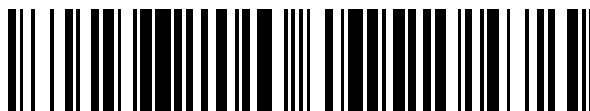


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 562 640**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/16** (2006.01)

**A61K 38/17** (2006.01)

**A61K 39/02** (2006.01)

**A61P 31/12** (2006.01)

**A61P 31/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.09.2010 E 10813968 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.01.2016 EP 2475377**

54 Título: **Nuevo bacteriófago y composición antibacteriana que comprende el mismo**

30 Prioridad:

**03.09.2009 US 239748 P**

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

**07.03.2016**

73 Titular/es:

**CJ CHEILJEDANG CORPORATION (100.0%)  
292, Ssangnim-dong Jung-gu  
Seoul, 100-400, KR**

72 Inventor/es:

**SHIN, SOO AN;  
PARK, MIN TAE;  
CHOI, HYANG;  
CHO, YOUNG WOOK;  
KANG, IN HYE y  
CHOI, SU JIN**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 562 640 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

Nuevo bacteriófago y composición antibacteriana que comprende el mismo

**Campo técnico**

La presente invención se refiere a un nuevo bacteriófago.

**5 Antecedentes de la técnica**

*Salmonella* es un género de la familia Enterobacteriaceae, caracterizado como bacterias Gram-negativas, facultativamente anaerobias, no formadoras de esporas, con forma de bastón, y la mayoría de las cepas se mueven con flagelos. *Salmonella* tiene un contenido medio de GC genómico de un 50-52 %, que es similar al de *Escherichia coli* y *Shigella*. El género *Salmonella* es un microorganismo patógeno que causa infecciones en ganado así como en seres humanos. La división serológica contiene a *Salmonella enterica*, una especie de *Salmonella bacterium*, que tiene una diversidad de serotipos que incluyen *Gallinarum*, *Pullorum*, *Typhimurium*, *Enteritidis*, *Typhi*, *Choleraesuis*, y *derby* (Bopp CA, Brenner FW, Wells JG, Strokebine NA. *Escherichia*, *Shigella*, *Salmonella*. En Murry PR, Baron EJ, y col., eds. *Manual of Clinical Microbiology*. 7ª ed. Washington DC American Society for Microbiology 1999; 467-74; Ryan KJ. Ray CG (editores) (2004). *Sherris Medical Microbiology* (4ª ed). McGraw Hill. ISBN 0-8385-8529-9.). De ellos, *Salmonella*, *Gallinarum* y *Pullorum* son agentes patógenos adaptados en aves de corral, *Salmonella Typhi* es un agente patógeno adaptado en seres humanos, *Salmonella Choleraesuis* y *Salmonella derby* son agentes patógenos adaptados en porcino, y *Salmonella Enteritidis* y *Salmonella Typhimurium* son agentes patógenos para seres humanos y animales. Cada serotipo causa enfermedad en las respectivas especies, dando como resultado un daño enorme a granjeros o consumidores.

Una enfermedad de aves domésticas causada por *Salmonella bacterium* es la Tifosis Aviar (FT), que está causada por un agente patógeno, *Salmonella Gallinarum* (denominado "SG" en lo sucesivo en el presente documento). La Tifosis Aviar (FT) es una enfermedad septicémica de aves domésticas tales como pollo y pavo, y el curso puede ser agudo o crónico con mortalidad elevada. Un informe reciente ha propuesto que la Tifosis Aviar se produce frecuentemente Europa, América del Sur, África, y en el sudeste asiático, con daños que aumentan cada año. Los brotes de FT en Corea del Sur se han informado de este 1992 y las pérdidas económicas causadas por la FT en gallinas ponedoras de color marrón son muy graves (Kwon Yong-Kook. 2000 annual report on avian diseases. Publicación de información del Servicio Nacional de Investigación y Cuarentena Veterinaria. Marzo de 2001; Kim Ae-Ran y col., The prevalence of pullorum disease-fowl typhoid in grandparent stock and parent stock in Korea, 2003, Korean J Vet Res (2006) 46 (4): 347~353).

La pullorosis también está causada por una cepa de la bacteria *Salmonella*, *Salmonella Pullorum* (denominada "SP" en lo sucesivo en el presente documento). La pullorosis se produce en cualquier edad o estación, pero los pollos jóvenes son particularmente susceptibles a la enfermedad. Durante el último siglo, ha sido una enfermedad grave entre pollos jóvenes de 1-2 semanas de edad o más jóvenes. Desde la década de 1980, la aparición ha disminuido en gran medida. Sin embargo, ha vuelto a aumentar desde mediados de 1990 (Kwon Yong-Kook. 2000 annual report on avian diseases. Publicación de información del Servicio Nacional de Investigación y Cuarentena Veterinaria. March, 2001; Kim Ae-Ran y col., The prevalence of pullorum disease-fowl typhoid in grandparent stock and parent stock in Korea, 2003, Korean J Vet Res (2006) 46 (4): 347~353).

