(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 758 879**

(51) Int. CI.:

A61K 35/76 (2015.01)
A61K 47/46 (2006.01)
A61L 15/36 (2006.01)
A23K 10/10 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.06.2012 PCT/EP2012/062270**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **27.12.2012 WO12175749**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.06.2012 E 12732609 (8)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.09.2019 EP 2723356**

(54) Título: **Liberación de agentes virales**

(30) Prioridad:

23.06.2011 GB 201110647

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
06.05.2020

(73) Titular/es:

FIXED PHAGE LIMITED (100.0%)
Barwell, Sterling House, 20 Renfield Street
Glasgow G2 5AP, GB

(72) Inventor/es:

CHADWICK, JAMES y
MATTEY, MICHAEL

(74) Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

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

Liberación de agentes virales

Campo de la invención

[0001] La presente invención se refiere a un medio para el suministro de agentes virales (tales como bacteriófago o de otros virus), en un estado viable sostenible, y en varios formatos adecuados para la prevención y control de la infección microbiana, la colonización y/o contaminación. Se proporciona un sistema que también puede actuar como un medio para localizar y administrar virus viables genéticamente modificados adecuados para la administración de genes/proteínas específicos como terapia o inmunización. La invención se puede aplicar para contrarrestar el crecimiento y/o colonización microbiana/bacteriana en prácticamente cualquier situación en la que esté presente o sea probable que ocurra contaminación, colonización o infección microbiana/bacteriana y donde la actividad antimicrobiana sostenida de los virus tales como bacteriófagos pueden ser beneficiosos.

Antecedentes de la invención

[0002] En la actualidad se acepta generalmente que contaminación o infección microbiana/bacteriana es un factor importante que influye en las funciones biológicas/fisiológicas normales (tales como la curación o el crecimiento) y la velocidad de descomposición en muchos sistemas y procesos biológicos. En la curación de heridas, la prevención de la infección de la herida es un aspecto vital del cuidado y la recuperación de la herida. Como todas las heridas son susceptibles de infección, las mejores prácticas de cuidado de heridas se esfuerzan por tener esto en cuenta. Por lo general, las heridas se limpian para eliminar los restos extraños que pueden albergar bacterias, y donde los tejidos han sufrido un trauma severo, La reparación de tejidos es frecuentemente asistida mediante sutura. En los procedimientos quirúrgicos mayores como el reemplazo de cadera, esto implica la reparación de varias capas de tejido, seguido de un apósito estéril para heridas de un tipo generalmente disponible. Por lo general, se aplica un apósito estéril para heridas en la superficie de la piel para ayudar a la limpieza y prevenir la infección.

[0003] A pesar de estas precauciones, la infección puede establecerse a través de la entrada de material durante la lesión o inadvertidamente durante diversos procedimientos médicos/quirúrgicos. Además, los problemas de infección de la herida no se limitan a heridas profundas. La infección puede transformar lesiones relativamente menores en heridas crónicas que plantean cada vez más problemas importantes de atención médica, particularmente para los ancianos, los diabéticos o los enfermos.

[0004] Más allá de la limpieza de heridas, diversos enfoques han sido adoptados en un intento de impedir el establecimiento de infecciones de la herida profundamente arraigada. Por lo general, los antibióticos se han utilizado de forma sistémica y local o se han utilizado productos químicos desinfectantes fuertes (en la reconstrucción dental, por ejemplo) en un intento de eliminar las heridas profundas de bacterias infecciosas. Desafortunadamente, incluso la aplicación de productos químicos antimicrobianos fuertes no tiene éxito para evitar que la infección se establezca o se repita. En gran parte, esto puede deberse a la incapacidad del agente desinfectante para erradicar completamente todas las bacterias problemáticas. Además, como es bien sabido, muchas bacterias ahora son resistentes a los antibióticos y su efectividad se diluye con el tiempo.

[0005] Por tanto, existe una necesidad de medios más eficaces para contrarrestar la infección bacteriana y contaminación. Un enfoque ha consistido en utilizar bacteriófagos (virus que atacan y destruyen bacterias) y varios grupos han informado de su aplicación exitosa. Los problemas centrales asociados con la aplicación de bacteriófagos como un medio para contrarrestar la infección han estado derivando un medio apropiado de entrega al tiempo que aseguran que los bacteriófagos permanecen estables y viables el tiempo suficiente para ejercer sus poderosos efectos antimicrobianos. La administración en líquido no es realista ni práctica en muchas situaciones. La necesidad es un medio de entrega que sea generalmente adecuado para la aplicación de bacteriófagos como agentes bactericidas y que tenga utilidad en muchas situaciones, incluido el cuidado de heridas. Dado que los bacteriófagos son susceptibles a la degradación y la desecación, lo ideal es que esto también confiera una mayor viabilidad y estabilidad.

[0007] Muchos vendajes convencionales emplean un material que está diseñado para absorber el exceso de líquido dentro de la herida; Como tales fluidos son frecuentemente ricos en nutrientes y son capaces de soportar un crecimiento bacteriano abundante. Dado que una abertura quirúrgica o la superficie de la piel rara vez está absolutamente libre de bacterias, el material de vendaje pronto soporta una población bacteriana en crecimiento. La bacteria no solo puede causar infecciones graves, sino que también puede liberar toxinas dañinas que conducen a problemas importantes en términos de manejo de heridas. Una solución es cambiar rutinariamente el vendaje de la herida, para evitar la acumulación de bacterias, pero esto no siempre es deseable y/o factible.

[0008] Un enfoque alternativo es para tratar el apósito con un agente que está diseñado para limitar el crecimiento microbiano. Sin embargo, muchos de estos agentes pueden filtrarse del apósito una vez que entran en contacto con los exudados de la herida, lo que limita la efectividad del apósito y, de hecho, puede ser problemático con el agente activo causando irritación o daño al tejido circundante.

[0009] Por tanto, existe un deseo de proporcionar apósitos antimicrobianos en los que el agente antibacteriano no es fácilmente liberado del apósito, o cuando la liberación del agente no sería perjudicial para el sujeto que está siendo tratado.

[0010] El documento WO 03/093462 describe un método para inmovilizar virus, tales como bacteriófagos, en un sustrato, de modo que los virus aún retienen la infectividad.

[0011] Se encuentra entre los objetos de la presente invención para proporcionar un medio para introducir bacteriófago en áreas contaminadas y entornos de modo que la estabilidad de bacteriófagos se mejora y su actividad antimicrobiana es retenida. Esto incluye heridas infectadas, que van desde lesiones superficiales hasta entornos de heridas profundas.

[0012] Por separado, las infecciones bacterianas de las plantas pueden dar como resultado una germinación, crecimiento y/o rendimientos reducidos. Es deseoso para tratar o prevenir esas infecciones, pero los enfoques para hacerlo actualmente corren el riesgo de afectar negativamente a otro factor que influye en el crecimiento de las plantas.

[0013] Otro objeto de la invención es el de responder a las infecciones bacterianas de plantas y proporcionar material vegetal tratado de acuerdo con la invención y usos de los mismos.

[0014] En consecuencia, la invención proporciona material vegetal seleccionado de semillas, raíces y tubérculos a los que se ha unido covalentemente el bacteriófago, en donde el bacteriófago se une al material vegetal activando el material vegetal y luego uniendo el bacteriófago al material vegetal activado, y en donde el bacteriófago retiene la infectividad.

[0015] La invención también proporciona un método de tratamiento de material vegetal seleccionado a partir de semillas, raíces y tubérculos, que comprende la activación del material de la planta y luego unir covalentemente el bacteriófago al materia vegetal activado, en donde el bacteriófago conserva la infectividad.

[0016] La invención proporciona adicionalmente un método de tratamiento de material vegetal para su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad en una criatura que se alimenta de material vegetal, en donde el material vegetal se selecciona de frutas, vegetales, hojas, tallos, flores, raíces, tubérculos y plántulas, que comprenden llevar una preparación acuosa de partículas a las que los bacteriófagos se unen covalentemente en contacto con el material vegetal y secar la combinación para unir las partículas al material vegetal.

[0017] Además, la invención proporciona alimentos para su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad en una criatura que se alimenta de la comida, preparada por tratamiento de la comida uniendo una partícula a la que el bacteriófago se une covalentemente.

[0018] Adicionalmente, la invención proporciona material vegetal para su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad en una criatura que come del material vegetal, en donde el material vegetal se selecciona de frutas, vegetales, hojas, tallos, flores, raíces, tubérculos y plantas, la material vegetal que comprende partículas a las que se une covalentemente el bacteriófago y que se ha adherido al material vegetal mediante secado.

[0019] Además, la invención proporciona una composición que comprende un vehículo seleccionado de (I) un filamento, (ii) un material planar, y (iii) las partículas y/o perlas, y bacteriófago unido covalentemente a los mismos para su uso en el tratamiento o la prevención de infección bacteriana en una herida profunda, en donde la composición se localiza en una herida profunda que luego se cierra, y en donde el bacteriófago retiene la infectividad.

[0020] En el presente documento se describen dispositivos para proporcionar virus vivos, tales como un bacteriófago, a o dentro de una ubicación deseada, tal como o dentro de una herida, el dispositivo definido como un compuesto portador de virus vivo (LVCC) que comprende virus vivos unidos a un sustrato portador. Tal LVCC puede usarse en situaciones donde es ventajoso que la acción biológica del virus transmita beneficios terapéuticos u otros antimicrobianos. Por lo general, esto implicará que los virus retengan sus propiedades biológicas y, en el caso de los bacteriófagos, retengan su capacidad para atacar, infectar y destruir células bacterianas. Los virus pueden ser bacteriófagos que atacan a las bacterias responsables de las infecciones de heridas. En la invención, se unen a la superficie de un material de sustrato portador para que sus propiedades biológicas se mantengan dentro de un entorno infectado o contaminado.

[0021] La superficie del soporte puede estar provisa, p. ej., por un material filamentoso, planar (hoja) (p. ej., como tiras) o por la superficie de partículas y/o perlas, y que es suficiente para permitir la fijación del virus y la inmovilización tal que se retiene esa viabilidad del virus.

[0022] Las LVCC pueden proporcionarse individualmente o en combinaciones dentro de una herida profunda o en otro sitio relevante de modo que las propiedades beneficiosas de virus vivo se proporcionan y se entregan como se

requiera. El portador/sustrato puede ser cualquier material sobre el que se pueda inmovilizar el virus al mismo tiempo que mantiene la viabilidad y retiene las propiedades antimicrobianas adecuadas para la aplicación como un LVCC.

[0023] Una composición de la invención puede comprender un vehículo seleccionado de (I) un filamento, (ii) un material plano, y al mismo (iii) las partículas y/o perlas, y bacteriófago unidos covalentemente, en donde el bacteriófago conserva la infectividad.

[0024] El portador es adecuadamente biodegradable y/o biocompatible. Por separado, puede ser compatible con los tejidos y puede ser absorbido in situ.

[0025] Un uso de la composición reside en el tratamiento o prevención de la infección bacteriana en una herida profunda, por lo que se entiende una herida que no está en una superficie expuesta del cuerpo. Una herida profunda puede ser una herida interna, que incluye un tapón interno cerrado por suturas en la superficie del cuerpo. Típicamente, una composición de la invención se ubica en una herida profunda que luego se cierra. Por lo tanto, un filamento de la invención puede ubicarse y dejarse en una herida profunda. En una realización de la invención descrita con más detalle a continuación, la ubicación de un filamento al que se unió el bacteriófago en una herida profunda dio como resultado una herida bien curada en comparación con el control.

[0026] Ventajosamente, el material de la composición es un biodegradable y/o material biocompatible, o hacer de un polímero u otro material que es compatible con el tejido y puede ser absorbida in situ. La degradación puede ocurrir con el tiempo para que la acción antimicrobiana u otra propiedad relevante del virus adjunto (como el bacteriófago) no se vea sustancialmente afectada.

[0027] También se describen en este documento LVCC unidas a diversos implantes quirúrgicos, tales como prótesis, stents, catéteres, membranas o material de soporte para la reparación quirúrgica o a los materiales utilizados como andamio o marco para propósitos regenerativos, anclajes de sutura, suturas y otros dispositivos de cierre de heridas (p. ej., tiras adhesivas o grapas), derivaciones, catéteres, cánulas de vivienda, tubos y dispositivos similares y componentes de los mismos, etc. Se pueden unir a la superficie o incorporar en andamios o materiales de soporte compuestos de varios polímeros no biodegradables, polímeros biodegradables, colágeno, queratina, celulosa, algodón, seda y otras sustancias similares por separado o en combinación (ver más abajo).

[0028] También se describe aquí la construcción de LVCC a través de la inmovilización de los virus a la superficie de un soporte de material de substrato de manera que su viabilidad y propiedades biológicas (para bacteriófago esto incluye sus propiedades bactericidas) son sostenidas y prolongadas en ambientes hostiles (como áreas infectadas o contaminadas) que desnaturalizarían rápidamente el virus. A continuación se enumeran ejemplos de materiales que pueden usarse solos o en combinación o como mezclas o como copolímeros y adecuados para su uso como sustratos portadores dentro de un LVCC.

