

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 619 521**

51 Int. Cl.:

C12N 7/00 (2006.01)

A61K 35/13 (2015.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.10.2009 PCT/PL2009/050032**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.05.2010 WO2010050833**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.10.2009 E 09775370 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.12.2016 EP 2340304**

54 Título: **Un método para producir una forma farmacológicamente estable de preparaciones activas liofilizadas de bacteriófagos purificados**

30 Prioridad:

29.10.2008 PL 38638108

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

26.06.2017

73 Titular/es:

**INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DO
WIADCZALNEJ POLSKIEJ AKADEMII NAUK
(100.0%)**

**Ul. Rudolfa Weigla 12
53-114 Wrocław, PL**

72 Inventor/es:

**ZUZIAK, EWA;
GAMIAN, ANDRZEJ;
GÓRSKI, ANDRZEJ y
LIPINSKI, TOMASZ**

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

Observaciones:

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

ES 2 619 521 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

Un método para producir una forma farmacológicamente estable de preparaciones activas liofilizadas de bacteriófagos purificados

5 El objeto de la presente invención es un método para producir una forma estable farmacológica de preparaciones de bacteriófagos purificadas y liofilizadas con una estabilidad y actividad antibacteriana aumentadas.

10 El número continuamente creciente de bacterias patógenas resistentes a los antibióticos actualmente en uso obliga a una investigación sobre medios antibacterianos alternativos [1]. Se cree que los bacteriófagos, debido a su método de funcionamiento, son un candidato potencialmente ideal para nuevos factores bactericidas eficaces. El interés aumentado en la terapia de bacteriófagos y/o proteínas de fagos aislados se basa en su eficacia para tratar infecciones que no son tratables con antibióticos, lo que ha sido demostrado en diversos lugares [2, 3]. Los bacteriófagos plantean una serie de ventajas sobre los antibióticos convencionales, principalmente su especificidad que facilita la destrucción de bacterias patógenas sin destruir simbióticos debido a que el equilibrio microbiológico delicado del organismo no se ve afectado [2, 4-7]. La concentración de bacteriófagos en los fluidos corporales del paciente no disminuye después de la administración, sino que se autorregula. El número fagos crece de forma exponencial en presencia de bacterias y cae rápidamente en su ausencia. Hasta la fecha, no se han apreciado efectos secundarios significativos durante la terapia de fagos, que puede ser usada en pacientes alérgicos a antibióticos. Los fagos apropiadamente escogidos y seleccionados pueden ser usados en la profilaxis antiabacteriana, que incluye la higienización, es decir, de centros hospitalarios. La selección de bacterias resistentes se observa también muchos menos frecuentemente de lo que es a menudo el caso. Además, una vez que una bacteria demuestra resistencia a un fago dado, se puede seleccionar otro fago para infectarla. Finalmente, pueden ser usadas junto con antibióticos y en terapia combinada. La introducción de la terapia de fagos en un uso médico ampliamente extendido requiere el diseño de métodos de estampar rápidamente fagos apropiados; verificar la replicación de fagos y su penetración en el organismo humano, la liberación de toxinas por las bacterias destruidas que pueden conducir a un choque séptico; separar fagos del organismo [8, 9] y, finalmente, obtener preparaciones terapéuticas altamente eficaces. En una solicitud de patente previa, se diseñaron procedimientos eficaces para cultivar bacteriófagos y para su purificación, lo que hizo posible producir grandes cantidades de fagos puros, con una elevada valoración de actividad, sin contaminación con endotoxinas ni otros componentes bacterianos que harían imposible una serie de usos [10]. Una investigación adicional condujo a observaciones originales que son el objeto de la presente solicitud, relativas a la producción de formas farmacológicas de preparaciones de bacteriófagos activas liofilizadas.

35 Hasta la fecha, las preparaciones de bacteriófagos en la forma de lisados de fagos purificados se obtuvieron y almacenaron en forma líquida. Esta forma farmacológica, aunque es relativamente estable para lisados, en preparaciones purificadas da lugar a una rápida disminución de la actividad bacteriolítica. Una desventaja de las preparaciones de fagos líquidas es que son un producto farmacéutico inconveniente para almacenar y usar, los fagos purificados adecuados para fines terapéuticos son inestables, las técnicas de fraccionamiento de partes alícuotas son caras y complicadas y el producto requiere un espacio de almacenamiento muy refrigerado. La forma más conveniente de un fármaco es un producto sólido, es decir, un polvo, comprimido, granulado o liofilizado. Este producto deshidratado es más fácil de producir y es más barato y más fácil de almacenar y usar. Se requieren también estabilidad y elevados niveles de actividad para la preparación.