En Corea del Sur, los brotes de Tifosis Aviar y Pullorosis han aumentado desde la década de 1990, provocando daños económicos a los granjeros. Por esta razón, se ha usado una vacuna de SG viva atenuada en pollos para consumo para prevenir la Tifosis Aviar desde 2004 (Kim Ae-Ran y col., The prevalence of pullorum disease-fowl typhoid in grandparent stock and parent stock in Korea, 2003, Korean J Vet Res (2006) 46 (4): 347~353). Su eficacia es dudosa, y el uso de la vacuna viva no se permite en aves ponedoras debido al riesgo de infecciones transmitidas por el huevo. Desafortunadamente, aún no hay estrategias preventivas disponibles en el mercado frente a la Pullorosis, similar a la Tifosis Aviar. Por lo tanto, existe una necesidad urgente de nuevas maneras de evitar la Tifosis Aviar y la Pullorosis.

Mientras tanto, *Salmonella Enteritidis* (denominada "SE" en lo sucesivo en el presente documento) y *Salmonella Typhimurium* (denominada "ST" en lo sucesivo en el presente documento) son agentes patógenos zoonóticos, que no muestran especificidad hacia el hospedador, al igual que SG o SP (Informe de Zoobises; Reino Unido 2003).

SE y ST son agentes causales de la salmonelosis en aves de corral, cerdos y ganado. La salmonelosis, causada por bacterias de *Salmonella*, es una infección aguda o crónica del tracto digestivo en el ganado, y muestra los síntomas principales de fiebre, enteritis, y septicemia, en ocasiones neumonía, artritis, aborto, y mastitis. La salmonelosis se produce en todo el mundo, y de forma más frecuente durante los meses de verano (T.R. Callaway y col., *Gastrointestinal microbial ecology and the safety of the food supply as related to Salmonella*. J Anim Sci 2008.86:E163-E172). En el ganado, algunos síntomas habituales incluyen pérdida de apetito, fiebre, diarrea de color marrón oscuro o moco sanguinolento en las heces. La infección aguda en los terneros conduce a una muerte rápida, y la infección durante el embarazo conduce a muerte del feto debida a septicemia, dando como resultado un aborto prematuro (www.livestock.co.kr). En cerdos, la salmonelosis se caracteriza clínicamente por tres síndromes principales: septicemia aguda, enteritis aguda, y enteritis crónica. La septicemia aguda se produce en lechones de

2~4 meses de edad, y la muerte normalmente se produce a los 2~4 días después del inicio de los síntomas. La enteritis aguda se produce durante el periodo de engorde, y va acompañada por diarrea, fiebre elevada, neumonía, signos nerviosos. En algunos casos graves se puede producir decoloración de la piel. La enteritis crónica va acompañada de diarrea continua ([www.livestock.co.kr](http://www.livestock.co.kr)).

5 Una vez que se produce un brote de salmonelosis por SE y ST en aves de corral, cerdos, y ganado, es difícil curar solamente con agentes terapéuticos. Las razones son que la bacteria *Salmonella* presenta una fuerte resistencia a diversos fármacos y vive en células que son impermeables a los antibióticos desde la aparición de los síntomas clínicos. Hasta ahora, no ha habido procedimientos para tratar de forma eficaz la salmonelosis causada por SE y ST, incluyendo antibióticos ([www.lhca.or.kr](http://www.lhca.or.kr)).

10 Al igual que en el ganado, SE y ST causan infecciones en seres humanos a través del ganado y sus productos, lo que conduce a intoxicación alimentaria por *Salmonella*. La ingesta de productos de ganado porcino cocinados de forma inapropiada, infectados (por ejemplo, productos de carne, productos de ave, huevos y productos secundarios) infecta a los seres humanos. La intoxicación alimentaria por *Salmonella* en seres humanos normalmente implica el inicio rápido de dolor de cabeza, fiebre, dolor abdominal, diarrea, náuseas y vómitos. Los síntomas normalmente aparecen a las 6-72 horas después de la ingesta del organismo, y pueden persistir durante un periodo tan largo como 4-7 días o incluso más largo (NSW+HEALTH. 2008.01.14.).