[0029] Clases de polímeros adecuados incluyen biopolímero, polímero conductor, copolímero, polímero fluorado, politerpenos, resinas fenólicas, polianhídridos, poliésteres, poliolefinas (polialquenos), caucho, silicona, caucho de silicona, superabsorbentes polímeros, cauchos sintéticos, polímeros vinílicos, ácidos nucleicos, polipéptidos, azúcares, ácido poliláctico (PLA poli-3-hidroxibutirato, polímeros inorgánicos, polímeros homo-atómicos, polisilanos, poligermanes, polstananos, polímeros heteroatómicos, poliborazilenos, polisiloxanos, polidimetilsiloxano (PDMS), polimetilhidrosiloxano (PMHS) y polidifeno; polisilazanos como el perhidridopolisilazano PHPS, polifosfacenos, politiazilos, polisulfuros, polietileno de peso molecular ultra alto (UHMWPE), plásticos comunes, poliéster de polipropileno (PES), tereftalato de polietileno (PET), polietileno (PE), polietileno de alta densidad, cloruro de polivinilo (PVC), cloruro de polivinilideno (PVDC) (Saran), polietileno de baja densidad (LDPE), polipropileno (PP), poliestireno (PS), poliestireno de alto impacto (HIPS), poliamidas (PA) (Nilons), acrilonitrilo butadieno estireno (ABS), policarbonato (PC), policarbonato/acrilonitrilo butadieno estireno (PC/ABS), poliuretanos (PU), plásticos de propósito especial, monómeros y polímeros (incluidos los materiales biodegradables/reabsorbulares), etileno acrilato de metilo, melamina formaldehído (MF), material plastarch, fenólicos. (PF) o (fenol formaldehídos), policaprolactona (PCL), poli dioxanona (PDOor PDS), polieteretercetona (PEEK), polieterimida (PEI) (Ultem), ácido poliglicólico (PGA), polihidroxibutirato (PHB), ácido poliláctico (PLA) estereoisómeros de tipo D y L, polilactida, copolímero de ácido lípico-DL-láctico, ácido poliglicólico (PDLLA-co-PGA), ácido poli-L-láctico (PLLA), metacrilato de polimetilo (PMMA), politetrafluoroetileno (PTFE), carbonato de poli-trimetileno (TMC), policarbonatos, polianhídridos, anhídridos de poli-(imida) y poliortoésteres.

[0030] Otros materiales incluyen urea-formaldehído (UF), fosfato tricálcico (TCP), los materiales naturales, madera, cerámica, piedra, arena y piedra; cuerno y queratina; hueso; cuero; papel; seda; algodón; cáñamo; vidrio, metales ferroso y no ferrosos y aleaciones metálicas.

[0031] Materiales especializados que se pueden usar incluyen celulosa como fibras o tela (carboximetilada), colágeno, ácido hialurónico, coloides hidroeléctricas, hidrogeles, películas, espumas, alginatos, acetato de acrilato de metilo, gafas especializadas (biodegradables y no biodegradables), nilons especializadas, polisacáridos.

[0032] Los virus (por ejemplo bacteriófago) se pueden inmovilizar directamente a las superficies del material que comprende el dispositivo. En esencia, el material a partir del cual se forma el dispositivo se convierte en el material portador de LVCC. Por ejemplo, la inmovilización del bacteriófago en suturas quirúrgicas a la vez proporciona un LVCC que tiene doble propósito, capaz de cerrar la herida mientras ofrece una potente capacidad antibacteriana. Las suturas pueden ser de varios tipos, incluidos los polímeros biodegradables.

[0033] Las LVCC (como filamentos o tiras a las que se ha unido el bacteriófago individualmente o en combinación) pueden agregarse y/o debajo de un apósito para heridas o usarse junto con otros tipos de apósitos o dispositivos que pueden transmitir ventajas específicas, pero que reciben una función antimicrobiana mejorada como resultado de la aplicación concurrente de LVCC.

[0034] También se describe en el presente documento la incorporación de LVCC como parte de un apósito para heridas. Esto puede ser como un componente separado (LVCC) que está formateado para ser una parte integral del apósito o distinto de él pero introducido dentro y/o debajo del apósito para proporcionar una función antimicrobiana. Alternativamente, el material de soporte puede ser parte del apósito. La LVCC o el material de soporte pueden formatearse de varias formas, como se describe a continuación, pero que no deben interpretarse como limitantes.

[0035] Una herida particular, apósito puede comprender una pluralidad de filamentos a la que el bacteriófago se adjunta, en donde hay al menos un primer filamento al que está unido un primer bacteriófago y un segundo filamento al que está unido un segundo bacteriófago y en donde el primer y segundo bacteriófago infectan bacterias de diferentes cepas o especies.

[0036] El primer y segundo filamentos pueden ser de diferentes colores. Esto proporciona una codificación de color del apósito. Por lo tanto, en uso, los colores se usan para identificar la enfermedad que es tratable o prevenible mediante un apósito dado, los colores son consistentemente para indicar qué especificidad bacteriana exhibe el fago unido a ese filamento o parte del apósito. En un ejemplo específico, los filamentos de un color tienen fagos que infectan a *S. aureus* y los filamentos de un segundo color tienen fagos que infectan a *C. difficile.*

[0037] Normalmente, un apósito para heridas o vendaje comprende una capa de apósito para proporcionar protección de la herida y/o para la absorción de fluido de la herida, y una superficie de contacto con la herida, al menos una parte de los cuales puede comprender virus inmovilizado sobre el mismo. La superficie de contacto puede ser parte de la capa de apósito o puede ser parte de un componente adicional, tal como parte de una cubierta que rodea o superpone el primer material. En una realización, la superficie de contacto puede ser permeable para permitir que el fluido pase y entre a la capa de apósito. La superficie de contacto con la herida es generalmente una porción de un material que puede ponerse en contacto con la herida a tratar, aunque el contacto puede no ser directo. Así, p. ej., se puede colocar un sustrato permeable adicional entre la herida y la superficie de contacto sobre la que se inmovilizan los virus. De esta manera, el fluido de la herida, que puede comprender cualquier agente microbiano, puede penetrar en el sustrato permeable y contactar con el virus inmovilizado presente en la superficie de contacto.

[0039] De hecho, la superficie de contacto puede incorporar una LVCC como un componente diseñado para ser insertado dentro de una bolsa o similar formada en un apósito. De esta manera, se pueden proporcionar diferentes insertos que comprenden diferentes virus inmovilizados y se puede elegir un inserto deseado y colocarlo dentro de un apósito, dependiendo del tipo de herida a tratar. De hecho, se puede analizar una herida para determinar qué tipo de agentes microbianos pueden estar presentes y un inserto elegido de manera apropiada para atacar a dichos microbios. Alternativamente, se pueden emplear las LVCC compuestas por varios bacteriófagos que proporcionan una acción antimicrobiana de amplio espectro general.

[0040] En un aspecto, un apósito para heridas puede comprender tres componentes: una cubierta exterior para fijar el apósito a la piel p. ej., ya sea a través vendaje o adhesivo; una capa intermedia de apósito que puede actuar para amortiguar los golpes y la abrasión y también puede proporcionar una función para ayudar en el proceso de curación; un ejemplo podría ser la pelusa absorbente, material que se ha utilizado en formatos básicos de apósito durante muchos años; y una membrana interna que forma la superficie de contacto que está en contacto con la herida. Esto puede comprender, p. ej., un tejido de polímero sintético en una lámina o malla y tal vez recubierto con una sustancia para asegurar que el apósito se pueda quitar fácilmente.

[0041] En un ejemplo sencillo de un bacteriófago que incorpora vendaje, el fago puede estar unido a la superficie de una capa interna (la superficie de contacto), o la capa interior puede ser introducida como una LVCC y distinta del apósito, pero que se pone en contacto con una herida. El posicionamiento general sirve para localizar el fago en el área donde se establece/puede establecerse la infección de la herida bacteriana y optimiza la probabilidad de que ocurra un evento bacteriófago infeccioso inicial, por lo que se inicia un ciclo de destrucción bacteriana cada vez mayor.

[0042] En un aspecto un apósito o LVCC puede ser ideada para ser activa contra un solo tipo de bacteria y así sería implicar la inmovilización del fago (o fagos) activo contra un solo tipo de bacterias.

[0043] Otro aspecto puede implicar fagos inmovilizados a través de toda el área de la superficie de contacto. Sin embargo, en algunos casos, esto puede resultar innecesario o no el método más económico para la inmovilización o

la fabricación. Otros formatos pueden ser posibles. Por ejemplo, los fagos solo se pueden unir a áreas definidas de una superficie de contacto. Esto se puede lograr a través de la activación de solo partes de la superficie y un proceso de fijación que permite el acceso del fago a toda la superficie, pero con la inmovilización solo en un área activada. Alternativamente, los fagos pueden dirigirse solo a áreas activadas, en un tipo de técnica de impresión. Esto puede requerir una disposición (la inversión de lo anterior) en la que los fagos se activan antes del proceso de fijación y posteriormente se 'imprimen' en una superficie adecuada. Alternativamente, tanto el fago como la superficie pueden activarse simultáneamente o en el caso de apósitos que llevan fagos múltiples en diferentes momentos, para proporcionar un método alternativo de fabricación de apósitos que llevan múltiples tipos de fagos.

[0044] Todo lo anterior puede implicar virus/fagos contenidos en un tampón adecuado, que puede o no puede contener un colorante para identificación del producto o como un indicador para proporcionar una señal de que un apósito es debido para el cambio o no. Alternativamente, un tinte como indicador podría utilizarse por separado como marcador o para distinguir áreas particulares de unión de virus/fago. Un tinte también puede formar un enlazador para unir virus/fago a ciertas superficies.

[0045] Además los virus/bacteriófago se pueden unir a las áreas especificadas y se aplican en varios patrones reduciendo así la cantidad de virus/fago requerido para la fabricación. Además, se pueden usar patrones y/o marcadores de color en LVCC o en la identificación del apósito. Además, los virus/fagos pueden unirse a áreas pre-coloreadas de acuerdo con el tipo de virus/fago. Alternativamente, pueden estar unidos a áreas no coloreadas.

[0046] En una variación de lo anterior, los virus/fagos pueden estar unidos a la periferia de un apósito para desalentar la entrada posterior de los microbios, o un agente antibacteriano convencional (desinfectante o antibiótico) podría ser utilizado en la periferia. Como tal, el fago se puede aplicar a apósitos o LVCC, ya sea individualmente o en combinación con compuestos antibacterianos (desinfectante, antibiótico u otro) y/o enzimas, que también se pueden inmovilizar, con fines específicos para aumentar los efectos del fago adjunto, ayudar su acción, p. ej., eliminando biopelículas, o aplicadas junto con fagos para proporcionar una barrera antimicrobiana. De esta manera, los apósitos y las LVCC pueden comprender más de un tipo de agente antimicrobiano y pueden comprender varios virus/fagos aliados a varios otros agentes, ya sean agentes químicos antimicrobianos convencionales o enzimas. De hecho, tales combinaciones pueden funcionar sinérgicamente.

[0047] Una alternativa implica unir fago a las fibras LVCC o hebras como se describió anteriormente, que pueden ser coloreadas (también como se describe anteriormente) y se pueden unir a superficies o entretejidos dentro de una superficie, o ambos. Las fibras pueden ser tejidas o unidas en varios patrones para indicar el tipo de apósito o LVCC. Las fibras pueden tener fagos unidos antes o después de la incorporación en la superficie activa/de contacto. Además, las fibras de LVCC pueden ser coloreadas de acuerdo con los fagos empleados o alternativamente pueden ser incoloras pero tejidas en áreas impresas en color de una superficie de contacto de apósito u otra área del aderezo.

[0048] Alternativamente, las LVCC fibrosas pueden comprender dos o más hebras, coloreadas o no coloreadas, y que tienen virus/fagos unidos a una hebra o ambas (como se describe a continuación para múltiples opciones de apósito de fagos) y adheridos o tal vez completamente integrados dentro de un apósito.

[0049] Otra opción es incorporar virus/fago en apósitos a través de unión a la capa de apósito medio de acuerdo con cualquiera de los métodos anteriores, por lo que el acceso a los microbios diana se produce a través de una membrana permeable o de malla ubicada adyacente a una herida.

[0050] Un aspecto adicional puede implicar la incorporación de LVCC compuesta de fago unido a las partículas y/o perlas compuestas de varias sustancias de soporte. Esto se puede lograr mediante la unión a partículas/perlas directamente o inmovilización sobre una lámina o superficie plana que se puede dividir finamente para generar muchas partículas pequeñas o tiras finas. Las partículas se pueden administrar a través de aerosol o nebulizador y también se pueden rociar o imprimir sobre cualquier apósito o LVCC o directamente sobre/en el área de necesidad.

[0051] Además, el bacteriófago puede estar unido a varias superficies a través de un proceso de activación de dos etapas mediante el cual los fagos se inmovilizan a un filamento, partícula o perla para generar una LVCC. En un segundo paso, la LVCC se inmoviliza/une a la superficie de un dispositivo como los descritos anteriormente. Alternativamente, el material sobre el que se puede inmovilizar el fago puede unirse irreversiblemente a un dispositivo (como una prótesis) seguido de un segundo paso de activación que inmoviliza el fago al sustrato portador unido al dispositivo.