45 El objeto de la presente invención es un método para obtener formas estables de preparaciones de bacteriófagos purificadas y liofilizadas con una estabilidad y actividad antibacteriana aumentadas, en el que una preparación de bacteriófagos obtenida a partir de un lisado bacteriano y purificada en un sistema de membranas de ultrafiltración selectivamente permeables es estabilizada a través de la adición de extracto en etanol de 2-4% de masa bacteriana a partir de una cepa Bifidobacterium, y la preparación de bacteriófagos es liofilizada bajo condiciones estériles.

50 La presente invención resuelve un cierto número de los problemas anteriormente mencionados y consiste en primer lugar en la liofilización de fagos purificados en presencia en un factor estabilizante, a saber, extracto en etanol de 2-4% de masa bacteriana a partir de una cepa de Bifidobacterium.

55 La liofilización es un método de almacenamiento extendido, es decir, de microflora que facilita la viabilidad a largo plazo [11]. La eficacia de la liofilización de microorganismos está influenciada por una serie de factores como la cepa de microorganismo, forma de la célula, la fase y la velocidad de proliferación, la composición del medio, la composición celular, el contenido de agua y lípidos, las velocidades de enfriamiento y calentamiento y la duración del almacenamiento [12]. La composición del medio en el que se ponen en suspensión los microorganismos antes de la congelación es extremadamente importante, ya que la adición de sustancias apropiadas asegura la viabilidad a continuación de la liofilización. Inicialmente, se usaron glicerol y dimetilsulfóxido para proteger las células microbianas contra la destrucción provocada por la congelación [13, 14]. Son conocidas sustancias protectoras, de peso molecular tanto bajo como elevado [15], que penetran rápidamente en la célula (a los 30 minutos de introducción), que incluyen metanol, etanol, etilenglicol, propilenglicol, dimetilformamida, metilacetamida y dimetilsulfóxido; así como los que penetran lentamente como glicol y los que no penetran como glucosa, trehalosa, dextrano, hidroximetil-amilosa, manitol, sorbitol, albúmina, gelatina, otras proteínas, polietilenglicol o poli(alcohol

vinílico). Como un estabilizador y protector se usa sorbitol en microbiología a concentraciones de 1-36% (habitualmente 9%). Dependiendo de los microorganismos, se observa una eficacia variable del tratamiento con sorbitol. El uso de manitol al 5% en organismos produce mejores efectos que el tratamiento con sorbitol. La glucosa se usa a concentraciones de 1-18% (habitualmente 4%). La viabilidad bacteriana aumentada ha sido apreciada previamente mediante el uso de glucosa durante un almacenamiento a -20 °C. Esto se ha mostrado que es eficaz para bacteriófagos T4 (junto con sacarosa), *Enterobacter aerogenes*, levaduras y esporas de *Puccinia*. El inconveniente de la mayoría de los estabilizadores anteriores es que los mismos son líquidos o tóxicos (es decir, metanol), o inmunógenos (es decir, albúmina, gelatina) o sustancias sintéticas habitualmente caras de producir o muy reactivas (es decir, glucosa). Sin embargo, la trehalosa es un protector natural, se produce en células de plantas y levaduras de panadería (*Saccharomyces cerevisiae*) y es el único disacárido que contiene dos moléculas de agua en su retículo cristalino es químicamente inerte. Se usa a concentraciones de 5-19% (promedio 10%) como un protector para diversos virus, *Lactobacillus bulgaricus* y otras microfloras [12]. Jepson C.D. et al, Vaccine, Butterworth Scientific Guildford, GB, 2004, vol. 22, nº 19, páginas 2413-2419 se refieren a preparaciones de fagos que comprenden la generación de una preparación de fagos mediante lisis bacteriana, la adición de los agentes crioprotectores trehalosa o leche desnatada en seco y liofilización. El documento WO 03/067991 describe la generación de una preparación de fagos a partir de un lisado bacteriano, la adición de leche desnatada y la liofilización bajo condiciones estériles. Darsavelidze M.A. et al., "Izvestiya Akademii Nauk Gruzinskoi Ssr Seriya Biologicheskaya, XX, RU, 1990, vol. 16, nº 5, páginas 330-335 describen la generación de preparaciones de bacteriófagos estables, purificadas y liofilizadas, generadas mediante la lisis de bacterias, adición de un medio que contiene sacarosa y gelatina como estabilizadores y posterior liofilización. La base de datos WPI semana 19975 de Thomson Scientific, London, GB; AN 1997-050313 y RU 2.059.723 C1 (Farm Animals Physiolog Biochem Feed Inst), de 10 de mayo de 1996 describe la producción de una preparación de fagos obtenida mediante lisis bacteriana de una cepa probiótica (*Streptococcus*), la adición de harina de maíz, cribas de cebada y sulfato de amonio y una posterior liofilización.