De acuerdo con un informe de CDC (The Centers for Disease Control and Prevention, USA), un 16 % de apariciones de intoxicación alimentaria en seres humanos entre 2005 y 2008 se atribuyeron a bacterias de *Salmonella*, con SE y ST siendo responsables de un 20 % y un 18 % de las mismas, respectivamente. Con respecto a la intoxicación alimentaria por *Salmonella* en seres humanos entre 1973 y 1984, los vehículos de transmisión alimentarios implicados fueron supuestamente pollo (5 %), carne de res (19 %), cerdo (7 %), productos lácteos (6 %), y pavo (9 %). En 1974~1984, el ensayo de contaminación bacteriana en pollos para consumo durante el procedimiento de matanza mostraba un 35 % o más de incidencia de *Salmonella*. En 1983, la *Salmonella* se aisló en un 50,6 % de pollos, un 68,8% de pavo, un 60 % de ganso, un 11,6 % de cerdo, y un 1,5 % de carne de res. Además, una encuesta realizada en 2007 informaba que la *Salmonella* se encontraba en un 5,5 % de carne de aves de corral sin procesar y un 1,1 % de cerdo sin procesar. En particular, se reveló que SE normalmente originada a partir de huevos o carne de aves de corral, y ST de carne de cerdo, carne de aves de corral, carne de res contaminadas ([www.cdc.gov](http://www.cdc.gov)) (Centers for Disease Control and Prevention (CDC)). Por ejemplo, la intoxicación alimentaria causada por SE ha aumentado rápidamente en Estados Unidos, Canadá y Europa desde 1988, y algunos estudios epidemiológicos demostraron que esto se atribuía a huevos o alimentos que contenían huevo (Agre-Food Safety Information Service (AGROS). Domestic and foreign food poisoning occurrence and management trend. 2008. 02). Una evaluación de riesgo dirigida por FAO y OMS en 2002 indicaba que la incidencia de salmonelosis en seres humanos transmitida a través de huevos y carne de ave de corral parecía tener una relación lineal con el predominio de *Salmonella* observada en aves de corral. Esto significa que, cuando se reduce el predominio de *Salmonella* en aves de corral, la incidencia de salmonelosis de seres humanos disminuirá (*Salmonella* control at the source; Organización Mundial de la Salud. International Food Safety Authorities Network (INFOSAN) Information Note No. 03/2007). Recientemente, las preocupaciones con respecto a la seguridad alimentaria se han visto impulsadas por brotes de *Salmonella* de productos tan variados como cacahuates, espinacas, tomates, pistachos, pimientos y, más recientemente, masa para galletas (Jane Black y Ed O'Keefe. Overhaul of Food Safety Rules in the Works. Washington Post Staff Writers Wednesday, July 8, 2009).

Por estas razones, las infecciones por *Salmonella* se deben informar en Alemania (6 y 7 de la ley alemana sobre prevención de enfermedades infecciosas, Infektionsschutzgesetz). Entre 1990 y 2005 el número de casos oficialmente registrados disminuyó de aproximadamente 200.000 casos a aproximadamente 50.000. Se calcula que cada cinco personas en Alemania es portadora de *Salmonella*. En Estados Unidos, cada año se informan aproximadamente 40.000 casos de infección por *Salmonella* ([en.wikipedia.org/wiki/Salmonella#cite\\_note-2](http://en.wikipedia.org/wiki/Salmonella#cite_note-2)).

Por lo tanto, existe una necesidad urgente del control de SE y ST, que causa salmonelosis en ganado y seres humanos. Los esfuerzos colaboradores de USDA y FDA han desarrollado una serie de estrategias eficaces para prevenir la salmonelosis que causa aproximadamente 1 millón de casos de enfermedades transmitidas por alimentos en Estados Unidos. Entre ellas una regla final, expedida por la FDA, es reducir la contaminación en huevos. La FDA ahora requiere que los productores de huevos sometan a ensayo en forma regular la *Salmonella* letal durante la producción, almacenamiento y transporte de huevos. Como resultado, se calcula que cada año se evitarán 79.000 enfermedades y 30 muertes debidas a huevos contaminados (Jane Black y Ed O'Keefe. Overhaul of Food Safety Rules in the Works. Washington Post Staff Writers Wednesday, July 8, 2009). En Dinamarca, algunos cálculos conservadores de un análisis de beneficio de costes que compara los costos control de la *Salmonella* en el sector de producción con los costes globales de salud pública por salmonelosis sugieren que las medidas de control de *Salmonella* ahorraron a la sociedad danesa 14,1 millones de dólares americanos en el año 2001 (*Salmonella* control at the source. Organización Mundial de la Salud. International Food Safety Authorities Network (INFOSAN) Information Note No. 03/2007).

Mientras tanto, el bacteriófago es un tipo de virus especializado que infecta y destruye solamente bacterias, y se puede autorreplicar solamente dentro de las bacterias hospedadoras. El bacteriófago consta de material genético en forma de ADN o ARN mono o bicatenario rodeado por una cobertura proteica. Los bacteriófagos se clasifican en tres

formas estructurales básicas: una cabeza con forma de icosaedro (veinte lados) con una cola; una cabeza con forma de icosaedro sin una cola; y una forma filamentos. Basándose en la estructura de su cola, la forma de bacteriófagos más abundante, que tienen una cabeza con forma de icosaedro con una cola, se dividen adicionalmente en: Myoviridae, Siphoviridae, y Podoviridae, que se caracterizan por colas contráctiles, no contráctiles largas, y no contráctiles cortas, respectivamente. Los bacteriófagos que tienen una cabeza con forma de icosaedro sin una cola se dividen basándose en la forma de su cabeza componentes, y la presencia de una cobertura. Los bacteriófagos filamentosos que tienen ADN como su material genético se dividen basándose en su tamaño, forma, cobertura, y componentes del filamento (H.W. Ackermann. Frequency of morfological phage descriptions in the year 2000; Arch Virol (2001) 146: 843-857; Elizabeth Kutter y col. Bacteriophages biology and application; CRC press).

Durante la infección, un bacteriófago ataca a una bacteria e inserta su material genético en la célula. Después de esto, un bacteriófago sigue uno de dos ciclos de vida, lítico o lisogénico. Los bacteriófagos líticos se encargan de la maquinaria de la célula para preparar componentes de fago. A continuación destruyen o alisan la célula, liberándolo las partículas de fago. Los bacteriófagos lisogénicos incorporan su ácido nucleico en el cromosoma de la célula hospedadora y se replican con la misma en forma de una unidad sin destruir la célula. En ciertas condiciones, algunos fagos lisogénicos se pueden inducir para que sigan un ciclo lítico (Elizabeth Kutter y col. Bacteriophages biology and application. CRC Press).