[0052] La construcción de una LVCC o vendaje activo contra varios microbios/bacterias es posible. Un enfoque puede implicar la utilización de una mezcla heterogénea que contiene varios tipos de fagos diferentes que se utiliza como fuente de fagos a granel para la inmovilización a través de una superficie de contacto completa, o en ubicaciones específicas como se describe anteriormente.

[0053] Un enfoque alternativo puede implicar fagos específicos sujetos distintos y separados en soluciones homogéneas que se activan y dispensan colateralmente - un tipo de dos (o múltiples) impresiones de chorro. Según

esta realización, los virus/fagos se activan y preparan para la inmovilización antes o simultáneamente a medida que se mueven a través del chorro de impresión.

[0054] Otro aspecto implica inmovilizar tipos de fagos específicos en orden definido en la superficie de contacto de LVCC o vendaje a través de varias etapas de activación de la superficie. Este enfoque emplea aquellos sitios de unión que permanecen después del proceso de inmovilización inicial para que la activación secuencial y los pasos de unión no afecten a los fagos previamente inmovilizados.

[0055] Alternativamente fagos pueden estar unidos a áreas específicas de una superficie de contacto de vendaje, individualmente o en combinación de acuerdo con el tipo de tratamiento necesario, a través de la activación secuencial de áreas específicas. Las áreas pueden estar codificadas por colores.

[0056] Además virus/fagos específicos pueden estar unidos a LVCC de compuesto de fibras individuales o tiras finas y unido o tejido en superficies de apósito o unido a otros dispositivos, como se describe anteriormente. Las fibras pueden tener virus/fagos ya inmovilizados sobre ellas o pueden activarse para recibir virus/fagos una vez incorporados o simplemente recibir fagos activados.

[0057] Las fibras pueden ser codificadas por colores según el tipo de virus/fagos y luego retorcidas en hebras compuestas de dos o más filamentos (similares a un poste de barbero) que pueden entonces ser tejidos o unidos (o ambos) para el vendaje o superficie de contacto. Además, se podrían agregar tiras indicadoras de colores (adjuntas, tejidas o impresas) que cambian de color con el tiempo para indicar el momento óptimo para el cambio de apósito.

[0058] En lugar de incorporar fibras o tiras, todo lo anterior podría lograrse mediante la incorporación o la unión de superficies de vedaje 'parches' de material LVCC planar (en varias formas) que puede tener virus/fagos unidos o que están en su lugar para permitir la fijación y puede comprender en sí mismo de fibras entrelazadas o una combinación de ambas.

[0059] La superficie de contacto, fibras o cintas puede comprender indicadores, tales como un marcador de color o similar, de modo de informar a un usuario del tipo de virus adjunto y/o para ayudar con el posicionamiento correcto de la LVCC o el apósito.

[0060] Los virus inmovilizados en sí mismos pueden ser modificados de tal manera que son capaces de expresar una proteína marcadora, tal como la proteína verde fluorescente o similar, tal que cuando los microbios están infectados con el virus, el gen marcador se expresará y la proteína marcadora será producida. Esto a su vez puede ser detectado y el médico es alertado del hecho de que hay microbios en la herida. Luego, el profesional puede cambiar el vendaje en el momento apropiado para retener una población activa de bacteriófagos en el sitio contaminado, y seguir haciendo esto hasta que no se observe un cambio de color que indique que la herida está libre de microbios. Para facilitar esto, el vendaje puede ser deseablemente transparente o parcialmente transparente para que se pueda observar la coloración en la superficie de la herida.

[0061] La herida puede ser una herida interna o una herida que implica varias capas de tejido o dentro de las capas de la piel o en una superficie de piel de sujetos. Se conocen muchos tipos de heridas, incluidas las causadas por traumatismos, cirugía, quemaduras, cortes, abrasiones, úlceras, úlceras por presión y otras lesiones causadas por diabetes, mala circulación y similares. El término también se usa de manera muy amplia para abarcar otras aplicaciones en las que puede ser deseable absorber fluidos corporales y evitar que ocurra cualquier infección microbiana grave; una de estas aplicaciones puede ser en productos de higiene para mujeres, como los tampones para absorber la menstruación y al mismo tiempo prevenir o minimizar el desarrollo del síndrome de shock tóxico. También puede incluir sitios quirúrgicos reales y, por lo tanto, el fago inmovilizado transmitiría propiedades antimicrobianas a materiales absorbentes que a menudo se colocan dentro de un área quirúrgica para absorber el exceso de líquido o materiales de barrera como productos desechables.

[0062] El sujeto puede ser cualquier sujeto animal tal como un animal doméstico o agrícola, pero puede ser particularmente un ser humano.

[0063] En otra realización de LVCC están unidos covalentemente a una amplia gama de material de la planta, seleccionado de frutas, verduras, hojas, tallos, flores, raíces, tubérculos, plantones y semillas para ser utilizado para el consumo o semilla almacenada de valores. De acuerdo con las realizaciones de la invención, los bacteriófagos se inmovilizan directamente en la superficie de las semillas para que la semilla permanezca viable mientras que su superficie se convierte en el componente portador de la LVCC, proporcionando así un medio para combatir las enfermedades de las plantas bacterianas que ocurren durante el almacenamiento, la germinación, la cosecha, el transporte y la venta.

[0064] Por lo tanto, se describe aquí un material vegetal al que se ha unido covalentemente el bacteriófago, en donde el bacteriófago retiene la infectividad.

[0065] Una pluralidad de bacteriófagos que infectan bacterias diferentes pueden estar unidos, dando un espectro de actividad más amplio.

[0066] El material vegetal adecuado incluye frutas, verduras, hojas, tallos, flores, raíces, tubérculos, plántulas y semillas. Las semillas para consumo, p. ej., de animales o aves son un ejemplo. La reserva de semillas, p. ej., que se almacenan antes de ser sembradas, es otro.

[0067] El material vegetal de la invención puede ser utilizado para la prevención o tratamiento de una enfermedad de las plantas o una enfermedad en una criatura que se come el material de la planta, como las infecciones bacterianas en el tracto gastrointestinal.

[0068] Un ejemplo de una composición de la invención es alimentos de origen animal o ave que comprende material vegetal de la invención, en las semillas particulares. El alimento puede estar en forma de una torta o bolita hecha de semillas de la invención o que las comprende. El alimento puede estar en forma de una torta o gránulo que luego se trata para unir el fago, p. ej., tratando el alimento con una preparación acuosa de partículas a las que se une covalentemente el fago, y luego secando el alimento para unir las partículas. Alternativamente, se puede combinar una preparación seca de las partículas con la comida.

[0069] En general, el bacteriófago puede estar unido indirectamente al material de la planta, por ejemplo unido a una partícula o partículas que proporcionan un método de entrega de fago p. ej., para contrarrestar enfermedades de las plantas. Por ejemplo, se puede rociar y secar una solución de partículas con fago unido para pegarlas al material vegetal. En un ejemplo a continuación, tales partículas se unieron a los tubérculos de patata por ese tipo de método. El fago retuvo la viabilidad y fue eficaz para prevenir la enfermedad de los tubérculos.

[0070] Por lo tanto, la invención incluye métodos que comprenden poner una preparación acuosa de partículas a las que el bacteriófago se unen covalentemente en combinación con material vegetal y el secado de la combinación para unir las partículas al material vegetal. Alternativamente, una preparación en seco de las partículas puede combinarse con material vegetal, p. ej., espolvoreado sobre el material vegetal.

[0071] En una realización específica de la invención se describe en más detalle a continuación, el bacteriófago se une covalentemente a semillas de tomate. Las pruebas en una realización separada confirmaron que el fago unido de esta manera a la celulosa (tal como se encuentra en la superficie de la semilla de tomate) retuvo la viabilidad del fago. Se utilizaron semillas de tomate como ejemplo. Se pueden usar otras semillas con resultados similares, desde semillas pequeñas (nicotiana) hasta semillas grandes (maíz). La activación química y corona de las semillas da como resultado una modificación transitoria de la superficie de la cubierta de la semilla, que contiene polímeros relacionados con la celulosa o la pectina con cantidades variables de proteínas y ácidos grasos. Todos estos materiales, cuando se exponen a un campo de corona, darán lugar a especies reactivas de radicales libres, que reaccionarán con la cubierta proteica de un bacteriófago u otra entidad y se desintegrarán para dar enlaces covalentes estables en segundos. Los resultados mostraron que la activación de la corona fue un fenómeno superficial y la viabilidad de las semillas, según lo probado por la germinación, no se vio afectada negativamente; de hecho, la germinación mejoró en comparación con ningún tratamiento con corona.

[0072] Se observaron efectos similares cuando otros materiales vegetales (p. ej., hojas, tallos, flores, raíces) se tratan de una corona de campo; la activación y las reacciones ocurren en las superficies de la cutícula y dan como resultado la unión del bacteriófago; el daño a la planta solo se produce si se producen chispas entre la punta del material vegetal y el electrodo corona. Por lo tanto, el material vegetal puede tener fagos directamente unidos, p. ej., covalentemente. El material vegetal también puede asociarse o combinarse con partículas a las que los fagos están unidos covalentemente. Las partículas que portan fagos pueden secarse sobre el material vegetal. De lo contrario, las partículas pueden asociarse con el material vegetal.

[0073] En una realización específica adicional de la invención, los tubérculos de patata se trataron con fago inmovilizado. En detalle, el fago se unió a la superficie de las partículas de celulosa y estas se inmovilizaron sobre la superficie de la patata rociando los tubérculos con una solución de las partículas y luego secando los tubérculos, para permitir que las partículas se adhieran. El crecimiento de las plantas de patata mejoró sorprendentemente después de este tratamiento: se redujo la incidencia de infección y también el crecimiento de las plantas tratadas fue significativamente mejor.

[0074] En una realización la forma de derivado de semilla de LVCC puede usarse para entregar bacteriófago para el tratamiento de semillas de comer criaturas susceptibles a las infecciones bacterianas tales como los del tracto gastrointestinal. Del mismo modo, la LVCC puede aplicarse a otros alimentos para el tratamiento de enfermedades digestivas y de otro tipo. Alternativamente, una LVCC puede sustituir a la arena y, por lo tanto, utilizarse para el tratamiento de enfermedades aviares. De esta manera, los bacteriófagos que contrarrestan los patógenos bacterianos pueden administrarse en el intestino para el tratamiento de enfermedades bacterianas de los animales. las LVCC también pueden administrarse por vía rectal para la administración de tratamiento antibacteriano al tracto alimentario inferior.

[0076] Inmovilizado se entiende que se refiere a una inmovilización física específica por unión covalente y por lo tanto se distingue de cualquier protuberancia pasiva del virus a un sustrato. Además, la inmovilización es tal que el virus retiene la capacidad de infectar una célula o células. Por lo tanto, la inmovilización puede ocurrir a través de una proteína de cabeza o cápside, o de hecho cualquier otra proteína de superficie del virus, siempre que el virus pueda infectar la célula diana deseada. Más preferiblemente, los bacteriófagos/virus se inmovilizan en el sustrato a través de sus grupos principales o nucleocápsides activando el sustrato antes de la adición y acoplamiento del bacteriófago/virus. La unión covalente es un medio preferido de unión.

[0077] El término "virus" de acuerdo con la presente descripción incluye virus ARN o ADN de doble cadena o de cadena sencilla, incluyendo los que las bacterias infectan y en general se denominan bacteriófago. Los virus son bacteriófagos.

[0078] Se conocen muchos tipos diferentes de bacteriófagos/virus en la técnica y bacteriófago/virus adecuados pueden ser elegidos dependiendo del problema bacteriano a tratar. Por ejemplo, para el tratamiento de heridas, es probable que el médico conozca los tipos comunes de bacterias/protozoos/hongos que pueden infectar heridas particulares y el apósito para heridas puede comprender uno o más tipos diferentes de bacteriófagos/virus diseñados para infectar y, por lo tanto, minimizar el crecimiento de bacterias/protoza/hongos que pueden infectar una herida particular.

[0079] Los ejemplos de potenciales patógenos de heridas incluyen Streptococci, tales como *Streptococcus* pyogenes; enterococos, como *Enterococcus faecalis;* Staphylococcus, como *Staphylococcus aureus,* especialmente *Staphylococcus aureus* resistente *a meticilina* (MRSA); *Pseudomonas aeruginosa;* Especies de Enterobacter; *Escherichia coli;* Especies de Klebsiella; Especies de Proteus; Bacteroides; Clostridio; levaduras como candida; y Aspergillus.

