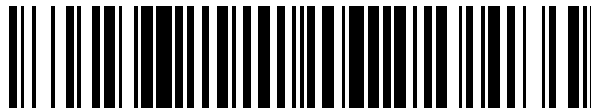


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 429 125**

51 Int. Cl.:

C12N 15/76 (2006.01)

A61K 35/76 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.09.2009 E 09753232 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.07.2013 EP 2344642**

54 Título: **Cepas novedosas de bacteriófagos para el tratamiento de infecciones bacterianas, especialmente cepas farmacorresistentes del género Enterococcus**

30 Prioridad:

29.09.2008 PL 38617508

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

13.11.2013

73 Titular/es:

**INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII
DOSWIADCZALNEJ POLSKIEJ AKADEMII NAUK
(100.0%)
Ul. Rudolfa Weigla 12
53-114 Wroclaw, PL**

72 Inventor/es:

**WEBER-DABROWSKA, BEATA y
GÓRSKI, ANDRZEJ**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 429 125 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

Cepas novedosas de bacteriófagos para el tratamiento de infecciones bacterianas, especialmente cepas farmacorresistentes del género *Enterococcus*

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a cepas novedosas de bacteriófagos y a su uso en el tratamiento de infecciones bacterianas, particularmente con cepas de bacterias farmacorresistentes del género *Enterococcus*.

Técnica anterior

10 Los bacteriófagos (fagos) componen un grupo variado de virus cuyo ciclo vital está conectado exclusivamente con células bacterianas. Los bacteriófagos se caracterizan por un ciclo vital lítico o lisogénico. Los bacteriófagos líticos son muy útiles como agentes antibacterianos que replican en las bacterias sensibles que infectan causando su completa destrucción (lisis), y los nuevos fagos atacan y destruyen entonces las células bacterianas posteriores. Este proceso aparece tanto *in vitro* como *in vivo*.

15 Una de las características significativas de los bacteriófagos es la especificidad conocida habitualmente de su actividad lítica. Esta característica se usa, por ejemplo, en el tipado de bacterias (para ejemplos, véanse las descripciones de patente GB 2285684, US 5824468, SU 543260 y las solicitudes de patente internacional WO 0100786, WO 0109370). Otros usos conocidos de bacteriófagos engloban: el uso de bacteriófagos como herramientas en biología molecular útiles en la expresión y selección de proteínas deseables (concretamente, la descripción de patente US 6027930), el uso de fagos en productos de esterilización y limpieza (concretamente, las descripciones de patente EP 0414304, EP 0290295, GB 2253859 así como las descripciones de patente internacional WO 9808944 y WO 9003122). Se han usado fagos modificados en la producción de vacunas (concretamente, el documento. WO 9505454). Se usan también una serie de proteínas de bacteriófagos (concretamente, los documentos EP 0510907, US 5470573, WO 9607329). Los procedimientos de aislamiento de bacteriófagos y producción de preparaciones de fago son bien conocidos y están continuamente mejorando [concretamente, los documentos GB 829266, CS 192212, RU 2109055).

25 La fagoterapia ha sido usada tan antiguamente como en la 2ª GM en el "Institute of Microbiology and Virology" de Tiflis (Georgia). Se usan allí agrupaciones de diversas preparaciones de fagos en el tratamiento y profilaxis de infecciones bacterianas. Los datos disponibles muestran la gran eficacia de la fagoterapia. Se han efectuado investigaciones similares en Polonia, en el "Bacteriophage laboratory of the Institute of Immunology and Experimental Therapy" en Breslavia, en que se ha investigado la fagoterapia de infecciones con bacterias farmacorresistentes y bacterias inmunes a antibióticos durante 25 años (véase: Stefan Ślopek *et al.*, Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis, 1981, 31, 293; Stefan Ślopek *et al.*, Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis, 1983, 31, 267; Stefan Ślopek *et al.*, Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis, 1984, 32, 317; Stefan Ślopek *et al.*, Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis, 1985, 33, 219; Stefan Ślopek *et al.*, Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis, 1985, 33, 241; Stefan Ślopek *et al.*, Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis, 1987, 35, 569; Beata Weber-Dąbrowska *et al.*, Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis, 2000, 48, 31-37; Beata Weber-Dąbrowska *et al.*, Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis, 2000, 48, 547-551).

35 La descripción de patente P-370662 se refiere a cepas de bacteriófagos multivalentes, a procedimientos para producirlas y al uso en el tratamiento de infecciones bacterianas, particularmente cepas farmacorresistentes de *Pseudomonas* y *Staphylococcus*.

40 La publicación internacional nº WO 0069269 describe el uso de fagos específicos, designados ENB6 y ENB13, útiles para curar a pacientes infectados con *Enterococcus faecalis* resistente a vancomicina y *Enterococcus faecalis* sensible a vancomicina. El genoma de una de las cepas de fago, ENB6, se ha secuenciado parcialmente, y se muestra que no contiene secuencias nucleotídicas de genes de virulencia bacteriana conocidos o del módulo de resistencia a vancomicina.

45 De hecho, causan problemas particularmente difíciles infecciones de la próstata y el tracto urinario causadas por bacterias farmacorresistentes, lo más a menudo del género *Enterococcus*. El tratamiento de dichas infecciones con los antibióticos disponibles ha causado problemas terapéuticos en todo el mundo en los últimos años. La terapia con antibióticos de estas infecciones se está volviendo cada vez menos eficaz, puesto que una mayoría predominante de cepas bacterianas exhiben resistencia a todos los antibióticos, incluyendo el antibiótico de "última opción" vancomicina. Por tanto, existe una necesidad aguda de introducir un procedimiento alternativo de tratamiento de infecciones bacterianas persistentes y muy peligrosas.