Después del descubrimiento de bacteriófagos, inicialmente se depositó muchísima confianza en su uso para terapia en enfermedades infecciosas. Sin embargo, cuando los antibióticos de amplio espectro comenzaron a usarse de forma habitual, se observó que algunos bacteriófagos eran innecesarios debido a un espectro diana específico. No obstante, el uso incorrecto y el abuso de antibióticos dio como resultado el aumento de las preocupaciones con respecto a la resistencia a antibióticos y efectos nocivos de antibióticos residuales en los alimentos (Cislo, M y col. Bacteriophage treatment of suppurative skin infections. Arch Immunol. Ther. Exp. 1987.2: 175-183; Kim sung-hun y col., Bacteriophage; New Alternative Antibiotics. Biological research information center (BRIC)). En particular, se sabe que el promotor del crecimiento antimicrobiano (AGP), añadido a alimentos de animales para aumentar el crecimiento, induce resistencia a antibióticos, y por lo tanto, se ha introducido recientemente la prohibición del uso de promotor de crecimiento antimicrobiano (AGP). En la Unión Europea, el uso de todos los promotores de crecimiento antimicrobiano (AGP) se prohibió a partir de 2006. Corea del Sur ha prohibido el uso de algunos AGP a partir de 2009, y está considerando restricciones sobre el uso de todos los AGP en el futuro.

Estas preocupaciones crecientes con respecto al uso de antibióticos han conducido a una reaparición del interés en los bacteriófagos como una alternativa a los antibióticos. En el documento de Patente de Estados Unidos N° 6.485.902 se desvelan siete bacteriófagos para control de O157:H de *E.coli* (Uso de bacteriófagos para control de O157 de *Escherichia coli*, expedida en 2002). En el documento de Patente de Estados Unidos N° 6.942.858 se desvelan dos bacteriófagos para control de diversos microorganismos (expedida por Nymox en 2005). Muchas compañías han intentado desarrollar de forma activa diversos productos usando bacteriófagos. El sistema alimentario de EBI (Europa) desarrolló un aditivo alimentario para prevenir la intoxicación alimentaria causada por *Listeria monocytogenes*, denominada Listex-P100, que es el primer producto de bacteriófago aprobado por la de US FDA. También se desarrolló un producto basado en fagos, LMP-102 como un aditivo alimentario frente a *Listeria monocytogenes*, aprobado como GRAS (Generalmente Reconocido Como Seguro). En 2007, se desarrolló un lavado basado en fagos producido por OmniLytics para prevenir la contaminación por O157 de *E.coli* de carne de res durante la matanza, aprobado por el Food Safety and Inspection Service (FSIS) de USDA. En Europa, el fago NCIMB 30008 de *Clostridium sporogenes* y el fago NCIMB 30008 de *Clostridium tyrobutiricum* se registraron como conservantes de alimentos frente a contaminación de alimentos por *Clostridium* en 2003 y 2005, respectivamente. Tales estudios muestran que en la actualidad se está desarrollando investigación en bacteriófagos para uso como antibióticos frente a patógenos zoonóticos en productos de ganado.

Sin embargo, la mayoría de los estudios de biocontrol de fagos se han centrado en el control de *E.coli*, *Listeria*, y *Clostridium*. La *Salmonella* también es un agente patógeno zoonótico, y algunos daños debidos a este agente patógeno no se reducen. Como se ha mencionado anteriormente, dado que SE y ST presentan resistencia a múltiples fármacos, en Corea del Sur se ha realizado vigilancia de resistencia antimicrobiana a nivel nacional bajo el Decreto de Aplicación de la Ley para la Prevención de Enfermedades Contagiosas (Orden Ejecutiva 16961), Ordenanza de aplicación de la Ley para la Prevención de Enfermedades Contagiosas (Orden 179 del Ministerio de Salud y Bienestar Social), y Organización del Instituto Nacional de la Salud (Orden Ejecutiva 17164). Por consiguiente, existe una necesidad de desarrollo de bacteriófagos para controlar *Salmonella*.

### **Divulgación de la invención**

#### **Problema Técnico**

Como parte más destacada de la presente invención, la investigación intensa y exhaustiva en bacteriófagos, aislados a partir de fuentes naturales, que infectan las aves de corral con el agente patógeno *Salmonella*, realizados por los presentes inventores, con el objetivo de superar los problemas que se producen después del uso incorrecto o uso excesivo de antibióticos de amplio espectro, tal como la aparición de bacterias resistentes a fármaco o a múltiples fármacos, etc., dio como resultado el hallazgo de que algunos de los bacteriófagos aislados tienen una actividad bactericida específica frente a *Salmonella Enteritidis* (SE), *Salmonella Typhimurium* (ST), *Salmonella*

*Gallinarum* (SG) y *Salmonella Pullorum* (SP) sin influencias en bacterias beneficiosas, además de mostrar resistencia a ácidos y al calor excelentes y tolerancia a la desecación, como se identifica para las propiedades morfológicas, bioquímicas y genéticas de los mismos, y por lo tanto que los bacteriófagos se pueden usar como principios activos de composiciones para la prevención y tratamiento de enfermedades mediadas por *Salmonella Enteritidis* o *Salmonella Typhimurium*, tales como salmonelosis de ganado e intoxicación alimentaria por *Salmonella*, y enfermedades mediadas por *Salmonella Gallinarum* o *Salmonella Pullorum*, en particular, Tifosis Aviar y Pullorosis. Además, el bacteriófago de acuerdo con la presente invención se puede aplicar a diversos productos para el control de bacterias de *Salmonella*, incluyendo aditivos alimentarios para ganado, agua potable para ganado, desinfectantes de granero, y productos de limpieza para productos cárnicos.