[0080] El término *"portador/sustrato"* de acuerdo con la presente descripción se entiende que significa cualquier material en fase sólida a la que un virus se puede inmovilizar. Por ejemplo, dicho vehículo puede ser un material que puede activarse ventajosamente para permitir, p. ej., la unión específica de un virus al grupo de la cabeza, tal como un bacteriófago complejo. Dicho sustrato puede tomar muchas formas, p. ej., nilon y cualquier otro polímero similar, polímeros con grupos reactivos, tales como grupos de superficie amino o carboxilo, celulosa u otro polímero que contiene hidroxilo, poliestireno u otro polímero similar. El sustrato también puede comprender polímeros como macromoléculas de cadena larga compuestas de múltiples subunidades monoméricas unidas covalentemente y compuestas de monómeros repetitivos simples o combinaciones de tipos de monómero. Por lo general, incluyen material bioabsorbible/bioabsorbible natural, sintético o biosintético en forma monomérica o polimérica, individualmente o en combinación o como copolímeros, tales como enanatómeros de ácido poliglicólico (PGA) y ácido poliláctico (PLA), y copolímero de poli D-L-láctico ácido poliglicolico (PDLLA-co-PGA), poli dioxanona (PDO) y carbonato de politrimetileno (TMC), polieteretercetona (PEEK) y combinaciones y compuestos de las mismas. Los sustratos también pueden incluir plásticos u otros polímeros, perlas o partículas mencionadas anteriormente, que pueden ser magnéticas o estar compuestas de material biológico como alginatos, vidrios o fibra de vidrio, acero inoxidable, silicona, seda, colágeno o un material cerámico. Más preferiblemente, dicho sustrato está hecho de un material comúnmente usado en dispositivos médicos en el tratamiento, o en apoyo de tratamientos. Por ejemplo, materiales comúnmente utilizados como suturas, y también material de pelusa o gasa para cubrir heridas abiertas. En ciertas realizaciones, el sustrato puede ser biodegradable/bioreabsorbible y, por lo tanto, puede degradarse y reabsorberse in vivo con el tiempo, cuando se pone en contacto con fluidos corporales. La capa de apósito puede estar formada, p. ej., de un material de hidrogel al que están unidos los virus, que también puede servir para absorber el fluido de la herida y poner dicho fluido en contacto con los virus inmovilizados.

[0081] El término "activado/activador/activación" de acuerdo con la presente descripción se entiende que significa la activación de un sustrato y/o virus por reacción de dicho sustrato/virus con diversos grupos químicos (dejando una superficie química capaz de virus se unen, como la cabeza del bacteriófago o las proteínas o grupos de la superficie de la cápsida). Alternativamente, la inmovilización puede lograrse mediante activación eléctrica u otra descarga eléctrica, campo o efectos de campo tales como plasmas, microondas, efectos fotoeléctricos, efectos de campo de radiofrecuencia, gamma y otras radiaciones energéticas, etc. Esto puede aplicarse al sustrato portador o virus o ambos sustrato y virus.

[0082] La activación de sustratos también se puede lograr mediante, p. ej., hidrólisis preliminar con un ácido, preferiblemente HCl seguido de una etapa de lavado con agua y un álcali para eliminar el ácido. Preferiblemente, dicho álcali es bicarbonato de sodio. La unión de virus, por ejemplo bacteriófagos, a través de sus grupos principales es importante. En el caso de bacteriófagos complejos, p. ej., la unión a través de grupos de cabeza deja los grupos de cola, que son necesarios para el reconocimiento específico de bacterias, libres de infectar, es decir, unirse y penetrar en una célula bacteriana huésped. Se entenderá que este mecanismo de infección de una célula huésped es similar para muchos otros virus además de los virus que infectan y se multiplican solo en bacterias. Una pluralidad de virus, e. g., diversos bacteriófagos específicos de la cepa, pueden inmovilizarse en un sustrato en cualquier momento.

[0083] El acoplamiento de virus a un sustrato es el resultado de la formación de enlaces, tales como enlaces covalentes entre una proteína de cubierta viral y el sustrato, como a través de un grupo amino en un péptido, p. ej., un enlace peptídico. Los "agentes de acoplamiento" que ayudan a este proceso varían, dependiendo del sustrato utilizado. Por ejemplo, para el acoplamiento al sustrato de nilon u otro polímero con grupos de superficie amino o carboxi, se pueden usar los agentes de acoplamiento carbodiimida o glutaraldehído.

[0084] Para el acoplamiento al sustrato de celulosa u otro polímero que contiene hidroxilo, los agentes de acoplamiento vinilsulfo se puede usar niletilén éter o triazina. Los agentes de acoplamiento para el acoplamiento de virus al sustrato de polietileno u otro polímero similar o muchos otros tipos de polímeros, incluyen descarga en corona u oxidación de permanganato.

[0085] Mediante el uso de técnicas de descarga de corona se ha demostrado que es posible inmovilizar el virus en una gama de sustratos de modo que la actividad antimicrobiana viral se mantenga durante períodos prolongados en condiciones ambientales que eliminarían la naturaleza del virus. Aquí se proporciona una lista completa que incluye sustratos tales como: Nilon y polímeros relacionados, Dacron, Poliestireno, Plásticos y polímeros relacionados, Cauchos naturales y sintéticos, Monómeros bioabsorbibles, polímeros y copolímeros, ya sea solos o en combinación o como copolímeros, tales como enenatómeros de ácido poliláctico (PLA) de ácido poliglicólico (PLA) y poliglicólicos de copolímero de ácido láctico poli D-L (PDLLA-co-PGA), poli dioxanona (PDO) y carbonato de polimetileno (TMC), polieteretercetona (PEEK) y combinaciones y compuestos de los mismos, silicio, Cerámica, Vidrios y fibra de vidrio, Metales como Aceros, aluminio y aleaciones metálicas, Colágeno, Queratina, Acrílicos y diversos recubrimientos, hueso, Seda, Celulosa, incluidos papel, algodón, pelusas, cintas y gasas, Rayón, Esponjas naturales y sintéticas, Alginatos, ácido hialurónico, superficies de gel, como hidrogeles.

[0086] En términos generales, los agentes de acoplamiento para el acoplamiento de un bacteriófago a un sustrato incluyen: anhídrido S-acetilmercaptosuccínico; Éster de N-hidroxisuccinimida del ácido S-acetiltioglicólico; Dihidrazida de ácido adípico; Éster de N-hidroxisuccinimida del ácido 4-azidobenzoico; N-(5-Azido-2-nitrobenciloxi) succinimida; Éster de N-hidroxisuccinimida del 6-(4-azido-2-nitrofenilamino)ácido hexanoico; bromuro de p-azidofencilo; Éster de N-hidroxisuccinimida del ácido 4-azidosalicílico; Éster de N-hidroxisuccinimida del ácido bromoacético; 1,4-butanodiol diglicidil éter; Éster pnitrofenílico del ácido 2-diazo-3, ácido 3,3-trifluoropropriónico; Malonimidato de dietilo; 4, 4'Diisotiocianatostilbeno-2, ácido 2'-disulfónico; Adipimidato de dimetilo; Dimetilo 3,3'-ditiobispropionimidato; Dimetilo pimelimidato; Suberimidato de dimetilo; 44'-ditiobisfenil azida; Ditiobis (éster de N-hidroxisuccinimida del ácido propiónico); Etilenglicol bis-(éster de N-hidroxisuccinimida del ácido succínico); 4-fluoro-3-nitrofenil azida; éster de N-hidroxisuccinimida del ácido p-formilbenzoico; Glutaraldehído; 2-Iminotiolano; Éster de N-hidroxisuccinimida del 6-(Iodoacetamida)ácido caproico; éster de N-hidroxisuccinimida del ácido Iodoacético; Éster de Nhidroxisuccinimida del ácido 3-maleimidoacético; Éster de N-hidroxisuccinimida del ácido 3-maleimidobenzoico; 4-(N-maleimido)benzofenona; Ácido malaimidobutírico N-hidroxisuccinimida. éster; éster de N-hidroxisuccinimida del ácido s-maleimidocaproico; Éster de N-hidroxisuccinimida del 4-(N-maleimidometilo)ácido ciclohexenocarboxílico; 3-(N-maleimidometilo)ácido ciclohexanocarboxílico 3-sulfo-N-hidroxisuccinimida éster; éster de N-hidroxisuccinimida del ácido malimidopropiónico; N,N'-bis(3-maleimidopropionil)-2-hidroxi-1,3-propanodiamina; 1,4-fenilendiisotiocianato; N,N'-o-fenilendimaleimida; Polioxietilen bis(glicidil éter); bis(polioxietilen bis(glicidil éter); polioxietilen bis(imidazolilcarbonilo) 1; bis(polioxietilen bis[imidolilcarbonil]); polioxietilen bis(p-nitrofenilo) carbonato); Éster de N-hidroxisuccinimida del 3-(2-piridilditio)ácido propiónico; Éster bis(N-hidroxisuccinimida) de ácido subérico; ácido succínico Maleimidoetil-N-**hidroxisuccinimidaéster**; 1,5-bis(succinimidooxicarboniloxi)-penteno; bis(N-succinimidil)carbonato.

[0087] Ventajosamente, cuando el virus se inmoviliza en un sustrato portador, dicha inmovilización puede conferir estabilidad. Por ejemplo, el virus inmovilizado se estabiliza de tal manera que mantiene su viabilidad e infectividad incluso cuando está en contacto con agentes, por ejemplo proteasas, que de otro modo podrían inactivar rápidamente el virus. Del mismo modo, cuando se expone al estrés físico, como la deshidratación, la temperatura o el pH, que de otro modo inactivarían al virus.

[0088] La presente invención se describirá ahora adicionalmente a modo de ejemplo y con referencia a las figuras en las que:

La Fig. 1 muestra un diagrama esquemático de un apósito para heridas a las que una LVCC (como uno o más filamentos o tiras a las que bacteriófago se han adjuntado individualmente o en combinación) se agrega;
Las Fig. 2a y 2b muestran diagramas esquemáticos de un apósito que incorpora una LVCC (no de la invención);
La Fig. 3 muestra un diagrama esquemático de un apósito con múltiples bacteriófagos en un patrón identificable (no de la invención);
La Fig. 4a muestra estadísticas de heridas para animales con heridas profundas infectadas con 70 µl de 1 x 10^5 cfu/ml E15 suspendido en mucina gástrica de cerdo al 5% usando LVCC normal o tratado con bacteriófago -7 días después de la cirugía;
La Fig. 4b muestra la carga bacteriana para animales con heridas profundas infectadas con 70 ml de 1 x 10^5 CFU/ml E15 suspendido en mucina gástrica de cerdo al 5% usando LVCC normal o tratado con bacteriófago -7 días después de la cirugía;

La Fig. 5 muestra la eliminación de MRSA por bacteriófago inmovilizado sobre suturas recuperadas de ratas 14 días después de la inserción en heridas infectadas;
La Fig. 6a muestra la estabilidad conferida por LVCC contra la desecación; La figura 6b muestra la estabilidad conferida por LVCC contra la radiación ultravioleta;
La Fig. 6c muestra la estabilidad conferida por LVCC contra la temperatura;
La Fig. 7 muestra la supervivencia de bacteriófagos inmovilizados en el suelo;
La Fig. 8 muestra la exposición de LVCC con dos bacteriófagos a dos especies bacterianas, cada una susceptible a uno de los bacteriófagos;
La Fig. 9 muestra una vista lateral externa de un sitio de herida de control infectado el día 14;
La Fig. 10 muestra una vista interna dorsal de un sitio de herida de control infectado el día 14;
La Fig. 11 muestra una vista lateral externa de un sitio de la herida tratado con un filamento de acuerdo con la invención el día 14;
La Fig. 12 muestra una vista interna dorsal del sitio de la Fig. 11, que muestra inflamación reducida y formación de pus reducida dentro del músculo paraespinoso en el día 14.
La Fig. 13 muestra semillas de tomate germinadas (control);
La Fig. 14 muestra semillas de tomate germinadas con fago inmovilizado en las superficies de semilla de acuerdo con la invención;
La Fig. 15 muestra semillas de tomate germinadas tratadas con descarga en corona (pero sin fago);
La Fig. 16 muestra semillas de tomate germinadas tratadas con fago libre; y
La Fig. 17 muestra la eliminación de bacterias alrededor de partículas de celulosa de acuerdo con la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1 - Eficacia de LVCC para el suministro de bacteriófagos para contrarrestar la infección profunda de la herida.

[0089] La Figura 1 muestra esquemáticamente una LVCC (1) presionada sobre una herida (4) en un tejido (3) mediante un apósito (2).

[0090] La Figura 2a es un apósito invertido que incorpora una LVCC, que se muestra en sección transversal. Una bolsa (5) encierra una LVCC (6) adherida al apósito (7), que tiene la superficie superior del apósito (8), por lo tanto, está invertida en la figura.

[0091] La Figura 2b muestra esquemáticamente una LVCC (9) tejido en un vendaje (10). Los dos filamentos (9a y 9b) son de diferentes colores y tienen diferentes bacteriófagos unidos. La Figura 3 muestra otro esquema de un apósito (11) en donde se incorpora un filamento con fago unido (12).

[0092] En un primer ejemplo, la efectividad de una LVCC para administrar bacteriófagos, para contrarrestar la infección bacteriana dentro de un ambiente infectado de heridas profundas usando un modelo in vivo se demuestra. Las heridas profundas que penetraron en varias capas de tejido y se infectaron a todos los niveles con Staphylococcus aureus resistente a la meticilina (MRSA) (E15) se trataron con una LVCC compuesta por bacteriófagos activos contra las cepas MRSA infectantes.

[0093] Los bacteriófagos se inmovilizaron en un filamento de polímero de nailon sintético similar al utilizado en la fabricación de suturas de cierre de heridas. Las heridas infectadas se cerraron usando la LVCC como sutura, en varios niveles. La LVCC filamentosa tenía bacteriófagos anti-MRSA inmovilizados en su superficie (la LVCC prototipo a ser probada) o no (control).