Las preparaciones de fagos pueden ser mantenidas en forma liofilizada pero, debido a la pérdida de actividad durante la liofilización, se recomienda usar estabilizadores. La presente invención se refiere a un método para estabilizar fagos liofilizados con extracto en etanol de 2-4% de masa bacteriana de una cepa de *Bifidobacterium*.

En primer lugar, se obtienen preparaciones de fagos usando métodos conocidos, como el uso de detergente y membranas de ultrafiltración [10] o una columna de polilisina inmovilizada [16], si el detergente desactiva los bacteriófagos. Durante la investigación sobre las condiciones para estabilizar los fagos durante la liofilización, se mostró que entre los estabilizadores usados, que incluyen trehalosa, glucosa, sorbitol o extracto probiótico, los mejores resultados se obtuvieron con trehalosa y el extracto en etanol de masa bacteriana de una cepa *Bifidobacterium*.

Un método según la presente invención, por lo tanto, adolece de inconvenientes conocidos del almacenamiento de fagos lisados. El almacenamiento de bacteriófagos T4, Im11 o K1 durante dos meses en forma liofilizada con trehalosa o un extracto en etanol de masa bacteriana de una cepa de *Bifidobacterium* a diversas concentraciones garantiza el mantenimiento de los niveles de actividad. Después de seis meses de almacenamiento, la actividad de los fagos liofilizados disminuyó solamente desde $8,0 \times 10^7$ pfu/ml hasta $4,0 \times 10^6$ pfu/ml. Este nivel de actividad no disminuyó y se mantuvo inalterado cuando el liofilizado se mantuvo en viales bajo vacío. La actividad de los fagos alcanzó el valor más elevado con un contenido de trehalosa o extracto de 2-4% y disminuía a concentraciones superiores de trehalosa, extracto u otros estabilizadores, lo que significa que es óptima una concentración de estabilizador de 2%. Se obtuvieron títulos inferiores en glucosa al 1%. Los títulos más bajos se obtuvieron usando sorbitol. Aunque los cuatro reactivos estabilizaron los fagos mientras se mantenía su actividad, el mejor resultado se produjo mediante el uso de trehalosa o extracto en etanol de 2-4% de masa bacteriana a partir de una cepa de *Bifidobacterium*. La novedad de la presente invención consiste en la liofilización y almacenamiento de fagos bajo vacío en presencia de un extracto en etanol de 2-4% de masa bacteriana de una cepa de *Bifidobacterium* como estabilizador, que es una mejora considerable sobre los métodos previamente patentados de almacenar preparaciones de fagos. El método para producir formas farmacológicas es sencillo y requiere una etapa, a saber, una solución de moléculas de fagos purificadas se complementa con extracto en etanol de 2-4% de masa bacteriana de una cepa de *Bifidobacterium* a una concentración de 2 °C, se congela y se liofiliza y se divide en partes en viales bajo vacío. La presente invención se refiere a una nueva forma farmacéutica de fagos, diferente a cualquiera patentada hasta ahora.