## 10 **Solución al Problema**

Un objeto de la presente invención es proporcionar un nuevo bacteriófago que tiene una actividad específica frente a una o más bacterias de *Salmonella* seleccionadas entre el grupo que consiste en *Salmonella Enteritidis*, *Salmonella Typhimurium*, *Salmonella Gallinarum*, y *Salmonella Pullorum*, que está depositado con el número de referencia KCCM11030P.

15 Otro objeto de la presente invención es proporcionar una composición para la prevención o tratamiento de enfermedades infecciosas causadas por una o más bacterias de *Salmonella* seleccionadas entre el grupo que consiste en *Salmonella Enteritidis*, *Salmonella Typhimurium*, *Salmonella Gallinarum*, y *Salmonella Pullorum*, que comprenden el bacteriófago que está depositado con el número de referencia KCCM11030P como un principio activo.

20 Un objeto adicional de la presente invención es proporcionar un aditivo alimentario para ganado y agua potable para ganado, que comprende el bacteriófago que está depositado con el número de referencia KCCM11030P.

Además un objeto adicional de la presente invención es proporcionar un producto de limpieza o un desinfectante, que comprende el bacteriófago que está depositado con el número de referencia KCCM11030P como un principio activo.

25 En el presente documento se describe adicionalmente un procedimiento para prevenir o tratar la salmonelosis o en intoxicación alimentaria por *Salmonella* causada por *Salmonella Enteritidis* o *Salmonella Typhimurium* usando la composición que comprende el bacteriófago que está depositado con el número de referencia KCCM11030P como un principio activo. Además, en el presente documento se describe un procedimiento para prevenir o tratar la tifosis aviar y la pullorosis causadas por *Salmonella Gallinarum* o *Salmonella Pullorum*.

## 30 **Efectos Ventajosos de la Invención**

El nuevo bacteriófago de la presente invención tiene una actividad bactericida específica frente a una o más cepas de *Salmonella* seleccionadas entre el grupo que consiste en *Salmonella Enteritidis*, *Salmonella Typhimurium*, *Salmonella Gallinarum*, y *Salmonella Pullorum*, además de mostrar resistencia a ácidos y al calor excelentes y tolerancia a la desecación. Por lo tanto, el nuevo bacteriófago de la presente invención se puede usar para el control de *Salmonella Enteritidis*, *Salmonella Typhimurium*, *Salmonella Gallinarum*, y *Salmonella Pullorum* así como para prevenir o tratar enfermedades infecciosas causadas por *Salmonella Enteritidis*, *Salmonella Typhimurium*, *Salmonella Gallinarum*, o *Salmonella Pullorum*, incluyendo salmonelosis, intoxicación alimentaria por *Salmonella*, Tifosis Aviar y Pullorosis.

## **Breve Descripción de las Figuras**

40 La FIG. 1 es una fotografía de microscopía electrónica de ΦCJ7, que muestra que ΦCJ7 pertenece al grupo morfológico de la familia Siphoviridae, caracterizado por una cápside isométrica y una cola contráctil larga;

la FIG. 2 es una fotografía que muestra la formación de placas de ΦCJ7 en un cultivo de bacterias de *Salmonella*: A: en un cultivo de SE; B: en un cultivo de ST; C: en un cultivo de SG; D: en un cultivo de SP; E: en un cultivo de SA; F: en un cultivo de SB; G: en un cultivo de SC; H: en un cultivo de SD. Las placas se forman en los cultivos de SE, ST, SG y SP, pero no en los cultivos de SA, SB, SC y SD.

la FIG. 3 es el resultado de SDS-PAGE del bacteriófago ΦCJ7 aislado, en el que se muestran patrones de proteína del bacteriófago, con la aparición de proteínas principales a 38 kDa, 63 kDa, 52 kDa y 12 kDa (See-blue más 2 patrón teñido previamente (Invitrogen) usado como marcador);

la FIG. 4 es el resultado de PFGE del bacteriófago ΦCJ7 aislado, que muestra el tamaño del genoma total de aproximadamente 39,2 a 44,1 kpb, con un patrón de tamaño de ADN de 5 kpb (Bio-rad) que sirve como un marcador de tamaño;

la FIG. 5 es el resultado de PCR, realizada usando cada cebador expuesto para el ADN genómico de ΦCJ7: A: un conjunto de cebador de las SEC ID N<sup>os</sup>: 5 y 6; B: un conjunto de cebador de las SEC ID N<sup>os</sup>: 7 y 8; C: un conjunto de cebador de las SEC ID N<sup>os</sup>: 9 y 10; y D: un conjunto de cebador de las SEC ID N<sup>os</sup>: 11 y 12. Todos los productos de PCR tenían una longitud de 500 pb ~ 3 kpb;