[0094] En todos los sujetos tratados con la LVCC, la infección fue controlada y la disminución (como se demuestra visualmente y por recuento de bacterias (*ver Figuras 4a y 4b)* con la cicatrización de heridas de proceder normalmente. Por contraste, el crecimiento de MRSA en el control de los sujetos procedido resultante sin comprobar en una herida inflamada supurante que no se cure.

[0095] Los resultados muestran que, utilizando las LVCC, los bacteriófagos pueden ofrecer un efecto bactericida potente para un período prolongado en un modelo *in vivo* - ver las Tablas 1A y 1B.

Ejemplo 2 - Estabilidad extendida

[0096] LVCC recogidas de sujetos infectados fueron lavados y almacenados a 4°C y evaluados periódicamente para la actividad antimicrobiana continua contra MRSA cultivado in vitro. En una serie de experimentos se mantuvo la actividad anti-MRSA como lo demuestra la LVCC colocada dentro de un conjunto de bacterias. Actividad bacteriófaga (como se muestra en el espacio alrededor de las LVCC recogidas) se extendió durante varias semanas después del almacenamiento - ver figura 5.

Ejemplo 3 - Estabilidad conferida por LVCC contra desecación, radiación Ultra Violeta y temperatura

[0097] En estos ejemplos LVCC se generaron utilizando fibras de polímero nilon o algodón activado como el sustrato de soporte. Los CCV con bacteriófagos unidos se expusieron a una serie de condiciones ambientales, incluida la deshidratación, que se muestra por el efecto de la humedad relativa en la supervivencia de los bacteriófagos (ver figura 6a), la luz ultravioleta (ver figura 6b) y la temperatura elevada (ver figura 6c), todas las condiciones conocidas por desnaturalizar bacteriófagos libres.

[0098] Tres tiras de fagos 2x1 cm se colocaron en agar LBM y se expusieron a la luz UV en el armario estéril durante 5, 15 y 30 min. Las tiras se volvieron y se colocaron en un área fresca de agar y se repitió la exposición a los rayos UV. Las tiras de fagos de control se trataron de manera similar, pero se protegieron de los rayos UV. Las tiras se transfirieron luego a 15 ml de caldo LB, se inocularon con 50 *ul de* suspensión de *Staphylococcus aureus* y se incubaron.

Resultados - véase la Tabla 2

[0099] *Conclusión:* Se adjunta fago puede soportar hasta 30 minutos de exposición a los rayos UV del armario. Las células bacterianas de S. *aureus* son destruidas por 5 minutos de exposición a la fuente UV.

Ejemplo 4 - Viabilidad sostenida en entornos extremos

[0100] En este ejemplo, se determinó la estabilidad y viabilidad mejoradas del bacteriófago LVCC después de la exposición a las condiciones astringentes proporcionadas por el suelo. El estudio incluyó la construcción de dos tipos de LVCC utilizando bacteriófagos inmovilizados en un polímero de nilon o celulosa. Luego, cada LVCC se enterró en suelo no esterilizado o esterilizado y se tomaron muestras durante un período de tres semanas para evaluar la actividad antibacteriana de la LVCC.

[0101] Los resultados muestran una mayor supervivencia del bacteriófago para ambos tipos de bacteriófagos de LVCC en comparación con el bacteriófago libre (ver figura 7).

Ejemplo 5 - LVCC compuesto por bacteriófagos múltiples

[0102] La evaluación del rendimiento de LVCC utilizando dos bacteriófagos activos contra dos bacterias diana diferentes después de inmovilización en un sustrato portador común y probado para actividad antibacteriana. El porcentaje de limpieza en el césped bacteriano se basa en la limpieza promedio de cada fago en su cepa huésped medida en mm).

[0103] Los resultados no muestran disminución en la actividad antibacteriana, con bacteriófagos de LVCC que permanecen activos contra ambos bacteria diana (ver figura 8). La exposición del material tratado a 2 especies bacterianas (1 huésped, 1 no huésped) todavía da como resultado la eliminación de los huéspedes susceptibles.

Ejemplo 6 - Tratamiento de heridas profundas

[0104] En 10 animales de control (ratas), una incisión profunda en el músculo paraespinoso se infectó con 100 µl de 5 X 10^7 cfu/ml de E15 MR15 suspendido en mucina gástrica de cerdo al 5% y la herida se cerró con suturas normales. Los 10 animales de prueba con la misma incisión recibieron 100 µl de 5 X 10^7 CFU/ml de E15 MR15 suspendido en mucina gástrica de cerdo al 5% y se insertó un filamento tratado con bacteriófago en la herida profunda. El bacteriófago inmovilizado fue el fago K.

[0105] Todos los animales fueron tratados con analgésicos después de la cirugía y observados a intervalos por hora durante las primeras 12 horas y a intervalos de 3 horas durante las siguientes 12 horas, luego a intervalos de 6 horas durante los siguientes 2 días después de la cirugía. infección y dos veces al día a partir de entonces.

[0106] Sitios de la herida se examinaron en estos intervalos de tiempo en busca de signos de inflamación e infección (formación de pus) hasta a 14 días. Los resultados visuales se presentan en la Tabla 3.

[0107] Con referencia a la Fig. 9, que muestra el control infectado: como se ve, el sitio permaneció grande e hinchado y estaba mal curado, con un sitio de incisión elevado el día 14. Cuando se abrió, como se muestra en la Fig. 10, se reveló un sitio de incisión lleno de pus.

[0108] El uso de un filamento de prueba con bacteriófagos unidos se muestra en la Fig. 11. Este fue un sitio de incisión bien curado con inflamación mínima en el día 14. El sitio interno exhibió una inflamación reducida en el sitio de la herida y una formación de pus reducida en el músculo paraespinoso en el día 14.

Ejemplo 7 - Inmovilización de bacteriófagos en semillas de tomate

Preparación de bacteriófagos

[0109] Cultivamos cepas *Erwinia carotovora* en caldo de soja tríptico al 20% (otro medio adecuado es conocido también) y se infectó el cultivo con un bacteriófago lítico en la fase logarítmica de crecimiento. Cuando se produjo la lisis, purificamos los bacteriófagos por centrifugación y lavamos el sedimento de bacteriófagos tres veces volviendo a suspenderlos en agua destilada y concentrándolos por centrifugación.

Tratamiento de corona

[0110] Las semillas de tomate se trataron con un campo de corona a 75 kV durante 1 segundo, luego se sumergieron en la suspensión de bacteriófagos (una alternativa es rociar las semillas tratadas con la suspensión de bacteriófagos). Lavamos las semillas con agua tres veces para eliminar los bacteriófagos no unidos (una alternativa es que se aplique la suspensión de bacteriófagos a las semillas antes del tratamiento de corona). Tenga en cuenta que otras intensidades de campo también son efectivas y el lavado solo es necesario para demostrar que los efectos antibacterianos observados son producidos por bacteriófagos unidos covalentemente en lugar de bacteriófagos "libres" adsorbidos.

Germinación

[0111] Así preparamos semillas que fueron (i) no tratadas, (ii) tratadas con descarga en corona, (iii) tratadas con descarga en corona en presencia de bacteriófagos y (iv) tratadas con bacteriófagos libres, y germinaron las semillas en papel humedecido con agua en un plato a temperatura ambiente (una alternativa para germinar en agar de soja tríptico (caldo con agar al 2%) con y sin *Pectobacterium).*

Resultados

[0112] Las semillas de tomate mostraron una germinación mejorada con corona (Fig. 15) y corona con fagos anti-*pectobacterias* (Fig. 14) en comparación con el control (Fig. 13, sin corona) y sin fago (Fig. 16). Se verán zonas de limpieza alrededor de las semillas tratadas con fagos corona y anti-*Pectobacterium* en agar inoculado con cepas de *Pectobacterium* adecuadas (susceptibles a los bacteriófagos utilizados). La superficie de la semilla de tomate es en gran parte celulosa y luego probamos por separado la viabilidad del bacteriófago inmovilizado en partículas de celulosa - ver más abajo.

Ejemplo 8 - Ensayo de patógeno de plantas *in vivo*

[0113] Inmovilizamos fagos de Pectobacterium en polvo de celulosa (rango de tamaño de aproximadamente 100 micrómetros - 1 mm) siguiendo los métodos de descarga en corona del documento WO2007/072049.

[0114] Inoculamos una placa de agar con cepas de Pectobacterium adecuadas (susceptibles a los bacteriófagos utilizados) y añadimos partículas de celulosa tratadas en tres ubicaciones.

[0115] En referencia a los resultados mostrados en la Fig. 17, se puede ver la limpieza alrededor de las partículas de polvo que muestra la actividad contra las bacterias de podredumbre blanda de los bacteriófagos inmovilizados. Este bacteriófago viable confirmado se unió al material de celulosa.

Ejemplo 9 - Bacteriófago en partículas de celulosa

[0116] Inmovilizamos fagos de Pectobacterium en polvo de celulosa (rango de tamaño de aproximadamente 100 micras - 1 mm) siguiendo los métodos de descarga en corona del documento WO2007/072049.

[0117] Inoculamos placas de agar con cepas de Pectobacterium adecuadas (susceptibles a los bacteriófagos utilizados) y añadimos partículas de celulosa tratadas en tres ubicaciones.

[0118] Se han tratado placas con (i) nada = control, (ii) el fago libre en solución y (iii) el fago unido a las partículas de celulosa en solución, y se valoró (ii) y (iii) hasta observarse una actividad similar en bacterias. Se produjo una actividad similar cuando se usaron aproximadamente 100 fagos libres en comparación con 1 fago unido a una partícula de celulosa. Esto confirmó las propiedades mejoradas del fago inmovilizado en comparación con el fago libre.

Ejemplo 10 - Tratamiento de patatas

[0119] Los tubérculos de patata se trataron con (I) agua estéril = control, (ii) fago libre y (iii) fago específico para la bacteria responsable de la "pata negra" de patata inmovilizada en partículas de celulosa como por ejemplos 8 y 9. Los tubérculos se rociaron con solución y se dejaron secar.

[0120] Se plantaron tubérculos y se registró el crecimiento como número de plantas, número total de tallos y número de plantas infectadas con Blackleg. Los resultados se muestran en la Tabla 4.

[0121] Por lo tanto, encontramos que el tratamiento con *Pectobacterium* y la pulverización con agua (+ve control)

tenían el menor número de plantas y tallos emergentes con mayor incidencia de patas negras, en comparación con los otros tratamientos.

[0122] El tratamiento con el fago libre tuvo poco efecto sobre el número total de plantas emergidas.

[0123] Hubo un aumento en el número de tallos por planta en comparación con el +ve control.

[0124] Solo un tratamiento de plantas con fago libre tuvo síntomas de pata negra.

[0125] El tratamiento con el fago inmovilizado aumentó el número de tallos por planta en comparación con el control, así como el número de plantas emergió. En las últimas observaciones, 8 semanas después de la siembra, no se habían observado síntomas de patas negras en los tubérculos tratados con fagos inmovilizados, lo que demuestra la persistencia de la actividad antibacteriana.

Tabla 1A

Resultados visuales de heridas tratadas con LVCC no tratada o LVCC no tratada infectada con 100 µL 10^8 cfu/E15 suspendido en mucina gástrica de cerdo al 5%		
Suturas no tratadas		
Nº de animales	Procedimiento	Observaciones visuales
3	Solo incisión (control negativo)	Sin hinchazón o inflamación. Apariencia ligeramente elevada con presencia de líquido transparente internamente
4	Incisión infectada con 100 µl 10^7 cfu/ml E15 y mucina gástrica de cerdo (control positivo)	Bulto duro significativamente elevado con presencia de pus necrótico grueso y oscuro internamente

Tabla 1B

Resultados visuales de heridas tratadas con LVCC no tratado o tratado con bacteriófagos y 100 µl de 5 X 10^7 cfu/ml E15 suspendido en mucina gástrica de cerdo al 5%		
Suturas no tratadas		
Nº de animales	Apariencia de la herida	Observación interna
10	Bulto grande e hinchado duro	Formación de pus oscura
LVCC tratada con bacteriófagos		
10	Pequeño, elevado, hinchazón	Sitio de incisión transparente y lleno de líquido

Tabla 2

(Actividad de fagos (P) indicada por caldo claro. Crecimiento bacteriano (+) por caldo turbio)

	Tiras expuestas			Tiras protegidas		
	r1	r2	r3	r1	r2	r3
UV (min)						
5	P	P	P	P	P	P
15	P	P	P	P	P	P
30	P	P	P	P	P	P

Tabla 3

Resultados visuales de heridas tratadas con filamentos no tratados o tratados con bacteriófagos		
Filamentos sin tratar		
Nº de animales	**Apariencia de la herida**	**Observación interna**
10	Bulto hinchado grande e duro	Formación de pus oscura
Filamentos tratados con bacteriófagos		
10	Pequeño, elevado, hinchazón	Sitio de incisión transparente y lleno de líquido

REIVINDICACIONES

1. Material vegetal seleccionado de semillas, raíces y tubérculos a los que el bacteriófago se ha unido covalentemente, en donde el bacteriófago se une al material vegetal mediante la activación del material de plantas y luego unir el bacteriófago al material vegetal activado, y en donde el bacteriófago retiene la infectividad.