Objetivo de la presente invención

En los últimos años, ha habido un aumento masivo de la difusión de cepas bacterianas resistentes a todos los antibióticos, incluyendo el antibiótico de "última opción" vancomicina. Como resultado, el tratamiento con antibióticos de infecciones causadas por formas farmacorresistentes es ineficaz.

Esta situación causa grandes problemas terapéuticos. Existe por tanto una necesidad aguda de introducir un procedimiento alternativo de tratamiento de infecciones bacterianas persistentes.

5 En vista de lo anterior, el objetivo de la presente invención es producir preparaciones de fagos multivalentes que podrían usarse exitosamente para tratar infecciones bacterianas usadas por cepas clínicas farmacorresistentes de *Enterococcus*, particularmente aquellas pertenecientes a las especies *Enterococcus faecalis*.

Inesperadamente, el objetivo afirmado anteriormente se ha resuelto por la presente invención.

Es objeto de la presente invención una cepa de bacteriófago multivalente específica contra bacterias del género *Enterococcus* depositada en la Polish Microorganism Collection con el número de depósito PCM F/00029.

10 El siguiente objeto de la presente invención es el uso de una cepa de bacteriófago multivalente depositada en la Polish Microorganism Collection con el número de depósito PCM F/00029 en la producción de preparaciones antibacterianas usadas para combatir bacterias pertenecientes a la especie *Enterococcus faecalis*.

Es otro objeto de la presente invención una cepa de bacteriófago multivalente específica contra bacterias pertenecientes al género *Enterococcus* depositada en la Polish Microorganism Collection con el número de depósito PCM F/00030.

15 El siguiente objeto de la presente invención es el uso de la cepa de bacteriófago multivalente depositada en la Polish Microorganism Collection con el número de depósito PCM F/00030 en la producción de preparaciones antibacterianas usadas para combatir bacterias pertenecientes a la especie *Enterococcus faecalis*.

Es otro objeto de la presente invención una cepa de bacteriófago multivalente específica contra bacterias pertenecientes al género *Enterococcus* depositada en la Polish Microorganism Collection con el número de depósito PCM F/00031.

20 El siguiente objeto de la presente invención es el uso de la cepa de bacteriófago multivalente depositada en la Polish Microorganism Collection con el número de depósito PCM F/00031 en la producción de preparaciones antibacterianas usadas para combatir bacterias pertenecientes a la especie *Enterococcus faecalis*.

Es otro objeto de la presente invención una cepa de bacteriófago multivalente específica contra bacterias pertenecientes al género *Enterococcus* depositada en la Polish Microorganism Collection con el número de depósito PCM F/00032.

25 El siguiente objeto de la presente invención es el uso de la cepa de bacteriófago multivalente depositada en la Polish Microorganism Collection con el número de depósito PCM F/00032 en la producción de preparaciones antibacterianas usadas para combatir bacterias pertenecientes a la especie *Enterococcus faecalis*.

Es otro objeto de la presente invención una cepa de bacteriófago multivalente específica contra bacterias pertenecientes al género *Enterococcus* depositada en la Polish Microorganism Collection con el número de depósito PCM F/00033.

30 El siguiente objeto de la presente invención es el uso de la cepa de bacteriófago multivalente depositada en la Polish Microorganism Collection con el número de depósito PCM F/00033 en la producción de preparaciones antibacterianas usadas para combatir bacterias pertenecientes a la especie *Enterococcus faecalis*.

Es otro objeto de la presente invención una cepa de bacteriófago multivalente específica contra bacterias pertenecientes al género *Enterococcus* depositada en la Polish Microorganism Collection con el número de depósito PCM F/00034.

35 El siguiente objeto de la presente invención es el uso de la cepa de bacteriófago multivalente depositada en la Polish Microorganism Collection con el número de depósito PCM F/00034 en la producción de preparaciones antibacterianas usadas para combatir bacterias pertenecientes a la especie *Enterococcus faecalis*.

Es otro objeto de la presente invención una cepa de bacteriófago multivalente específica contra bacterias pertenecientes al género *Enterococcus* depositada en la Polish Microorganism Collection con el número de depósito PCM F/00035.

40 El siguiente objeto de la presente invención es el uso de la cepa de bacteriófago multivalente depositada en la Polish Microorganism Collection con el número de depósito PCM F/00035 en la producción de preparaciones antibacterianas usadas para combatir bacterias pertenecientes a la especie *Enterococcus faecalis*.

Es otro objeto de la presente invención una cepa de bacteriófago multivalente específica contra bacterias pertenecientes al género *Enterococcus* depositada en la Polish Microorganism Collection con el número de depósito PCM F/00036.

45 El siguiente objeto de la presente invención es el uso de la cepa de bacteriófago multivalente depositada en la Polish Microorganism Collection con el número de depósito PCM F/00036 en la producción de preparaciones antibacterianas usadas para combatir bacterias pertenecientes a la especie *Enterococcus faecalis*.

Es otro objeto de la presente invención una cepa de bacteriófago multivalente específica contra bacterias pertenecientes al género *Enterococcus* depositada en la Polish Microorganism Collection con el número de depósito PCM F/00037.