la FIG. 6 es el resultado de ensayo de resistencia a ácidos en el bacteriófago ΦCJ7, que muestra el número de bacteriófagos que sobreviven a pH 2,1, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 5,5, 6,4, 6,9, 7,4, 8,0, 9,0, 9,8 y 11,0. El bacteriófago ΦCJ7 no perdía su actividad hasta pH 3,0, pero perdía completamente su actividad a pH 2,5 o inferior, en

comparación con el control;

la FIG. 7 es el resultado de ensayo de resistencia al calor en el bacteriófago ΦCJ7, que muestra el número de bacteriófago que sobreviven a 37, 45, 53, 60, 70 y 80 °C durante 0, 10, 30, 60 y 120 min. El bacteriófago ΦCJ7 mantenía su actividad a 70 °C hasta 2 horas, perdía su actividad un poco cuando se exponía a 80 °C durante

10 mins, perdía totalmente su actividad cuando se exponía a más tiempo;

la FIG. 8 es el resultado de ensayo de resistencia a desecación en el bacteriófago ΦCJ7 con la ayuda de una secadora de velocidad (Lab Plant), en que cuando los cambios de titulación en la condición seca se medían en comparación con titulaciones previas al secado, la actividad se mantenía en un 100 %;

la FIG. 9 es un gráfico en el que los pesos corporales de ratas se representan frente al tiempo a los 1, 3, 7, 10 y 14 días después de la administración y antes de la administración con el bacteriófago ΦCJ7, mostrando que no se encontraban cambios significativos en el peso corporal en comparación con el control (■; control de machos, □; grupo de ensayo con machos administrados con ΦCJ7, ●; control de hembras, ○; grupo de ensayo con hembras administradas con ΦCJ7); y

la FIG. 10 es un gráfico que muestra el efecto desinfectante de ΦCJ7. Se observó que ΦCJ7 era eficaz en todas las condiciones de agua ligera, dilución orgánica, y agua ligera + leche al 20 %. En particular, el efecto más elevado se obtuvo 2,5 horas después del tratamiento con ΦCJ7. El producto Harasol (Yuhan Corporation, Corea) disponible en el mercado, como un control positivo, presentaba efectos excelentes en la condición de agua ligera, pero sin efectos en la dilución orgánica, y efecto reducido en gran medida en la condición de agua ligera + leche al 20 % (■; agua ligera de control, □; dilución orgánica de control, ; agua ligera de control + leche al 20 %, ●; agua ligera con ΦCJ7, ○; dilución orgánica con ΦCJ7, ; agua ligera con ΦCJ7 + leche al 20 %, ▲; agua ligera con Harasol, Δ; dilución orgánica con Harasol; agua ligera con Harasol + leche al 20 %).

### **Mejor Modo para Realizar la Invención**

De acuerdo con un aspecto de la misma, la presente invención se refiere a un nuevo bacteriófago aislado, ΦCJ7, depositado con el número de referencia KCCM11010P, que tiene una actividad bactericida específica frente a *Salmonella Enteritidis*, *Salmonella Typhimurium*, *Salmonella Gallinarum*, o *Salmonella Pullorum*.

El bacteriófago de la presente invención pertenece a la familia Siphoviridae de morfotipo B 1 con la estructura morfológica que consiste en una cápside isométrica y una cola larga, no contráctil, caracterizado por un tamaño del genoma total de 38-45 kpb y proteínas estructurales principales que un tamaño que varía de 37 a 40 kDa, de 62 a 65 kDa, de 51 a 54 kDa y de 10 a 13 kDa.

En una realización preferente, el bacteriófago de la presente invención muestra la especificidad de especies de infección específicamente solo de *Salmonella Enteritidis*, *Salmonella Typhimurium*, *Salmonella Gallinarum*, o *Salmonella Pullorum*.

En una realización preferente, el bacteriófago de la presente invención tienen un tamaño del genoma total de aproximadamente 38-45 kpb, y de forma preferente aproximadamente 39,2-44,1 kpb. Además, el bacteriófago puede contener, como partes del genoma del mismo, una o más moléculas de ácido nucleico seleccionadas entre el grupo que consiste en las SEC ID N<sup>os</sup>: 1 a 4. Preferentemente, el bacteriófago contiene, como partes del genoma del mismo, moléculas de ácido nucleico que consisten en las SEC ID N<sup>os</sup>: 1 a 4.

Cuando se realiza PCR en presencia de un conjunto de cebador seleccionado entre las SEC ID N<sup>os</sup>: 5 y 6, SEC ID N<sup>os</sup>: 7 y 8, SEC ID N<sup>os</sup>: 9 y 10 y SEC ID N<sup>os</sup>: 11 y 12, con el genoma del bacteriófago de la presente invención sirviendo como un molde, cada producto de PCR tiene una longitud de 500 pb ~ 3 kpb. Preferentemente, cuando se realiza PCR en presencia del conjunto de cebador mencionado anteriormente, respectivamente, cada producto de PCR tiene una longitud de 500 pb ~ 3 kpb.

