rotación de una preparación de bacterias y bacteriófagos mezclados, dejando que los bacteriófagos pasen a su través;
 - 10 - filtrar por rotación por primera vez, en la que los bacteriófagos permanecen en solución en un material retenido;
 - realizar una segunda filtración por rotación con contraflujo con respecto a dicha primera filtración por rotación, en la que los bacteriófagos se someten a elución; teniendo lugar dicha segunda filtración por rotación con contraflujo a bajas presiones de 0,2 bares (20 kPa) y con una rotación lenta de 200 rotaciones por minuto; y
 - almacenar la solución de bacteriófagos purificados.
2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado porque** además comprende, después de dicha primera etapa de filtración, una segunda etapa de filtración de la preparación de bacterias y bacteriófagos mezclados.
- 15 3. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, **caracterizado porque** dicha primera etapa de filtración y/o dicha segunda etapa de filtración son etapas de filtración rotatorias de flujo cruzado, realizándose dicha primera etapa de filtración mediante el uso de unos poros cuyo tamaño es igual a 1.000 nanómetros, realizándose dicha segunda etapa de filtración mediante el uso de unos poros cuyo tamaño es igual a 200 nanómetros.
- 20 4. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado porque**, en dicha etapa de almacenamiento, la solución de bacteriófagos se somete a un vórtice o una rotación adaptados para obtener una distribución homogénea de bacteriófagos.
5. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado porque** además comprende la etapa de envasado de la solución de bacteriófagos en forma líquida.
- 25 6. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado porque** además comprende la etapa de envasado de la solución de bacteriófagos en forma seca después de liofilización.
7. Sistema para una purificación a escala industrial de bacteriófagos destinados para terapia con bacteriófagos, que comprende:
 - 30 - un primer fermentador (1), preferentemente de un tipo quimioestático de alta densidad celular, adaptado para realizar un crecimiento continuo de las bacterias huésped;
 - un segundo fermentador (3) conectado con dicho primer fermentador (1) y adaptado para realizar una mezcla de bacterias y bacteriófagos con el fin de permitir que los bacteriófagos crezcan;

caracterizado porque además comprende:

 - 35 - una unidad de filtración (5) conectada con dicho segundo fermentador (3) y adaptada para filtrar dicha preparación de bacterias y bacteriófagos dejando que los bacteriófagos pasen a su través; y
 - una unidad de filtración rotatoria (7) conectada con dicha unidad de filtración (5) adaptada para realizar una primera filtración por rotación, en la que los bacteriófagos permanecen en solución en el material retenido, y una segunda filtración por rotación con contraflujo con respecto a dicha primera filtración por rotación, en la que los bacteriófagos se someten a elución, teniendo lugar dicha segunda filtración por rotación con contraflujo a bajas presiones de 0,2 bares (20 kPa) y con una rotación lenta de 200 rotaciones por minuto.
- 40 8. Sistema de acuerdo con la reivindicación 7, **caracterizado porque** además comprende:
 - una primera unidad de bombeo (42) conectada con dicha unidad de filtración rotatoria (7) y adaptada para bombear una solución de elución a través de la unidad de filtración rotatoria (7), reteniendo los bacteriófagos en el material retenido;
 - 45 - un recipiente de almacenamiento intermedio (14) para la solución de bacteriófagos purificados; y
 - una segunda unidad de bombeo (16) conectada con dicha unidad de filtración rotatoria (7) y adaptada para bombear una solución de limpieza a través de dicha unidad de filtración rotatoria (7) al interior de dicho recipiente de almacenamiento intermedio (14).
9. Sistema de acuerdo con la reivindicación 7, **caracterizado porque** además comprende:
 - 50 - una primera unidad de bombeo (10) conectada con dicha unidad de filtración rotatoria (7) y adaptada para bombear una solución de elución de dichos bacteriófagos en el material retenido;
 - un recipiente de almacenamiento intermedio (14) para la solución de bacteriófagos purificados;
 - una segunda unidad de bombeo (42) conectada con dicha unidad de filtración rotatoria (7) y con dicho recipiente intermedio (14) y adaptada para bombear una solución de limpieza al interior de dicha unidad de filtración rotatoria (7);