2. Material vegetal según la reivindicación 1, siendo semillas para consumo o reserva de semillas.

3. Material vegetal según la reivindicación 2, siendo semillas de tomate.

4. Material vegetal según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el bacteriófago está unido covalentemente a una partícula y la partícula está unida covalentemente al material vegetal.

5. Material vegetal según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, para su uso en la prevención o el tratamiento de una enfermedad vegetal.

6. Material vegetal según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, para su uso en la prevención o el tratamiento de una enfermedad en una criatura que come el material vegetal.

7. Material vegetal para uso según la reivindicación 6, para uso en prevención o tratamiento de infecciones bacterianas en el tracto gastrointestinal.

8. Material vegetal para uso de acuerdo con la reivindicación 6 o 7, para uso en prevención o tratamiento de enfermedades aviarias, en donde el material vegetal es una semilla.

9. Un método para tratar material vegetal seleccionado de semillas, raíces y tubérculos, que comprende activar el material vegetal y luego unir covalentemente el bacteriófago al material vegetal activado, en donde el bacteriófago retiene la infectividad.

10. Un método de acuerdo con la reivindicación 9, en donde el material vegetal comprende semillas para consumo o reserva de semillas.

11. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 10, que comprende unir covalentemente el bacteriófago a una partícula o partículas y unir covalentemente la partícula o partículas al material vegetal.

12. El material vegetal tratado mediante un método que comprende los pasos de llevar una preparación acuosa de partículas a las cuales los bacteriófagos se unen covalentemente en contacto con el material vegetal y secar la combinación para unir las partículas al material vegetal, en donde el material vegetal se selecciona de frutas, verduras, hojas, tallos, flores, raíces, tubérculos y plántulas para tratar o prevenir una enfermedad en una criatura que come material vegetal.

13. Una composición que comprende material vegetal según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.

14. Alimento para animales o aves que comprende material vegetal para usar en el tratamiento o prevención de una enfermedad en una criatura que come el alimento, preparado tratando el alimento para unir partículas a las que los bacteriófagos están unidos covalentemente.

15. Alimento para animales o aves para uso de acuerdo con la reivindicación 14, en donde el alimento está en forma de una torta o gránulo.

16. Alimento para animales o aves para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 14 o 15, en donde las partículas están hechas de: (1) polímeros con grupos superficiales amino o carboxilo; o (2) celulosa u otros polímeros que contienen hidroxilo.

17. Alimento para animales o aves para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 14 a 16, en donde el alimento se puede obtener combinando una preparación acuosa que contiene las partículas con el alimento y secando el alimento para unir las partículas.

18. Alimento para animales o aves para uso según cualquiera de las reivindicaciones 14 a 16, en donde el alimento se puede obtener combinando una preparación seca que contiene las partículas con el alimento.

19. Material vegetal para su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad en una criatura que come el material vegetal, en donde el material vegetal se selecciona de frutas, verduras, hojas, tallos, flores, raíces, tubérculos y plántulas, el material vegetal comprende partículas para qué bacteriófagos están unidos covalentemente y cuáles se han adherido al material vegetal mediante secado.

20. Una composición que comprende un vehículo seleccionado de (i) un filamento, (ii) un material plano y (iii) partículas y/o perlas, y bacteriófagos unidos covalentemente al mismo para su uso en el tratamiento o prevención de infección bacteriana en una herida profunda, en donde la composición se localiza en una herida profunda que luego se cierra, y en donde el bacteriófago retiene la infectividad.

21. Una composición para uso de acuerdo con la reivindicación 20, en la que el vehículo es biodegradable y/o biocompatible.

22. Una composición para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 20 o 21, en la que el vehículo es un filamento.

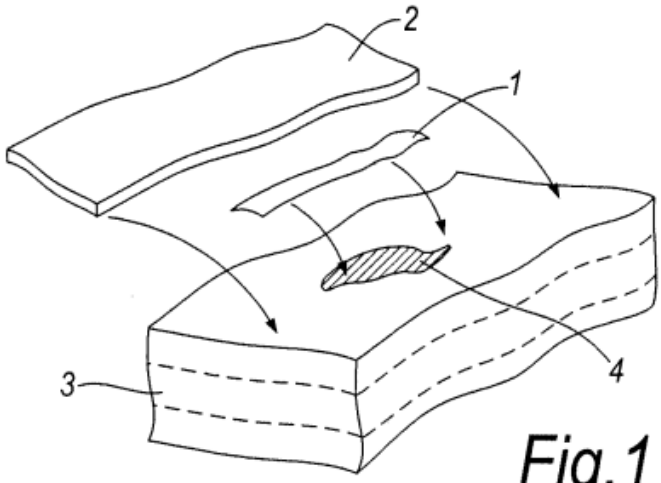


Fig.1

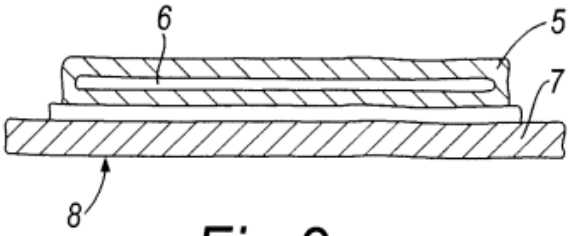


Fig.2a

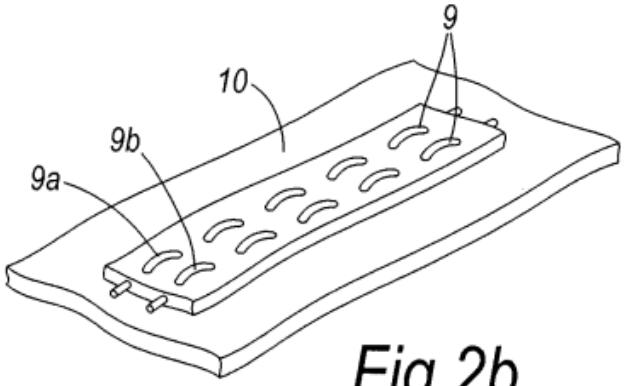


Fig.2b

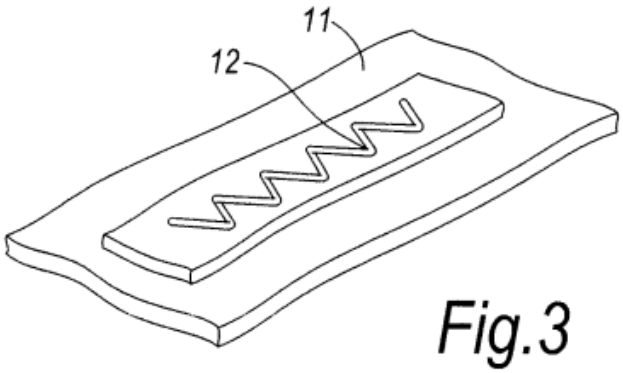


Fig.3

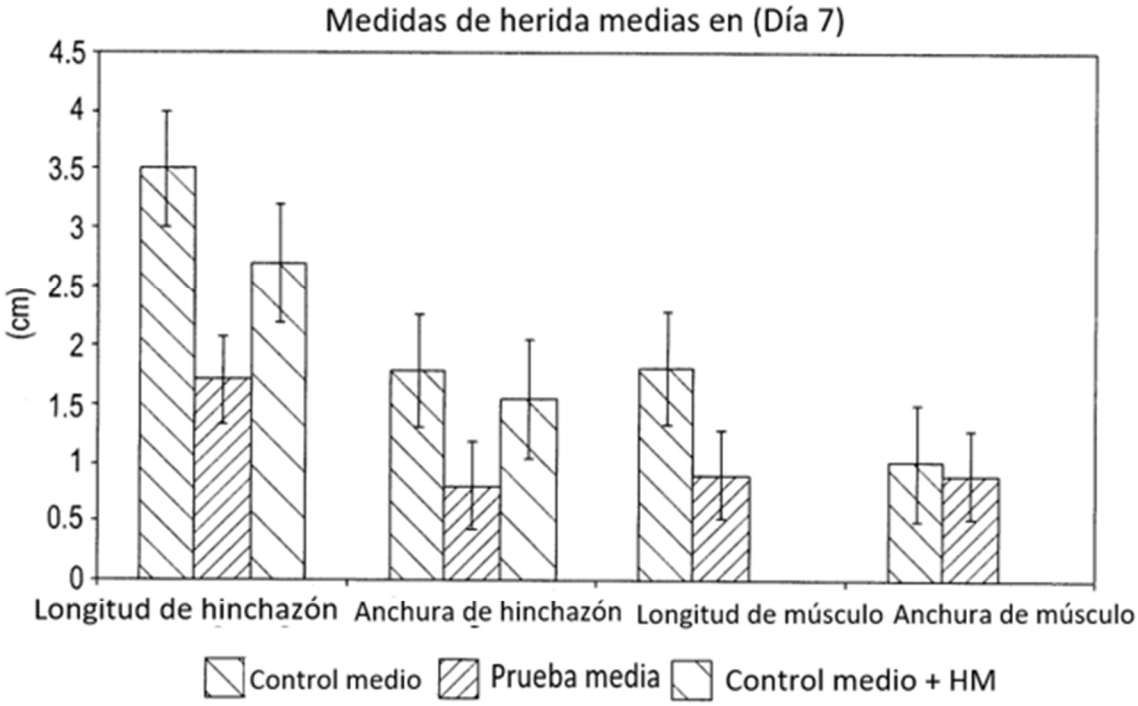

Medidas de herida medias en (Día 7)
4.5
4
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
(cm)
Longitud de hinchazón
Anchura de hinchazón
Longitud de músculo
Anchura de músculo
Control medio
Prueba media
Control medio + HM

Fig.4a

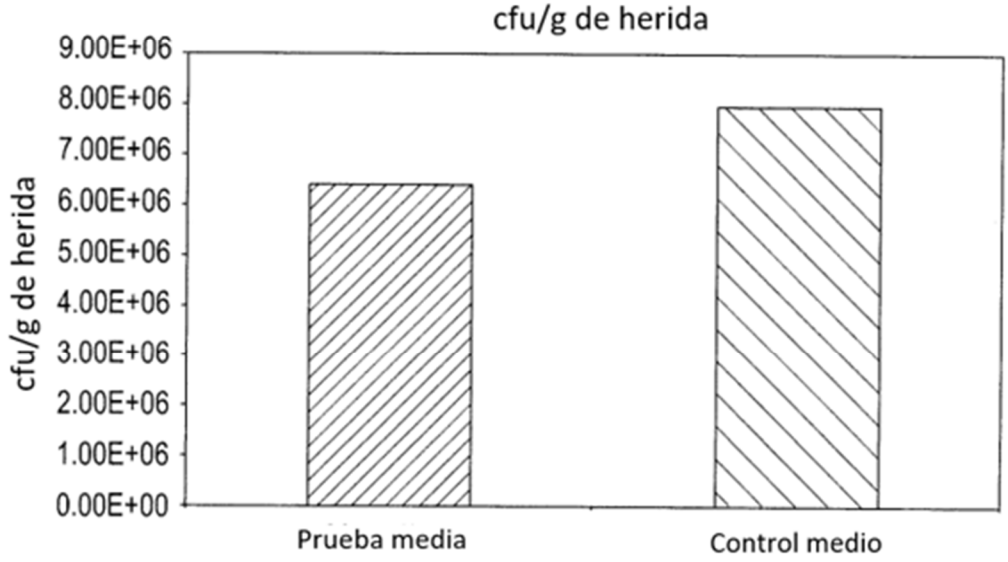

cfu/g de herida
9.00E+06
8.00E+06
7.00E+06
6.00E+06
5.00E+06
4.00E+06
3.00E+06
2.00E+06
1.00E+06
0.00E+00
cfu/g de herida
Prueba media
Control medio