La expresión "molécula de ácido nucleico", como se usa en el presente documento, pretende incluir moléculas de ADN (ADNg y ADNc) y ARN. El término "nucleótidos", que cuando se unen entre sí, forman las unidades estructurales de moléculas de ácido nucleico, incluye los análogos de los mismos naturales y los modificados con azúcar o con base.

El bacteriófago de la presente invención tiene proteínas estructurales principales con un tamaño que varía de 37 a 40 kDa, de 62 a 65 kDa, de 51 a 54 kDa y de 10 a 13 kDa, y que corresponden preferentemente a tamaños respectivos de aproximadamente 38 kDa, 63 kDa, 52 kDa y 12 kDa.

Además, el bacteriófago de la presente invención muestra propiedades bioquímicas de resistencia a ácidos, calor y desecación.

Con mayor detalle, el bacteriófago de la presente invención tiene resistencia excelente a ácidos y calor de modo que puede sobrevivir en un amplio intervalo de pH de 3,0 a 11,0 y un intervalo de calor de 37 °C a 70 °C. Con respecto a la tolerancia a la desecación del mismo, el bacteriófago puede permanecer viable incluso a una temperatura elevada y condición seca de 120 °C/70 °C. Gracias a la superioridad del mismo en resistencia a ácidos, calor y desecación, el bacteriófago de la presente invención se puede usar en un amplio intervalo de temperaturas y pH, encontrando aplicaciones en composiciones y productos para la prevención y tratamiento de enfermedades del ganado y enfermedades humanas mediadas por ganado.

El bacteriófago de la presente invención que se aisló de muestras de aguas residuales de mataderos de pollos y se identificó como en posesión de una actividad bactericida específica frente a SG, SP, ST y SE y las características mencionadas anteriormente, se denominó ΦCJ7 y se depositó en el Korean Culture Center of Microorganisms (361-221, Honje 1, Seodaemun, Seúl) el 14 de agosto de 2009 con el número de referencia KCCM11030P.

5 De acuerdo con un ejemplo de la presente invención, las muestras de aguas residuales se recogieron de mataderos de pollos y se usaron para aislar de las mismas bacteriófagos que pueden lisar el SE de la célula hospedadora. También se encontró que lisaban SG, SP y ST (FIG. 2 y Tabla 1). Un examen morfológico con un microscopio electrónico confirmó que el bacteriófago (ΦCJ7) pertenece a la familia Siphoviridae del morfotipo B1 (FIG. 1).

10 Se encontró que el bacteriófago ΦCJ7 de la presente invención tenía proteínas estructurales de aproximadamente 38 kDa, 63 kDa, 52 kDa y 12 kDa, como se mide con un análisis de patrón de proteínas (FIG. 3).

Además, un análisis genómico mostraba que ΦCJ7 tiene un tamaño del genoma total de aproximadamente 44,1-39,1 kpb (FIG. 4), con las moléculas de ácido nucleico de SEC ID N<sup>os</sup>: 1 a 4 incorporadas en el mismo (Ejemplo 6). Además, se encontró que el bacteriófago de la presente invención tenía una similitud genética muy baja con bacteriófagos conocidos como se mide mediante la comparación de similitud genética con otras especies, lo que indica que el bacteriófago de la presente invención es uno nuevo (Tabla 2). Más particularmente, cuando se realizó PCR usando los conjuntos de cebador de las SEC ID N<sup>os</sup>: 5 y 6, SEC ID N<sup>os</sup>: 7 y 8, SEC ID N<sup>os</sup>: 9 y 10, y SEC ID N<sup>os</sup>: 11 y 12, que se diseñaron para ΦCJ7, los productos de PCR resultantes tenían un tamaño de 500 pb ~ 3 kpb (FIG. 5).

20 Además, se observó que las placas de fagos (formas claras formadas en un cultivo de cells en agar blando debido a lisis con fago) que resultan de la infección de ΦCJ7 en SE, ST, SG y SP tenían el mismo tamaño y turbidez (FIG. 2).

El ΦCJ7 se examinó para estabilidad en un amplio espectro de pH, temperatura y desecación. Se observó que el bacteriófago sobrevivía en un intervalo de pH de 3,0 a 11,0 (FIG. 6) y un intervalo de temperatura de 37 °C a 70 °C (FIG. 7) además de permanecer viable de forma estable incluso después de desecación a temperatura elevada (120 °C/70 °C) (FIG. 8).

25 Además, también se encontró que las cepas SE, ST, SG y SP de tipo silvestre entraban dentro del intervalo de célula hospedadora de ΦCJ7 (Tabla 3).

Cuando se administran por vía oral con ΦCJ7, se observó que algunas ratas permanecían sin cambio de peso (FIG. 9), mortalidad, síntomas generales (Tabla 4) y anomalía en órganos (Tabla 5).

30 Además, un ensayo de limpieza muestra que, cuando se usa en granjas de ganado, se encuentra que el bacteriófago ΦCJ7 controlar la *Salmonella* de forma eficaz (Tabla 7) y tiene actividad bactericida excelente y coherente frente a cepas de *Salmonella* en diversas condiciones, en comparación con agentes de limpieza convencionales como controles positivos (Tabla 7).

Estos datos implican que el bacteriófago ΦCJ7 de la presente invención se puede aplicar a diversos productos para el control de bacterias de *Salmonella*.