- El siguiente objeto de la presente invención es el uso de la cepa de bacteriófago multivalente depositada en la Polish Microorganism Collection con el número de depósito PCM F/00037 en la producción de preparaciones antibacterianas usadas para combatir bacterias pertenecientes a la especie *Enterococcus faecalis*.
- 5 Es otro objeto de la presente invención una cepa de bacteriófago multivalente específica contra bacterias pertenecientes al género *Enterococcus* depositada en la Polish Microorganism Collection con el número de depósito PCM F/00038.
- El siguiente objeto de la presente invención es el uso de la cepa de bacteriófago multivalente depositada en la Polish Microorganism Collection con el número de depósito PCM F/00038 en la producción de preparaciones antibacterianas usadas para combatir bacterias pertenecientes a la especie *Enterococcus faecalis*.
- 10 Es otro objeto de la presente invención una cepa de bacteriófago multivalente específica contra bacterias pertenecientes al género *Enterococcus* depositada en la Polish Microorganism Collection con el número de depósito PCM F/00039.
- El siguiente objeto de la presente invención es el uso de la cepa de bacteriófago multivalente depositada en la Polish Microorganism Collection con el número de depósito PCM F/00039 en la producción de preparaciones antibacterianas usadas para combatir bacterias pertenecientes a la especie *Enterococcus faecalis*.
- 15 Es otro objeto de la presente invención una cepa de bacteriófago multivalente específica contra bacterias pertenecientes al género *Enterococcus* depositada en la Polish Microorganism Collection con el número de depósito PCM F/00040.
- El siguiente objeto de la presente invención es el uso de la cepa de bacteriófago multivalente depositada en la Polish Microorganism Collection con el número de depósito PCM F/00040 en la producción de preparaciones antibacterianas usadas para combatir bacterias pertenecientes a la especie *Enterococcus faecalis*.
- 20 Es otro objeto de la presente invención una cepa de bacteriófago multivalente específica contra bacterias pertenecientes al género *Enterococcus* depositada en la Polish Microorganism Collection con el número de depósito PCM F/00041.
- El siguiente objeto de la presente invención es el uso de la cepa de bacteriófago multivalente depositada en la Polish Microorganism Collection con el número de depósito PCM F/00041 en la producción de preparaciones antibacterianas usadas para combatir bacterias pertenecientes a la especie *Enterococcus faecalis*.
- 25 Es otro objeto de la presente invención una cepa de bacteriófago multivalente específica contra bacterias pertenecientes al género *Enterococcus* depositada en la Polish Microorganism Collection con el número de depósito PCM F/00042.
- El siguiente objeto de la presente invención es el uso de la cepa de bacteriófago multivalente depositada en la Polish Microorganism Collection con el número de depósito PCM F/00042 en la producción de preparaciones antibacterianas usadas para combatir bacterias pertenecientes a la especie *Enterococcus faecalis*.
- 30 Es otro objeto de la presente invención una cepa de bacteriófago multivalente específica contra bacterias pertenecientes al género *Enterococcus* depositada en la Polish Microorganism Collection con el número de depósito PCM F/00043.
- El siguiente objeto de la presente invención es el uso de la cepa de bacteriófago multivalente depositada en la Polish Microorganism Collection con el número de depósito PCM F/00043 en la producción de preparaciones antibacterianas usadas para combatir bacterias pertenecientes a la especie *Enterococcus faecalis*.
- 35 Es otro objeto de la presente invención una cepa de bacteriófago multivalente específica contra bacterias pertenecientes al género *Enterococcus* depositada en la Polish Microorganism Collection con el número de depósito PCM F/00044.
- El siguiente objeto de la presente invención es el uso de la cepa de bacteriófago multivalente depositada en la Polish Microorganism Collection con el número de depósito PCM F/00044 en la producción de preparaciones antibacterianas usadas para combatir bacterias pertenecientes a la especie *Enterococcus faecalis*.
- 40 Es otro objeto de la presente invención una cepa de bacteriófago multivalente específica contra bacterias pertenecientes al género *Enterococcus* depositada en la Polish Microorganism Collection con el número de depósito PCM F/00045.
- El siguiente objeto de la presente invención es el uso de la cepa de bacteriófago multivalente depositada en la Polish Microorganism Collection con el número de depósito PCM F/00045 en la producción de preparaciones antibacterianas usadas para combatir bacterias pertenecientes a la especie *Enterococcus faecalis*.
- Ejemplo 1
- 45 **Fago *Enterococcus faecalis* 1/339/K22228**
- Un bacteriófago virulento aislado de aguas residuales del puerto fluvial de Breslavia de la cepa *E. faecalis* K22228.
- El fago se aisló después de incubación durante 1 h a 37°C de la muestra de aguas residuales examinada en un medio líquido (a una relación 1:1) con la adición de 0,1 ml de cultivo reciente de la cepa K22228. A continuación, se extrajeron 0,2 ml de la mezcla estudiada y se untaron sobre la superficie de un disco con medio agar selectivo. Se incubó el disco durante 18 h a 37°C. Se derivó la línea de fago de colonias individuales usando un asa de alambre. Se transfirieron las
- 50

colonias a tubos de caldo nutritivo que contenían 0,05 ml de cultivo de K22228 reciente y se incubaron durante 18 h a 37°C. Se centrifugó el lisado de fago producido durante 30 min a 4,5 krpm, se filtró a través de filtros antibacterianos y se controló la presencia del fago también.