Fig.4b

Fig.5

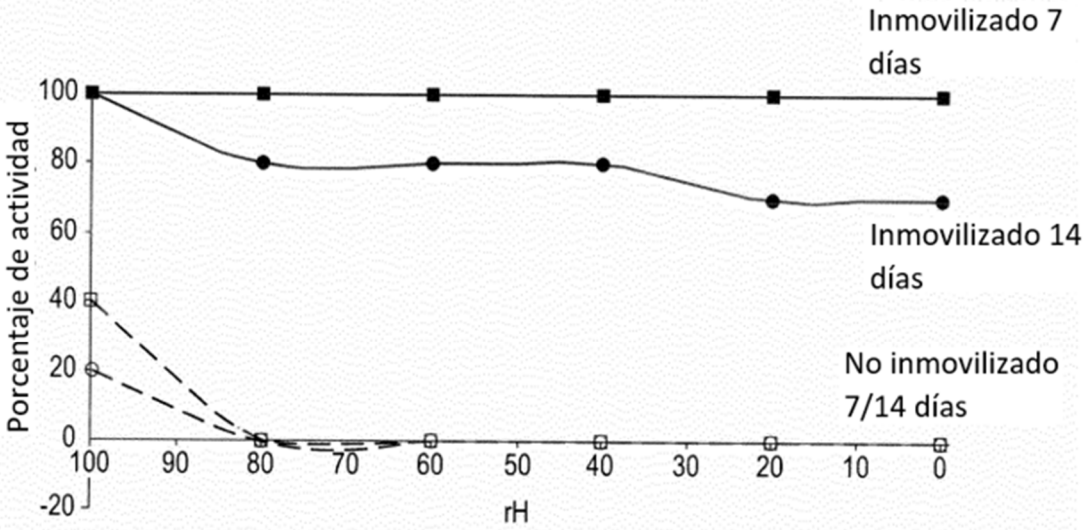
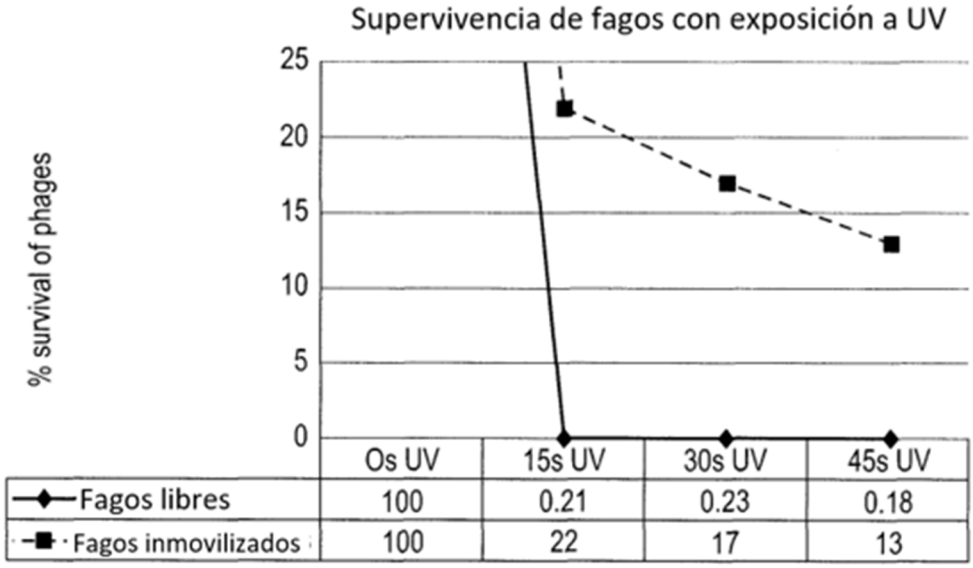

Inmovilizado 7 días
Inmovilizado 14 días
No inmovilizado 7/14 días
Porcentaje de actividad
100
80
60
40
20
0
-20
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
rH

Fig.6a



	Os UV	15s UV	30s UV	45s UV
Fagos libres	100	0.21	0.23	0.18
Fagos inmovilizados	100	22	17	13

Fig.6b

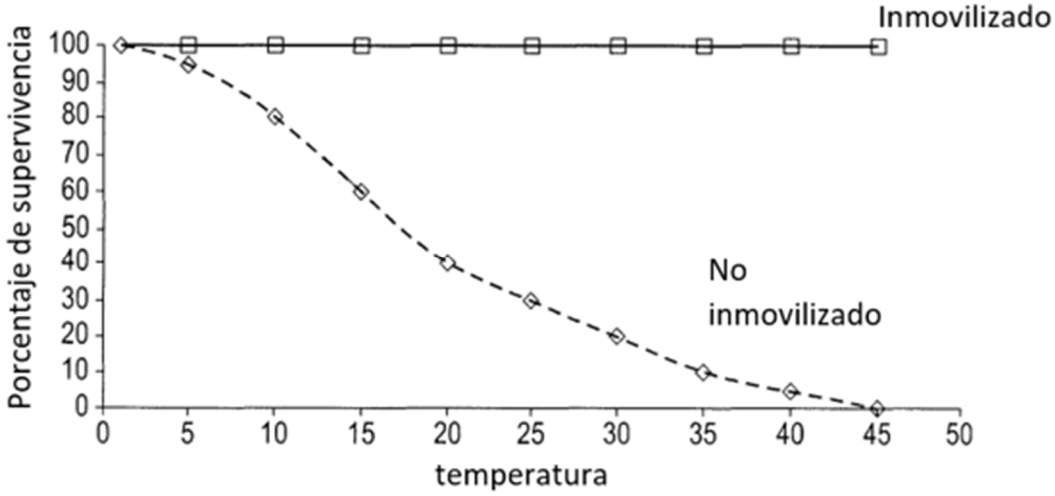


Fig.6c

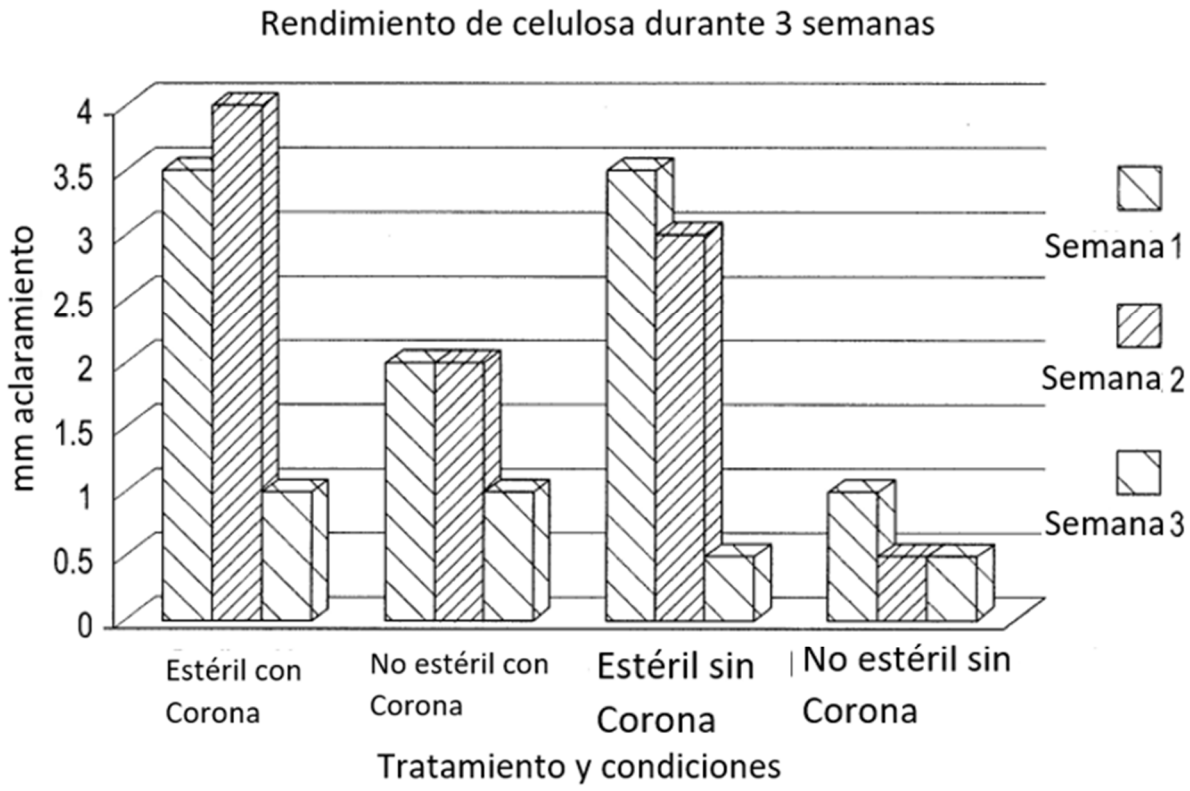

Rendimiento de celulosa durante 3 semanas
mm aclaramiento
4
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
Semana 1
Semana 2
Semana 3
Estéril con Corona
No estéril con Corona
Estéril sin Corona
No estéril sin Corona
Tratamiento y condiciones

Fig.7

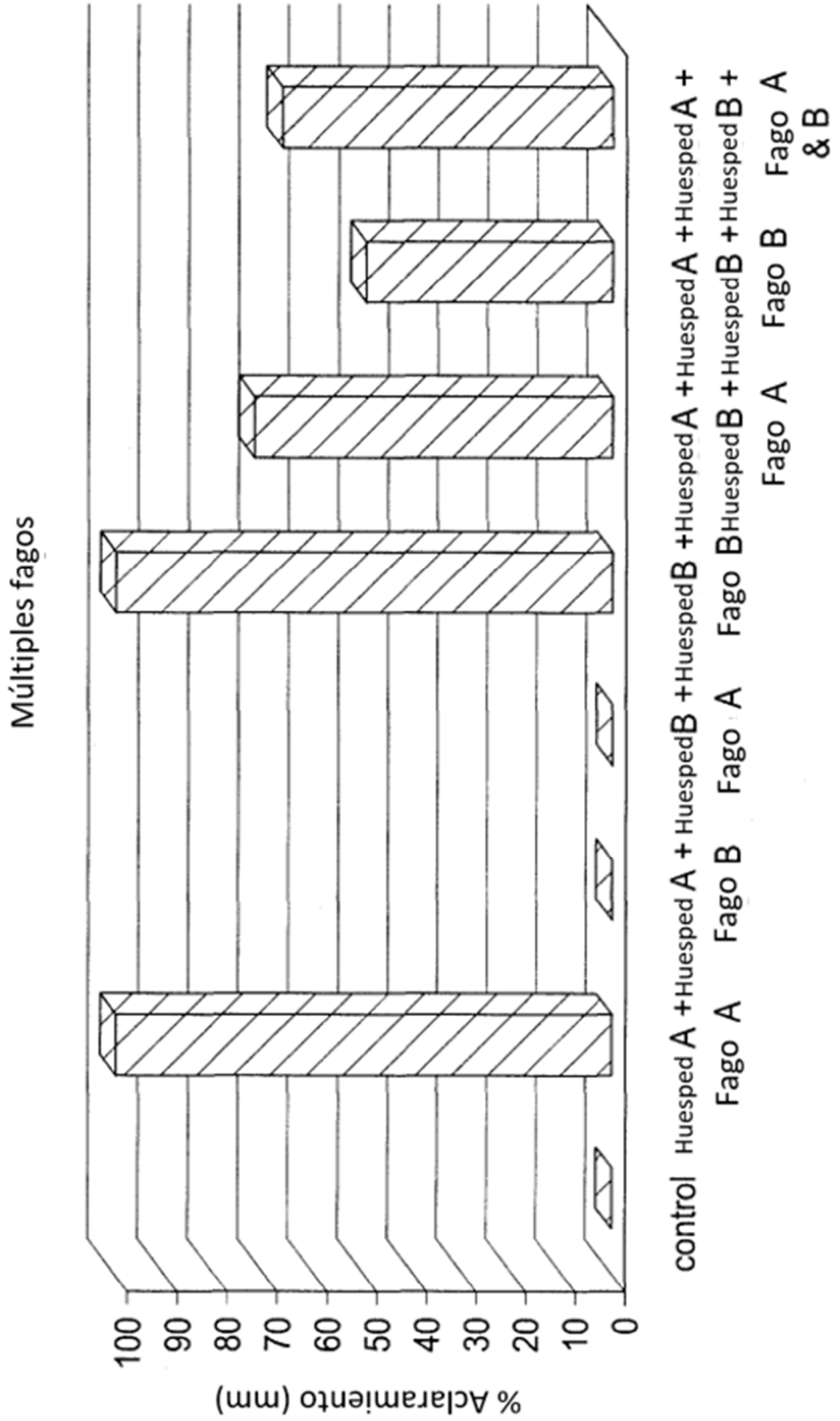

Múltiples fagos
% Aclaramiento (mm)
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
control
Huesped A +Huesped A + Fago A
Huesped B +Huesped B + Fago B
Huesped A +Huesped A + Fago A
Huesped B +Huesped B + Fago B
Huesped A +Huesped A + Huesped B + Fago A & B
Combinación huesped/fago