La mayoría de las soluciones patentadas se refiere a fagos almacenados como lisados celulares, estables en forma líquida o liofilizados deshidratados y no requieren estabilizadores adiciones. El lisado constituye un estabilizador natural para los fagos, incluso durante la liofilización. La necesidad de estabilizar surge a continuación de la purificación de un lisado, cuando el nivel de actividad cae enormemente. La no evidencia de la presente solución se basa en el hecho de que no se refiere a lisados, por lo que no necesita un estabilizador, sino que se limita a fagos purificados, cuyas formas sólidas o líquidas requieren un estabilizador. El segundo aspecto de esta solución se refiere a la liofilización bajo vacío con división en partes simultánea en viales. El envasado a vacío en viales se usa para el almacenamiento a largo plazo de bacterias y se usa preferentemente para el almacenamiento en capas múltiples de fagos purificados en presencia de un estabilizador. La liofilización a vacío en viales es de fase única, sencilla, barata, eficaz y fácil. El tercer elemento de la presente solución es el uso de un extracto en etanol de 2-4%

de masa bacteriana de una cepa de *Bifidobacterium* como estabilizador. Un método simple para prepararla comprende el uso de un extracto en etanol de masa bacteriana de una cepa de *Bifidobacterium* tratada con amoníaco para separar ácidos grasos, en que la fase acuosa secada se usa como un estabilizador de fagos a continuación de la evaporación. Las cepas de bifidobacterias son probióticos conocidos usados en la industria alimentaria, cultivadas en medios de maíz (17), de modo que el método de extracción es simple, económico y el producto es no tóxico y producido a partir de productos alimenticios.

La presente invención se basa en la investigación sobre tres fagos específicos para *E. coli*, fago de laboratorio K1 manejable para experimentación que facilitó el diseño de métodos y ensayos, fago Im11 indicado a menudo para terapia experimental así como el fago T4 polivalente, capaz de infectar un amplio espectro de cepas de *E. coli*. Estas bacterias son la causa de muchas enfermedades. La novedad de la presente invención, a parte del uso de métodos modernos muy significativos para analizar la pureza de la preparación, realizados mediante el uso de cromatografía, SDS-PAGE, evaluación del contenido de endotoxina de la pared bacteriana como el ensayo LAL y análisis químicos usando el sistema GLC-MS (método Kdo), se refiere a la estabilización de fagos purificados y liofilizados con extracto en etanol de 2-4% de masa bacteriana de una cepa de *Bifidobacterium* y almacenamiento bajo vacío. Hasta la fecha, no existían métodos suficientemente sensibles y específicos para analizar la pureza de los fagos.

El conjunto de moléculas de fagos producidas, purificadas y analizadas usando el método según la presente invención constituye un conjunto antígeno completo y puede ser necesario en una serie de usos en biotecnología y medicina. La introducción a escala comercial preferible de una preparación terapéutica liofilizada se debe destacar que requiere una menor inversión financiera y que sea más fácil para la industria farmacéutica. Las preparaciones liofilizadas estables producidas según la presente invención están diseñadas para la terapia de fagos controladas de infecciones y tumores así como para la producción de preparaciones farmacéuticas basadas en fagos. La producción de nuevas cepas de fagos terapéuticamente útiles, así como la producción terapéutica es varias veces menos cara que la investigación de nuevos antibióticos o la terapia de los mismos. Las soluciones propuestas en la presente invención son sencillas y no requieren reactivos costosos, están basados en tres preparaciones diferentes y, por tanto, son útiles para ser usadas en una amplia diversidad de fagos.

Ejemplos

Ejemplo 1. Obtención de la preparación estabilizante

Se cultivó *Bifidobacterium adolescentes* (PCM 2555) en un medio de maíz semilíquido, enriquecido con glucosa, a 37 °C durante 48 horas sin agitación bajo condiciones microaerófilas. La masa bacteriana liofilizada se extrajo con etanol acuoso al 80%. A continuación de la separación de los restos celulares a través de centrifugación (3.000 rpm, 30 minutos, 4°C), el extracto se secó para separar el disolvente. El resto se complementó con amoníaco acuoso hasta una concentración final de 12% y, después de 24 horas de mezcla a temperatura ambiente, se centrifugó para separar el material insoluble (10.000 rpm, 30 minutos, 4 °C), mientras que la capa acuosa se evaporó en desecadores y el producto final se liofilizó.