5 Se usó el bacteriófago aislado para determinar el espectro de actividad lítica usando 220 cepas resistentes a antibióticos de *E. faecalis* aisladas de pacientes con infecciones de próstata y de los tractos urinarios y genital. Se observaron reacciones líticas positivas para 74 cepas de *E. faecalis*. Se demostraron reacciones líticas positivas débiles para 3 de las 30 cepas de *E. faecium* usadas en la reacción.

10 La cepa de fago *Enterococcus faecalis* 1/339/K22228 se depositó el 25 de junio de 2007 en la Polish Microorganism Collection en Breslavia, que posee un estatus de agencia de depósitos internacionales (IDA) para procedimientos de patente. Se le dio al depósito de patente el número F/00029.

Ejemplo 2

Fago *Enterococcus faecalis* 4/R26519

Un bacteriófago virulento aislado de aguas residuales de la planta de tratamiento Strachocin II de Breslavia de la cepa *E. faecalis* 26519.

15 El fago se aisló después de incubación durante 1 h a 37°C de la muestra de aguas residuales examinada en un medio líquido (a una relación 1:1) con la adición de 0,1 ml de cultivo reciente de la cepa R26519. A continuación, se extrajeron 0,2 ml de la mezcla estudiada y se untaron sobre la superficie de un disco con medio agar selectivo. Se incubó el disco durante 18 h a 37°C. Se derivó la línea de fago de colonias individuales usando un asa de alambre. Se transfirieron las colonias a tubos de caldo nutritivo que contenían 0,05 ml de cultivo de R26519 reciente y se incubaron durante 18 h a 37°C. Se centrifugó el lisado de fago producido durante 30 min a 4,5 krpm, se filtró a través de filtros antibacterianos y se controló la presencia del fago también.

20 Se usó el bacteriófago aislado para determinar el espectro de actividad lítica usando 220 cepas resistentes a antibióticos de *E. faecalis* aisladas de pacientes con infecciones de próstata y de los tractos urinarios y genital. Se observaron reacciones líticas positivas para 65 cepas de *E. faecalis*. No se demostraron reacciones líticas positivas para las 30 cepas de *E. faecium* usadas en la reacción.

25 La cepa de fago *Enterococcus faecalis* 1/339/R26519 se depositó el 25 de junio de 2007 en la Polish Microorganism Collection en Breslavia, que posee un estatus de agencia de depósitos internacionales (IDA) para procedimientos de patente. Se le dio al depósito de patente el número F/00030.

Ejemplo 3

30 **Fago *Enterococcus faecalis* 1/339/SI22247**

Un bacteriófago virulento aislado de aguas residuales del puerto fluvial de Breslavia de la cepa *E. faecalis* 22247.

35 El fago se aisló después de incubación durante 1 h a 37°C de la muestra de aguas residuales examinada en un medio líquido (a una relación 1:1) con la adición de 0,1 ml de cultivo reciente de la cepa SI22247. A continuación, se extrajeron 0,2 ml de la mezcla estudiada y se untaron sobre la superficie de un disco con medio agar selectivo. Se incubó el disco durante 18 h a 37°C. Se derivó la línea de fago de colonias individuales usando un asa de alambre. Se transfirieron las colonias a tubos de caldo nutritivo que contenían 0,05 ml de cultivo de SI22247 reciente y se incubaron durante 18 h a 37°C. Se centrifugó el lisado de fago producido durante 30 min a 4,5 krpm, se filtró a través de filtros antibacterianos y se controló la presencia del fago también.

40 Se usó el bacteriófago aislado para determinar el espectro de actividad lítica usando 220 cepas resistentes a antibióticos de *E. faecalis* aisladas de pacientes con infecciones de próstata y de los tractos urinarios y genital. Se observaron reacciones líticas positivas para 102 cepas de *E. faecalis*. Se demostraron reacciones líticas positivas débiles para 1 de las 30 cepas de *E. faecium* usadas en la reacción.

45 La cepa de fago *Enterococcus faecalis* 1/339/SI22247 se depositó el 25 de junio de 2007 en la Polish Microorganism Collection en Breslavia, que posee un estatus de agencia de depósitos internacionales (IDA) para procedimientos de patente. Se le dio al depósito de patente el número F/00031.

Ejemplo 4

Fago *Enterococcus faecalis* 1/339/SII 22248

Un bacteriófago virulento aislado de aguas residuales del puerto fluvial de Breslavia de la cepa *E. faecalis* 22248.

50 El fago se aisló después de incubación durante 1 h a 37°C de la muestra de aguas residuales examinada en un medio líquido (a una relación 1:1) con la adición de 0,1 ml de cultivo reciente de la cepa SII22248. A continuación, se extrajeron 0,2 ml de la mezcla estudiada y se untaron sobre la superficie de un disco con medio agar selectivo. Se

incubó el disco durante 18 h a 37°C. Se derivó la línea de fago de colonias individuales usando un asa de alambre. Se transfirieron las colonias a tubos de caldo nutritivo que contenían 0,05 ml de cultivo de SII22248 reciente y se incubaron durante 18 h a 37°C. Se centrifugó el lisado de fago producido durante 30 min a 4,5 krpm, se filtró a través de filtros antibacterianos y se controló la presencia del fago también.