Fig.8

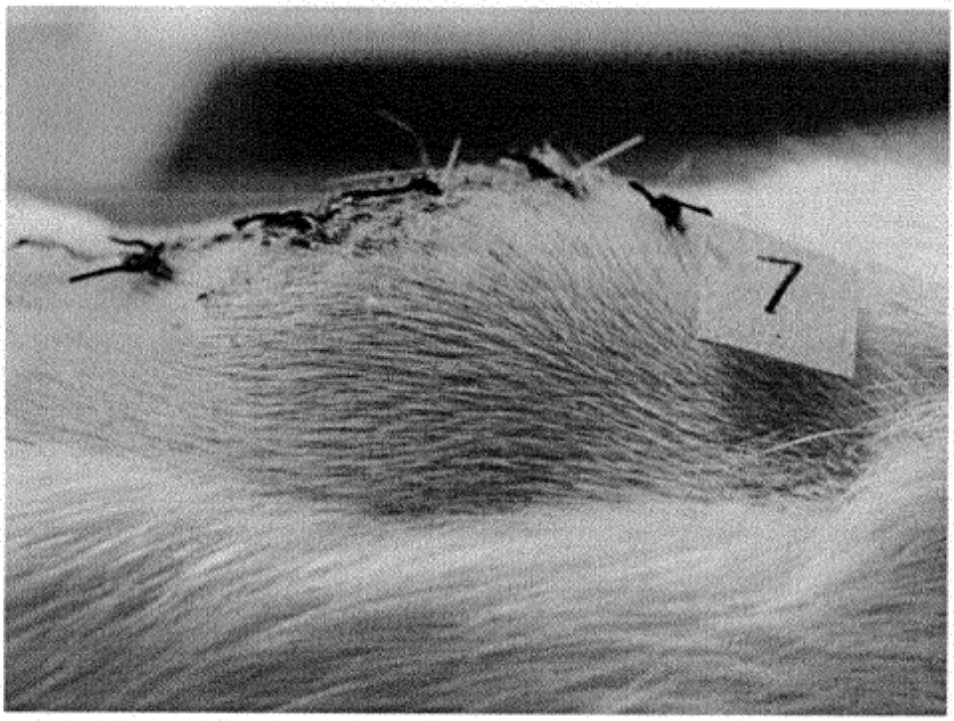


Fig.9

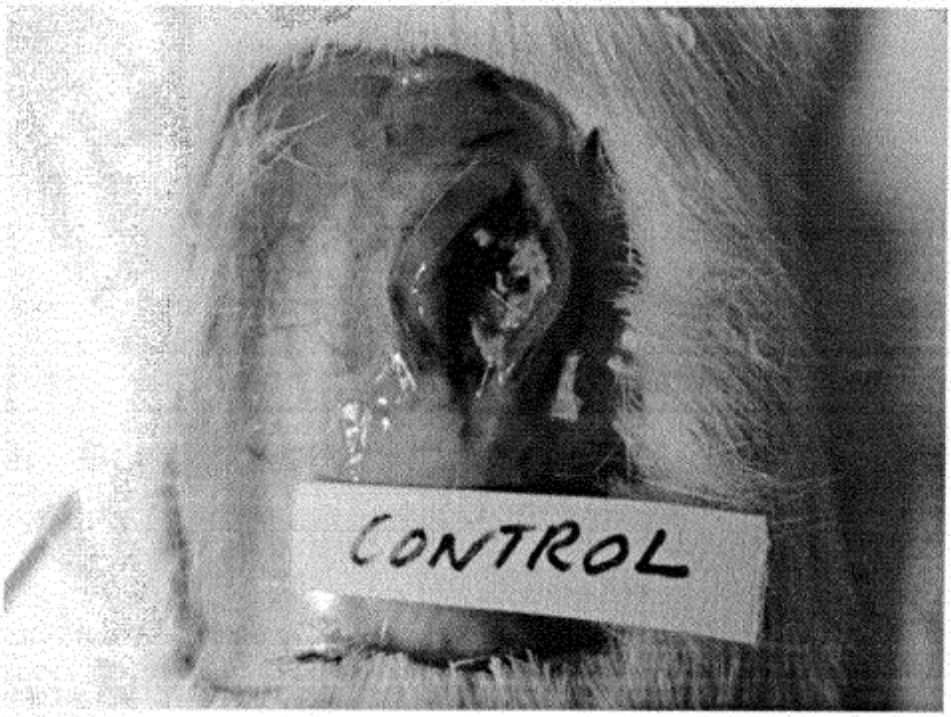


Fig.10

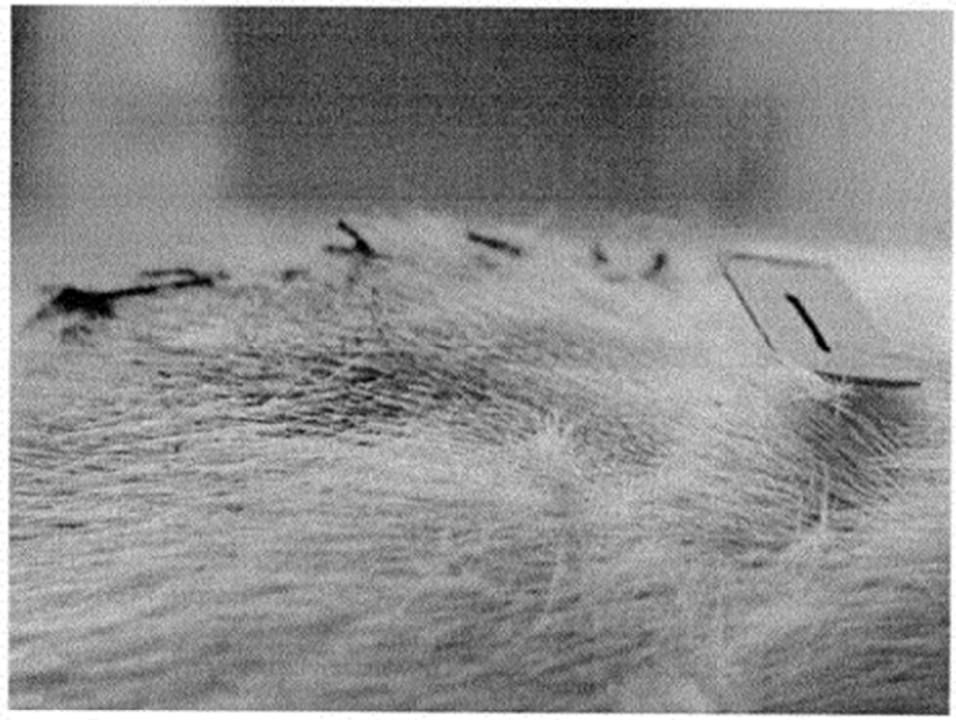


Fig.11

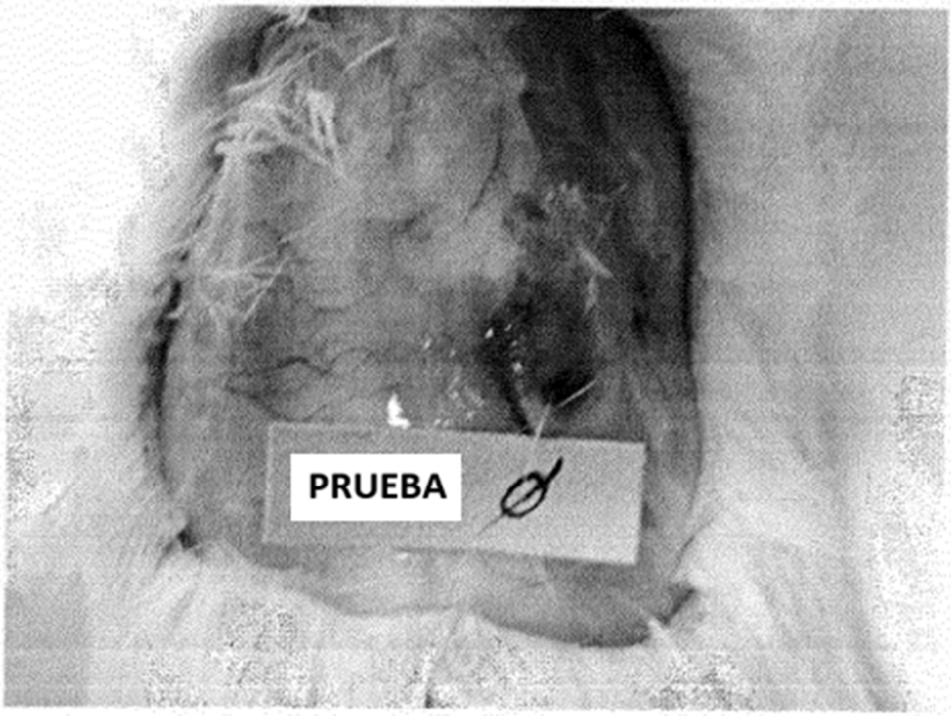


Fig.12

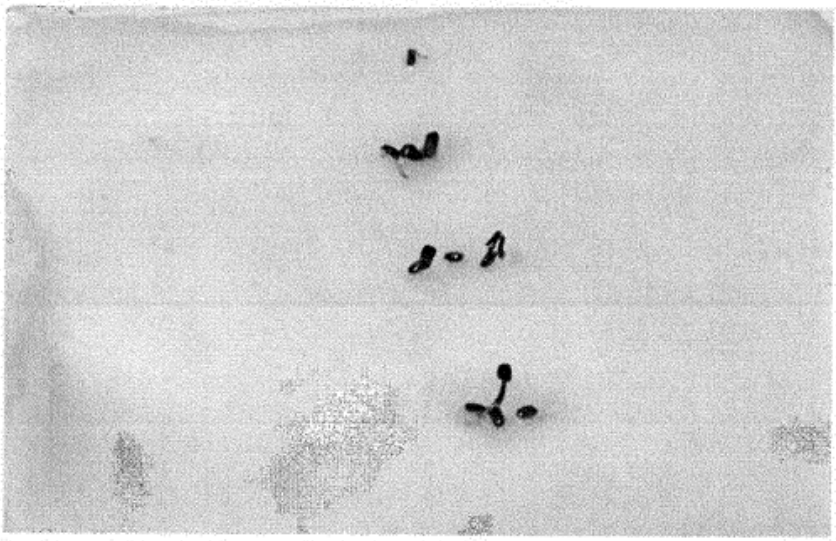


Fig.13

Fig.14

Fig.15

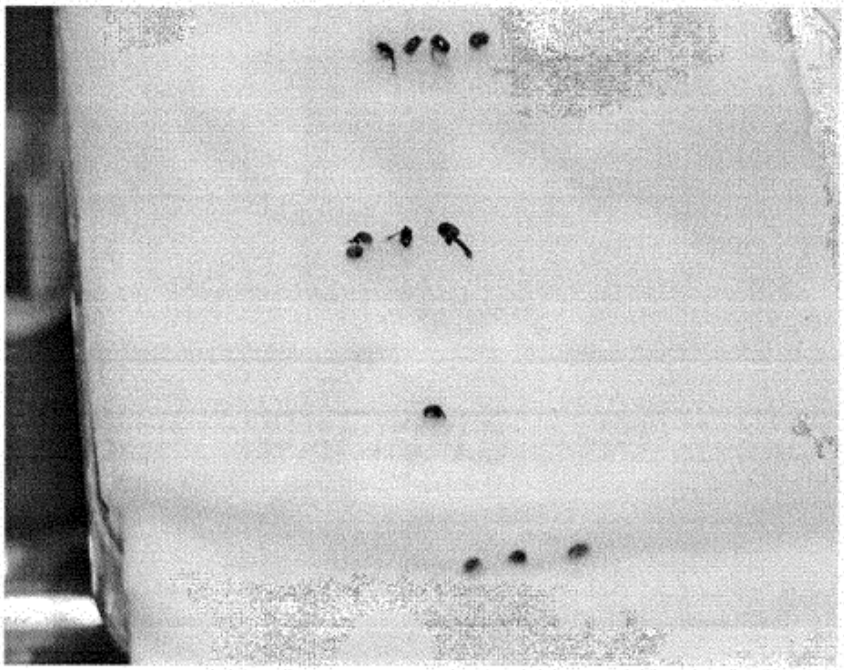


Fig.16

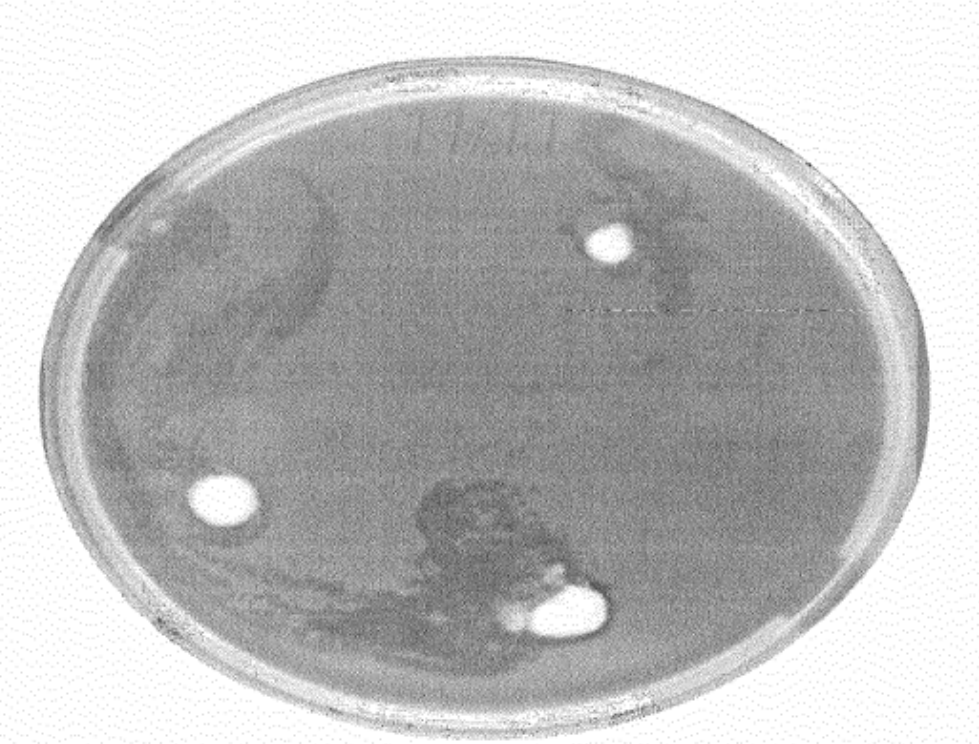


Fig.17