Ejemplo 2. Liofilización de bacteriófagos K1 en presencia de diversos estabilizadores

La preparación de fagos purificada se dializó frente a tampón PBS con iones Ca^{2+} y Mg^{2+} a 4 °C, durante una noche en un agitador magnético. Se colocaron 0,1-1 ml de preparación de fagos dializados frente a PBS en viales y ampollas Packard esterilizados y sometidos a cocción y seguidamente se añadieron cantidades del estabilizador trehalosa, glucosa, sorbitol o extracto probiótico de forma que la concentración final fuera 0,1%, 1%, 2%, 4%, 10% y 20%. Todas las soluciones se congelaron a -70 °C y se liofilizaron. Las preparaciones en ampollas se liofilizaron y almacenaron herméticamente bajo vacío. En esta forma, las preparaciones se almacenaron durante varios meses a 4 °C. Seguidamente las muestras se disolvieron en 1 ml de agua milli Q y se determinaron los títulos de fagos usando el método RTD. El testigo comprendía una muestra liofilizada de preparación de fagos dializados sin estabilizadores. Los fagos no exhibieron actividad en la muestra posterior. Este experimento mostró que la trehalosa y el extracto probiótico, a concentraciones de 2-4%, estabilizan mejor los fagos durante la liofilización.

Ejemplo 3. Purificación de fagos a partir de lisado usando cromatografía de afinidad en una columna con polilisina inmovilizada

Se preparó una columna de afinidad con polilisina unida. Se activó un gel de agarosa como Sepharose 4B (Pharmacia) (10-20 ml) usando BrCN (Fluka) según un procedimiento estándar, preferentemente durante 30 minutos a pH=11 estable y a temperatura ambiente. Seguidamente, se eluyó bromocianato en exceso con agua y NaHCO_3 0,1 M a pH 8,2. Se complementaron 10 ml del gel activado con 30 mg de polilisina (Sigma) en 5 ml de NaHCO_3 0,1 M pH 8,2, y se mezcló durante 2 horas en un mezclador rotatorio. Seguidamente, el gel se complementó con etanolamina 1 M (POCH) en un volumen igual al gel y la preparación se mezcló adicionalmente durante 2 horas a temperatura ambiente y seguidamente durante una noche a 4 °C. Al día siguiente, el gel se eluyó con agua y se dejó durante 30 minutos en K_2HPO_4 2M y seguidamente se eluyó con agua. Seguidamente, el gel en suspensión en PBS sin Mg^{2+} y Ca^{2+} se envasó en una columna de vidrio (1 x 10 cm).

Se añadió un lisado de bacteriófago (20 ml) a la columna de afinidad sin polilisina unida. Después de introducir el material, la columna se eluyó con PBS sin Mg^{2+} y Ca^{2+} . Las fracciones eluidas de 2 ml se evaluaron en cuanto a contenido de proteínas midiendo la absorbancia a 280 nm. A continuación de la elución del material no unido al gel, los bacteriófagos se eluyeron usando NaCl 1M en PBS sin Mg^{2+} y Ca^{2+} y seguidamente la segunda fracción usando KCNS 3M (Reachim) en PBS sin Mg^{2+} y Ca^{2+} . Finalmente, la columna se eluyó intensivamente con PBS sin Mg^{2+} y Ca^{2+} . El material unido al gel se dializó frente a diversos cambios de PBS antes de la condensación.