- 5 Se usó el bacteriófago aislado para determinar el espectro de actividad lítica usando 220 cepas resistentes a antibióticos de *E. faecalis* aisladas de pacientes con infecciones de próstata y de los tractos urinarios y genital. Se observaron reacciones líticas positivas para 111 cepas de *E. faecalis*. Se demostraron reacciones líticas positivas débiles para 1 de las 30 cepas de *E. faecium* usadas en la reacción.

- 10 La cepa de fago *Enterococcus faecalis* 1/339/SII22248 se depositó el 25 de junio de 2007 en la Polish Microorganism Collection en Breslavia, que posee un estatus de agencia de depósitos internacionales (IDA) para procedimientos de patente. Se le dio al depósito de patente el número F/00032.

Ejemplo 5

Fago *Enterococcus faecalis* y IC22782

Un bacteriófago virulento aislado de aguas residuales del puerto fluvial de Breslavia de la cepa *E. faecalis* C22782.

- 15 El fago se aisló después de incubación durante 1 h a 37°C de la muestra de aguas residuales examinada en un medio líquido (a una relación 1:1) con la adición de 0,1 ml de cultivo reciente de la cepa C22782. A continuación, se extrajeron 0,2 ml de la mezcla estudiada y se untaron sobre la superficie de un disco con medio agar selectivo. Se incubó el disco durante 18 h a 37°C. Se derivó la línea de fago de colonias individuales usando un asa de alambre. Se transfirieron las colonias a tubos de caldo nutritivo que contenían 0,05 ml de cultivo de C22782 reciente y se incubaron durante 18 h a 37°C. Se centrifugó el lisado de fago producido durante 30 min a 4,5 krpm, se filtró a través de filtros antibacterianos y se controló la presencia del fago también.

- 25 Se usó el bacteriófago aislado para determinar el espectro de actividad lítica usando 220 cepas resistentes a antibióticos de *E. faecalis* aisladas de pacientes con infecciones de próstata y de los tractos urinarios y genital. Se observaron reacciones líticas positivas para 94 cepas de *E. faecalis*. Se demostraron reacciones líticas positivas débiles para 2 de las 30 cepas de *E. faecium* usadas en la reacción.

La cepa de fago *Enterococcus faecalis* 1/339/C22782 se depositó el 25 de junio de 2007 en la Polish Microorganism Collection en Breslavia, que posee un estatus de agencia de depósitos internacionales (IDA) para procedimientos de patente. Se le dio al depósito de patente el número F/00033.

Ejemplo 6

- 30 **Fago *Enterococcus faecalis* 2/51c**

Un bacteriófago virulento aislado de aguas residuales del puerto fluvial de Breslavia de la cepa *E. faecalis* 51c.

- 35 El fago se aisló después de incubación durante 1 h a 37°C de la muestra de aguas residuales examinada en un medio líquido (a una relación 1:1) con la adición de 0,1 ml de cultivo reciente de la cepa 51c. A continuación, se extrajeron 0,2 ml de la mezcla estudiada y se untaron sobre la superficie de un disco con medio agar selectivo. Se incubó el disco durante 18 h a 37°C. Se derivó la línea de fago de colonias individuales usando un asa de alambre. Se transfirieron las colonias a tubos de caldo nutritivo que contenían 0,05 ml de cultivo de 51c reciente y se incubaron durante 18 h a 37°C. Se centrifugó el lisado de fago producido durante 30 min a 4,5 krpm, se filtró a través de filtros antibacterianos y se controló la presencia del fago también.

- 40 Se usó el bacteriófago aislado para determinar el espectro de actividad lítica usando 220 cepas resistentes a antibióticos de *E. faecalis* aisladas de pacientes con infecciones de próstata y de los tractos urinarios y genital. Se observaron reacciones líticas positivas para 102 cepas de *E. faecalis*. No se demostraron reacciones líticas positivas para ninguna de las 30 cepas de *E. faecium* usadas en la reacción.

- 45 La cepa de fago *Enterococcus faecalis* 1/339/51c se depositó el 25 de junio de 2007 en la Polish Microorganism Collection en Breslavia, que posee un estatus de agencia de depósitos internacionales (IDA) para procedimientos de patente. Se le dio al depósito de patente el número F/00034.

Ejemplo 7

Fago *Enterococcus faecalis* 3/J 26271

Una cepa atenuada de bacteriófago aislada de la cepa *E. faecalis* J26271.

- 50 Se cultivó la cepa durante 18 h a 37°C. Después de centrifugar durante 30 min a 4,5 krpm, se filtró el sobrenadante a través de filtros antibacterianos, se comprobó la presencia del fago en medio de agar selectivo en discos y se ensayó la actividad lítica de la preparación resultante.

Se usó el bacteriófago aislado para determinar el espectro de actividad lítica usando 220 cepas resistentes a antibióticos de *E. faecalis* aisladas de pacientes con infecciones de próstata y de los tractos urinarios y genital. Se observaron reacciones líticas positivas para 105 cepas de *E. faecalis*. No se demostraron reacciones líticas positivas para ninguna de las 30 cepas de *E. faecium* usadas en la reacción.

- 5 La cepa de fago *Enterococcus faecalis* 3/J26371 se depositó el 25 de junio de 2007 en la Polish Microorganism Collection en Breslavia, que posee un estatus de agencia de depósitos internacionales (IDA) para procedimientos de patente. Se le dio al depósito de patente el número F/00035.