- una tercera unidad de bombeo (16) conectada con dicha unidad de filtración rotatoria (7) y adaptada para bombear al interior de dicha solución de bacteriófagos, una solución de contraflujo, y para bombear a continuación ambas soluciones al interior de dicha unidad de filtración rotatoria (7) para el contraflujo en un sentido opuesto; y
- 5 - opcionalmente, una cuarta unidad de bombeo (28) conectada con dicha unidad de filtración rotatoria (7) y adaptada para bombear la solución final de bacteriófagos limpios al interior de dicho recipiente de almacenamiento intermedio (14).
- 10 10. Sistema de acuerdo con la reivindicación 9, **caracterizado porque**, en dicho recipiente de almacenamiento intermedio (14), la solución obtenida se somete a vórtice o rotación para obtener una distribución homogénea y purificada de bacteriófagos.
11. Sistema de acuerdo con la reivindicación 7, **caracterizado porque** dicha unidad de filtración (5) tiene unos poros cuyo tamaño es igual a 1.000 nanómetros, y dicho sistema comprende una unidad de filtración (9) adicional que contiene unos poros cuyo tamaño es igual a 200 nanómetros.
- 15 12. Sistema de acuerdo con la reivindicación 11, **caracterizado porque** dicha unidad de filtración (5) y dicha unidad de filtración (9) adicional son del tipo rotatorio.
- 20 13. Sistema de acuerdo con la reivindicación 7, **caracterizado porque** dicha unidad de filtración rotatoria (7) se divide en dos unidades de filtración rotatoria (7A, 7B) separadas idénticas, estando la primera (7A) de dichas unidades de filtración rotatoria (7A, 7B) separadas conectada con dicha unidad de filtración (5) y estando adaptada para realizar una primera filtración por rotación, en la que los bacteriófagos permanecen en solución en el material retenido, estando la segunda (7B) de dichas unidades de filtración rotatoria (7A, 7B) separadas conectada con dicha primera unidad de filtración rotatoria (7A) y estando adaptada para realizar una segunda filtración por rotación con contraflujo con respecto a dicha primera unidad de filtración rotatoria (7A), en la que los bacteriófagos se someten a elución y la solución obtenida se somete a vórtice o rotación para obtener una distribución homogénea y purificada de bacteriófagos.
- 25 14. Sistema de acuerdo con la reivindicación 7, **caracterizado porque** dicha unidad de filtración rotatoria (7) está adaptada para realizar por primera vez una primera filtración por rotación, en la que los bacteriófagos permanecen en solución en el material retenido, y posteriormente está adaptada para realizar por separado una segunda filtración por rotación con contraflujo con respecto a dicha primera filtración por rotación, en la que los bacteriófagos se someten a elución y la solución obtenida se somete a vórtice o rotación para obtener una distribución homogénea y purificada de bacteriófagos.
- 30 15. Sistema de acuerdo con la reivindicación 7, **caracterizado porque** dicha unidad de filtración rotatoria (7) está adaptada para desmontarse de uno de dichos sistemas y dicha unidad de filtración rotatoria (7) desmontada está adaptada para insertarse en otro de dichos sistemas.