Bibliografía

- 10 1. Biswas B., Adhya S., Washart P., Brain P., Trostel A.N., Powell B., Carlton R., y Merrill C.R. (2002): Bacteriophage therapy rescues mice bacteremic from clinical isolate of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *Infect. Immun.*, 204-210.
- 15 2. Kucharewicz-Krukowska A., Slopek S. (1987): Immunogenic effect of bacteriophage in patients subjected to phage therapy. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* 35: 553-561.
3. Sulakvelidze A., Morris J.G. (2001): Bacteriophages as therapeutic agents. *Ann Med.* 33(8):507-509.
- 20 4. Zaremba M. L., Borowski J.: *Mikrobiologia lekarska*, Warszawa (1997) Wydawnictwo Lekarskie PZWL.
5. Ross F. C.: *Introductory Microbiology*, (1983), Merrill C. E. Publishing Co., A. Bell and Howell Company.
- 25 6. Loeffler J.M., Nelson D., Fischetti V.A. (2001): Rapid killing of *Streptococcus pneumoniae* with bacteriophage cell wall hydrolase. *Science* 294 (5549):2170-2172.
7. Carlton R. M. (1999): Phage therapy: past history and future prospects. *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, 47, 267-274.
- 30 8. Merrill CR., Biswas B., Carlton R., Jensen NC., Creed GJ., Zullo S. y Adhya S. (1996): Long-circulating bacteriophage as antibacterial agents. *Proc.Natl. Acad. Sci. USA* 93:3188-3192.
9. Górski A., Weber-Dabrowska B., The potential role of endogenous bacteriophages in controlling invading pathogens, *Cellular Molec. Life Sci.*, 62, 2005, 511-519.
- 35 10. Lipiński T., Gamian A., Zuziak E., Korzeniowska-Kowal A., Górski A. Oczyszczony preparat bacteriophages y, a method jego of producing and zastosowania, *Zg. ĩ. Pat.* 381730 z 10.02.2007.
11. Miyamoto-Shinohara Y., Imaizumi T., Sukenobe J., Murakami Y., Kawamura S., Komatu Y. (2000) Survival rate of microbes after freeze-drying and long-term storage. *Cryobiology* 41, 251-255.
- 40 12. Hubalek Z. (2003) Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. *Cryobiology* 46, 205-229.
13. Lovelock J.E., Bishop M.W.H. (1959) Prevention of freezing damage to living cells by dimethylsulphoxide. *Nature* 183, 1394-1395.
- 45 14. Polge C., Smith A.U., Parkes A.S. (1949) Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature* 164, 666.
15. Nash T. (1966) Chemical constitution and physical properties of compounds able to protect living cells against damage due to freezing and thawing. *Cryobiology*, 179-211.
- 50 16. Sundberg L., Hoglund S., Purification of T4 phage by adsorption on polylysine agarose, *FEBS Letters*, 37, (1), 1973, 70-73.
- 55 17. Szponar B., Pawlik J.K., Gamian A., Szwajcer-Dey E., Zastosowanie frakcji białkowej z młóta browarnianego oraz pod ĩóże mikrobiologiczne, *Zg. ĩ. Pat.* Nr P-357694 z dn. 11. 12. 2002 r.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para producir formas estables de preparaciones de bacteriófagos farmacológicas purificadas y liofilizadas con estabilidad y actividad antibacteriana aumentadas, en el que una preparación de bacteriófagos producida a partir de un lisado bacteriano y purificada en un sistema de membranas de ultrafiltración selectivamente permeables es estabilizada a través de la adición de extracto en etanol de 2-4% de masa bacteriana de una cepa de Bifidobacterium, y la preparación de bacteriófagos se liofiliza bajo condiciones estériles.
- 10 2. Un método según la reivindicación 1, caracterizado porque el procedimiento de purificación de los bacteriófagos a partir del lisado bacteriano se realiza en un modo continuo en un aparato Pelicon equipado con un sistema de membranas de ultrafiltración selectivamente permeables, usando una lisozima, un quelador o detergente o una columna de afinidad con polilisina inmovilizada si el bacteriófago es desactivado mediante detergentes.
- 15 3. Un método según la reivindicación 1, caracterizado porque con el fin de producir la preparación estabilizante de bacteriófagos a partir de una masa celular de una cepa de Bifidobacterium, se prepara un extracto en etanol que seguidamente se seca y se trata con una solución de amoníaco, para usar la capa acuosa como un estabilizador de bacteriófagos.
- 20 4. Un método según la reivindicación 1, caracterizado porque la forma estable de preparaciones de bacteriófagos activas y purificadas se dispone en forma de comprimidos o se prepara en un liofilizado a vacío en ampollas, que es estable y activo a 4 °C durante al menos 6 meses.
- 25 5. Un método según la reivindicación 1, caracterizado porque la actividad de las preparaciones de bacteriófagos es exhaustivamente evaluada en ensayos biológicos de lisis bacteriana, así como cromatografía HPLC, electroforesis en presencia dodecil-sulfato y las preparaciones activas son destinadas para una terapia de fagos de infecciones y tumores, así como para la producción de preparaciones inmunobiológicas de diagnóstico.