Ejemplo 8

Fago *Enterococcus faecalis* 5/V26556

- 10 Una preparación de fago multivalente virulenta compuesta por los fagos aislados 1/339/K22228, 4/R26519, 1/339/S122247, 1/339/SII22248, I/C22782, 2/51c usando la cepa *E. faecalis* V26556.

Se replicaron los bacteriófagos usando procedimientos estándares y se combinaron en volúmenes iguales.

Se usó la preparación para determinar el espectro de actividad lítica usando 220 cepas resistentes a antibióticos de *E. faecalis* aisladas de pacientes con infecciones de próstata y del tracto urinario y genital.

- 15 Se observaron reacciones líticas positivas para 141 cepas de *E. faecalis*.

No se demostraron reacciones líticas positivas para ninguna de las 30 cepas de *E. faecium* usadas en la reacción.

El fago de cepa *Enterococcus faecalis* 5/V26556 se depositó el 25 de junio de 2007 en la Polish Microorganism Collection en Breslavia, que posee un estatus de agencia de depósitos internacionales (IDA) para procedimientos de patente. Se le dio al depósito de patente el número F/00036.

- 20 Ejemplo 9

Fago *Enterococcus faecalis* 6/M26588

Un bacteriófago virulento aislado de aguas residuales de la planta de tratamiento Strachocin II de Breslavia de la cepa *E. faecalis* 26588.

- 25 El fago se aisló después de incubación durante 1 h a 37°C de la muestra de aguas residuales examinada en un medio líquido (a una relación 1:1) con la adición de 0,1 ml de cultivo reciente de la cepa R26588. A continuación, se extrajeron 0,2 ml de la mezcla estudiada y se untaron sobre la superficie de un disco con medio agar selectivo. Se incubó el disco durante 18 h a 37°C. Se derivó la línea de fago de colonias individuales usando un asa de alambre. Se transfirieron las colonias a tubos de caldo nutritivo que contenían 0,05 ml de cultivo de M26588 reciente y se incubaron durante 18 h a 37°C. Se centrifugó el lisado de fago producido durante 30 min a 4,5 krpm, se filtró a través de filtros antibacterianos y se controló la presencia del fago también.

- 30 Se usó el bacteriófago aislado para determinar el espectro de actividad lítica usando 220 cepas resistentes a antibióticos de *E. faecalis* aisladas de pacientes con infecciones de próstata y de los tractos urinarios y genital.

Se observaron reacciones líticas positivas para 95 cepas de *E. faecalis*.

No se demostraron reacciones líticas positivas para las 30 cepas de *E. faecium* usadas en la reacción.

- 35 La cepa de fago *Enterococcus faecalis* 6/M26588 se depositó el 25 de junio de 2007 en la Polish Microorganism Collection en Breslavia, que posee un estatus de agencia de depósitos internacionales (IDA) para procedimientos de patente. Se le dio al depósito de patente el número F/00037.

Ejemplo 10

Fago *Enterococcus faecalis* 7/P26589

- 40 Un bacteriófago virulento aislado de aguas residuales de la planta de tratamiento Strachocin II de Breslavia de la cepa *E. faecalis* 26589.

- 45 El fago se aisló después de incubación durante 1 h a 37°C de la muestra de aguas residuales examinada en un medio líquido (a una relación 1:1) con la adición de 0,1 ml de cultivo reciente de la cepa P26589. A continuación, se extrajeron 0,2 ml de la mezcla estudiada y se untaron sobre la superficie de un disco con medio agar selectivo. Se incubó el disco durante 18 h a 37°C. Se derivó la línea de fago de colonias individuales usando un asa de alambre. Se transfirieron las colonias a tubos de caldo nutritivo que contenían 0,05 ml de cultivo de P26589 reciente y se incubaron durante 18 h a 37°C. Se centrifugó el lisado de fago producido durante 30 min a 4,5 krpm, se filtró a través de filtros antibacterianos y se controló la presencia del fago también.

Se usó el bacteriófago aislado para determinar el espectro de actividad lítica usando 220 cepas resistentes a antibióticos de *E. faecalis* aisladas de pacientes con infecciones de próstata y de los tractos urinarios y genital. Se observaron reacciones líticas positivas para 95 cepas de *E. faecalis*. Se demostraron una reacción lítica positiva para 1 de las 30 cepas de *E. faecium* usadas en la reacción.

- 5 La cepa de fago *Enterococcus faecalis* 6/P26589 se depositó el 25 de junio de 2007 en la Polish Microorganism Collection en Breslavia, que posee un estatus de agencia de depósitos internacionales (IDA) para procedimientos de patente. Se le dio al depósito de patente el número F/00038.

Ejemplo 11

Fago *Enterococcus faecalis* 8/V26344

- 10 Un bacteriófago virulento aislado de aguas residuales de la planta de tratamiento Strachocin II de Breslavia de la cepa *E. faecalis* V26344.

15 El fago se aisló después de incubación durante 1 h a 37°C de la muestra de aguas residuales examinada en un medio líquido (a una relación 1:1) con la adición de 0,1 ml de cultivo reciente de la cepa V26344. A continuación, se extrajeron 0,2 ml de la mezcla estudiada y se untaron sobre la superficie de un disco con medio agar selectivo. Se incubó el disco durante 18 h a 37°C. Se derivó la línea de fago de colonias individuales usando un asa de alambre. Se transfirieron las colonias a tubos de caldo nutritivo que contenían 0,05 ml de cultivo de V26344 reciente y se incubaron durante 18 h a 37°C. Se centrifugó el lisado de fago producido durante 30 min a 4,5 krpm, se filtró a través de filtros antibacterianos y se controló la presencia del fago también.