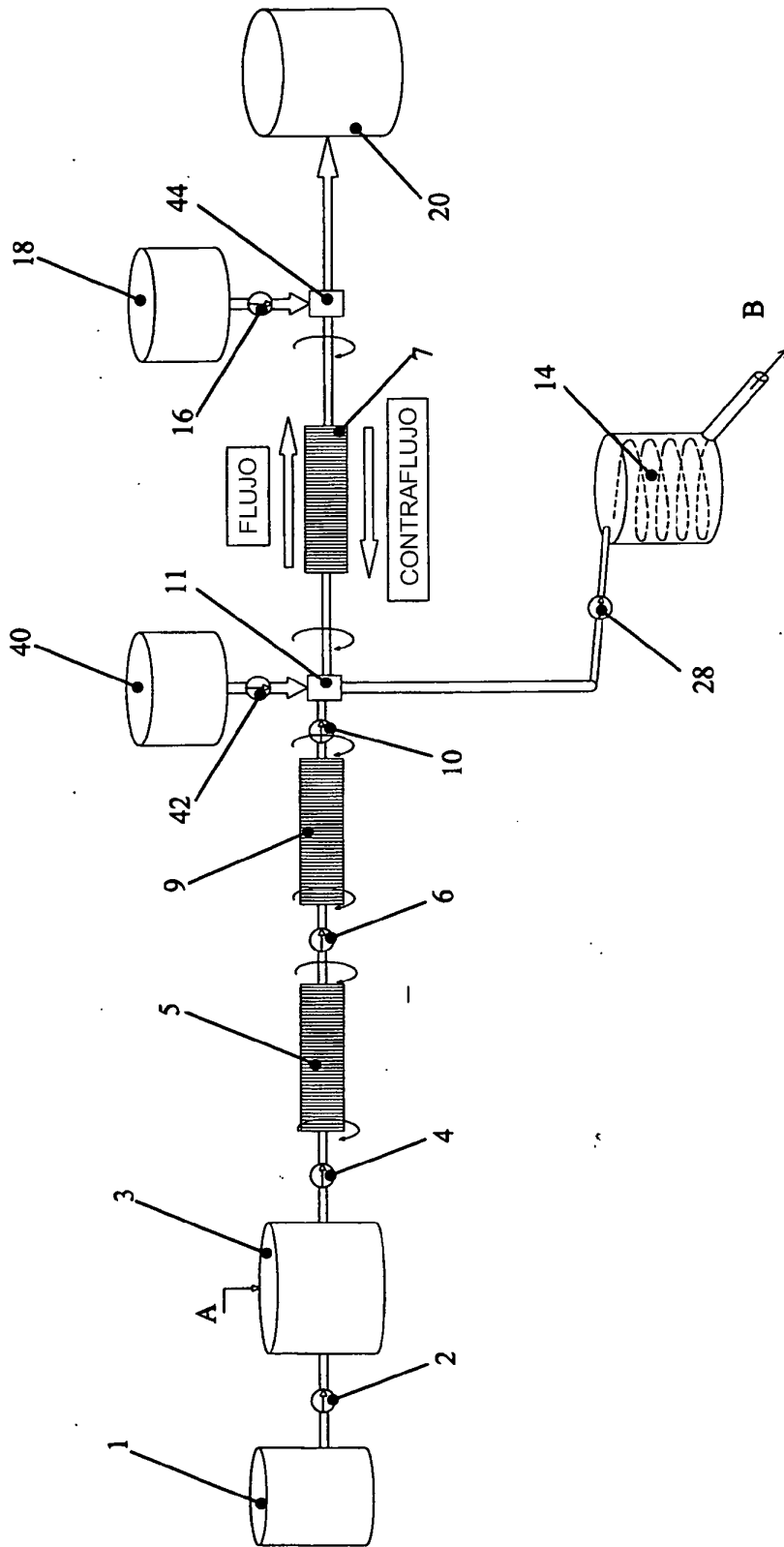


Fig. 1

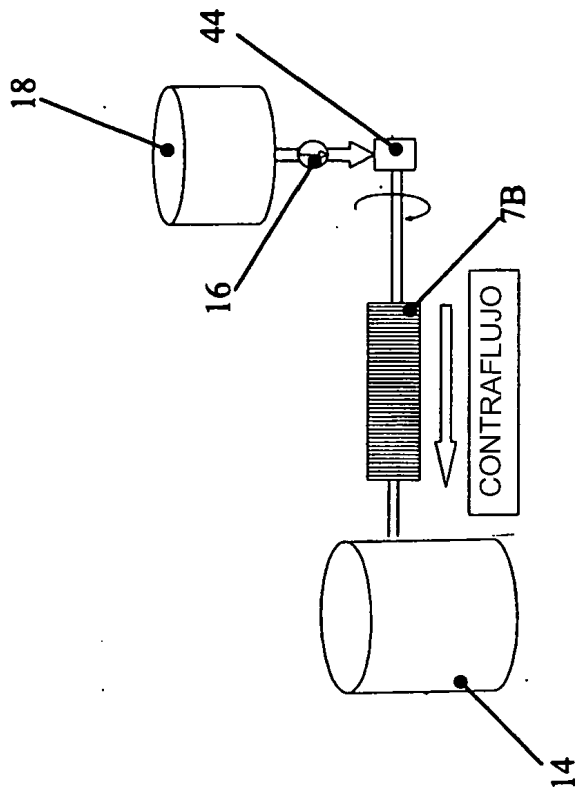


Fig. 3