20 Se usó el bacteriófago aislado para determinar el espectro de actividad lítica usando 220 cepas resistentes a antibióticos de *E. faecalis* aisladas de pacientes con infecciones de próstata y de los tractos urinarios y genital. Se observaron reacciones líticas positivas para 91 cepas de *E. faecalis*. No se demostró reacción lítica positiva para ninguna de las 30 cepas de *E. faecium* usadas en la reacción.

25 La cepa de fago *Enterococcus faecalis* 8/V26344 se depositó el 25 de junio de 2007 en la Polish Microorganism Collection en Breslavia, que posee un estatus de agencia de depósitos internacionales (IDA) para procedimientos de patente. Se le dio al depósito de patente el número F/00039.

Ejemplo 12

Fago *Enterococcus faecalis* 9/V26344

Una cepa atenuada de bacteriófago aislada de la cepa *E. faecalis* V26344.

- 30 Se cultivó la cepa durante 18 h a 37°C. Después de centrifugar durante 30 min a 4,5 krpm, se filtró el sobrenadante a través de filtros antibacterianos, se comprobó la presencia del fago en medio de agar selectivo en discos y se ensayó la actividad lítica de la preparación resultante.

35 Se usó el bacteriófago aislado para determinar el espectro de actividad lítica usando 220 cepas resistentes a antibióticos de *E. faecalis* aisladas de pacientes con infecciones de próstata y de los tractos urinarios y genital. Se observaron reacciones líticas positivas para 113 cepas de *E. faecalis*. No se demostró reacción lítica positiva para ninguna de las 30 cepas de *E. faecium* usadas en la reacción.

La cepa de fago *Enterococcus faecalis* 9/V26344 se depositó el 25 de junio de 2007 en la Polish Microorganism Collection en Breslavia, que posee un estatus de agencia de depósitos internacionales (IDA) para procedimientos de patente. Se le dio al depósito de patente el número F/00040.

Ejemplo 13

- 40 **Fago *Enterococcus faecalis* 10/R26636**

Una cepa atenuada de bacteriófago aislada de la cepa *E. faecalis* R26636.

Se cultivó la cepa durante 18 h a 37°C. Después de centrifugar durante 30 min a 4,5 krpm, se filtró el sobrenadante a través de filtros antibacterianos, se comprobó la presencia del fago en medio de agar selectivo en discos y se ensayó la actividad lítica de la preparación resultante.

- 45 Se usó el bacteriófago aislado para determinar el espectro de actividad lítica usando 220 cepas resistentes a antibióticos de *E. faecalis* aisladas de pacientes con infecciones de próstata y de los tractos urinarios y genital. Se observaron reacciones líticas positivas para 125 cepas de *E. faecalis*. Se demostró una reacción lítica positiva por el fago aislado en 1 de las 30 cepas de *E. faecium* usadas en la reacción.

La cepa de fago *Enterococcus faecalis* 10/R26636 se depositó el 25 de junio de 2007 en la Polish Microorganism Collection en Breslavia, que posee un estatus de agencia de depósitos internacionales (IDA) para procedimientos de patente. Se le dio al depósito de patente el número F/00041.

Ejemplo 14

5 **Fago *Enterococcus faecalis* 11/C22782**

Una cepa atenuada de bacteriófago aislada de la cepa *E. faecalis* C22782.

Se cultivó la cepa durante 18 h a 37°C. Después de centrifugar durante 30 min a 4,5 krpm, se filtró el sobrenadante a través de filtros antibacterianos, se comprobó la presencia del fago en medio de agar selectivo en discos y se ensayó la actividad lítica de la preparación resultante.

10 Se usó el bacteriófago aislado para determinar el espectro de actividad lítica usando 220 cepas resistentes a antibióticos de *E. faecalis* aisladas de pacientes con infecciones de próstata y de los tractos urinarios y genital. Se observaron reacciones líticas positivas para 143 cepas de *E. faecalis*. No se demostró una reacción lítica positiva por el fago aislado en ninguna de las 30 cepas de *E. faecium* usadas en la reacción.

15 La cepa de fago *Enterococcus faecalis* 11/C22782 se depositó el 25 de junio de 2007 en la Polish Microorganism Collection en Breslavia, que posee un estatus de agencia de depósitos internacionales (IDA) para procedimientos de patente. Se le dio al depósito de patente el número F/00042.

Ejemplo 15

Fago *Enterococcus faecalis* 12/R26636

Un bacteriófago virulento aislado de aguas residuales del alcantarillado Nieciszów II de la cepa *E. faecalis* R26636.

20 El fago se aisló después de incubación durante 1 h a 37°C de la muestra de aguas residuales examinada en un medio líquido (a una relación 1:1) con la adición de 0,1 ml de cultivo reciente de la cepa R26636. A continuación, se extrajeron 0,2 ml de la mezcla estudiada y se untaron sobre la superficie de un disco con medio agar selectivo. Se incubó el disco durante 18 h a 37°C. Se derivó la línea de fago de colonias individuales usando un asa de alambre. Se transfirieron las colonias a tubos de caldo nutritivo que contenían 0,05 ml de cultivo de R26636 reciente y se incubaron durante 18 h a 25 37°C. Se centrifugó el lisado de fago producido durante 30 min a 4,5 krpm, se filtró a través de filtros antibacterianos y se controló la presencia del fago también.

30 Se usó el bacteriófago aislado para determinar el espectro de actividad lítica usando 220 cepas resistentes a antibióticos de *E. faecalis* aisladas de pacientes con infecciones de próstata y de los tractos urinarios y genital. Se observaron reacciones líticas positivas para 118 cepas de *E. faecalis*. No se demostró una reacción lítica positiva por el fago aislado en ninguna de las 30 cepas de *E. faecium* usadas en la reacción.

La cepa de fago *Enterococcus faecalis* 12/R26636 se depositó el 25 de junio de 2007 en la Polish Microorganism Collection en Breslavia, que posee un estatus de agencia de depósitos internacionales (IDA) para procedimientos de patente. Se le dio al depósito de patente el número F/00043.

Ejemplo 16

35 **Fago *Enterococcus faecalis* 13/A26696**

Un bacteriófago virulento aislado de aguas residuales de la planta de tratamiento Strachocin II de Breslavia de la cepa *E. faecalis* A26696.

40 El fago se aisló después de incubación durante 1 h a 37°C de la muestra de aguas residuales examinada en un medio líquido (a una relación 1:1) con la adición de 0,1 ml de cultivo reciente de la cepa A26696. A continuación, se extrajeron 0,2 ml de la mezcla estudiada y se untaron sobre la superficie de un disco con medio agar selectivo. Se incubó el disco durante 18 h a 37°C. Se derivó la línea de fago de colonias individuales usando un asa de alambre. Se transfirieron las colonias a tubos de caldo nutritivo que contenían 0,05 ml de cultivo de A26696 reciente y se incubaron durante 18 h a 37°C. Se centrifugó el lisado de fago producido durante 30 min a 4,5 krpm, se filtró a través de filtros antibacterianos y se controló la presencia del fago también.

45 Se usó el bacteriófago aislado para determinar el espectro de actividad lítica usando 220 cepas resistentes a antibióticos de *E. faecalis* aisladas de pacientes con infecciones de próstata y de los tractos urinarios y genital. Se observaron reacciones líticas positivas para 119 cepas de *E. faecalis*. No se demostró reacción lítica positiva para ninguna de las 30 cepas de *E. faecium* usadas en la reacción.

50 La cepa de fago *Enterococcus faecalis* 13/A26696 se depositó el 25 de junio de 2007 en la Polish Microorganism Collection en Breslavia, que posee un estatus de agencia de depósitos internacionales (IDA) para procedimientos de patente. Se le dio al depósito de patente el número F/00044.

Ejemplo 17

Fago *Enterococcus faecalis* 14/K24274

Un bacteriófago virulento aislado de aguas residuales de un alimentador con aguas residuales de campos irrigados de la ciudad de Breslavia de la cepa *E. faecalis* K24274.

- 5 El fago se aisló después de incubación durante 1 h a 37°C de la muestra de aguas residuales examinada en un medio líquido (a una relación 1:1) con la adición de 0,1 ml de cultivo reciente de la cepa K24274. A continuación, se extrajeron 0,2 ml de la mezcla estudiada y se untaron sobre la superficie de un disco con medio agar selectivo. Se incubó el disco durante 18 h a 37°C. Se derivó la línea de fago de colonias individuales usando un asa de alambre. Se transfirieron las colonias a tubos de caldo nutritivo que contenían 0,05 ml de cultivo de K24274 reciente y se incubaron durante 18 h a 37°C. Se centrifugó el lisado de fago producido durante 30 min a 4,5 krpm, se filtró a través de filtros antibacterianos y se controló la presencia del fago también.
- 10

La cepa de fago *Enterococcus faecalis* 14/K24274 se depositó el 25 de junio de 2007 en la Polish Microorganism Collection en Breslavia, que posee un estatus de agencia de depósitos internacionales (IDA) para procedimientos de patente. Se le dio al depósito de patente el número F/00045.

REIVINDICACIONES

1. Una cepa de bacteriófago multivalente específica contra bacterias pertenecientes al género *Enterococcus* seleccionada entre las cepas depositadas en la Polish Microorganism Collection con los números de depósito: PCM F/00029; PCM F/00030; PCM F/00031; PCM F/00032; PCM F/00033; PCM F/00034; PCM F/00035; PCM F/00036; PCM F/00037; PCM F/00038; PCM F/00039; PCM F/00040; PCM F/00041; PCM F/00042; PCM F/00043; PCM F/00044 o PCM F/00045.
- 5
2. El uso de una cepa de bacteriófago multivalente seleccionada de las cepas depositadas en la Polish Microorganism Collection con los números de depósito: PCM F/00029; PCM F/00030; PCM F/00031; PCM F/00032; PCM F/00033; PCM F/00034; PCM F/00035; PCM F/00036; PCM F/00037; PCM F/00038; PCM F/00039; PCM F/00040; PCM F/00041; PCM F/00042; PCM F/00043; PCM F/00044 o PCM F/00045 en la producción de preparaciones antibacterianas usadas para combatir bacterias pertenecientes a la especie *Enterococcus faecalis*.
- 10