35 De acuerdo con otro aspecto de la misma, la presente invención se refiere a una composición para la prevención o tratamiento de enfermedades infecciosas causadas por una o más bacterias de *Salmonella* seleccionadas entre el grupo que consiste en *Salmonella enteritidis*, *Salmonella Typhimurium*, *Salmonella Gallinarum*, y *Salmonella Pullorum*, que comprenden el bacteriófago de la reivindicación 1 como un principio activo.

En una realización preferente, la composición puede contener un antibiótico.

40 Al tener actividad bactericida específica frente a *Salmonella enteritidis*, *Salmonella Typhimurium*, *Salmonella Gallinarum*, y *Salmonella Pullorum*, el bacteriófago de la presente invención se puede usar con el fin de prevenir o tratar las enfermedades causadas por las bacterias. Preferentemente, algunos ejemplos de las enfermedades infecciosas incluyen salmonelosis e intoxicación alimentaria por *Salmonella* con *Salmonella enteritidis* o *Salmonella Typhimurium*, Tifosis Aviar con *Salmonella Gallinarum* y Pullorosis con *Salmonella Pullorum* incluyen, pero no se limitan a los mismos.

45 Como se usa en el presente documento, el término "samonelosis" se refiere a síntomas después de la infección con *Salmonella*, tales como fiebre, dolor de cabeza, diarrea y vómitos. Es decir, la salmonelosis es una infección con bacterias del género *Salmonella*, que va acompañada con dos síntomas representativos: septicemia tal como fiebre tifoidea; y gastroenteritis aguda tal como intoxicación alimentaria, enteritis, y bacteriemia aguda.

50 Como se usa en el presente documento, el término "prevención" pretende incluir todas las acciones para contener o retrasar la evolución de la enfermedad a través de la administración de la composición. El término "tratamiento", en este contexto, incluye todas las acciones para mejorar o cambiar de forma beneficiosa la condición del paciente a través de la administración de la composición.

La composición de la presente invención comprende ΦCJ7 en una cantidad de  $5 \times 10^2$  a  $5 \times 10^{12}$  pfu/ml, y preferentemente en una cantidad de  $1 \times 10^6$  a  $1 \times 10^{10}$  pfu/ml.

La composición de la presente invención puede comprender adicionalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable, y se puede formular junto con el vehículo en alimentos, medicamentos y aditivos alimentarios.

5 Como se usa en el presente documento, la expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a un vehículo o diluyente que ni causa irritación significativa a un organismo ni degrada la actividad biológica ni las propiedades del principio activo administrado. Para uso en la formulación de la composición en una preparación líquida, un vehículo farmacéuticamente aceptable debe ser adecuado para estilización y biocompatibilidad. Algunos ejemplos incluyen solución salina, agua estéril, solución de Ringer, solución salina fisiológica tamponada, solución de infusión de albúmina, solución de dextrosa, solución de maltodextrina, glicerol, y etanol. Se pueden usar solos o en cualquier combinación de los mismos. Si fuera necesario, otro aditivo convencional, tal como antioxidantes, tampones, agentes bacteriostáticos, etc., se pueden añadir a la composición. Cuando se combinan adicionalmente con diluyentes, dispersantes, tensioactivos, aglutinantes y/o lubricantes, la composición de la presente invención se puede formular en inyecciones tales como soluciones acuosas, suspensiones y emulsiones, o píldoras, cápsulas, gránulos, o comprimidos.

Las composiciones profilácticas o terapéuticas de la presente invención se pueden aplicar por vía local a las zonas afectadas mediante revestimiento o pulverización.

Como alternativa, la composición de la presente invención se puede administrar a través de vías orales o parenterales. Las vías parenterales están disponibles para administración intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea o tópica.

Dependiendo de una diversidad de factores que incluyen formulaciones, el modo de administración, la edad, peso, sexo, condición y dieta del paciente o animal que se está tratando, el tiempo de administración, la vía de administración, la tasa de excreción, y sensibilidad de la reacción, la dosificación adecuada de la composición de la presente invención variara cuando se aplica, pulveriza o administra. Para los expertos en la materia será evidente que cuando la composición farmacéutica se administra a pacientes, la dosis diaria total adecuada la puede determinar un médico o veterinario que tratan a los pacientes dentro del alcance del criterio médico sensato.

Las preparaciones de dosificación oral de la composición de la presente invención pueden tomar la forma de comprimidos, trociscos, pastillas para chupar, suspensiones acuosa o de emulsión, polvos o gránulos, emulsiones, cápsulas duras o blandas, jarabes o elixires. Las formas de dosificación oral tales como comprimidos y cápsulas pueden comprender un aglutinante tal como lactosa, sacarosa, sorbitol, manitol, almidón, amilopectina, celulosa o gelatina, un excipiente tal como fosfato dicálcico, un agente disgregante tal como almidón de maíz o almidón de patata dulce, un lubricante tal como estearato de magnesio, estearato cálcico, estearilfumarato sódico, o cera de polietilenglicol. Para cápsulas, se puede usar adicionalmente un vehículo líquido tal como lípido.

Para administración no oral, la composición de la presente invención se puede formular inyecciones a través de vías subcutánea, intravenosa, o intramuscular, supositorios, o pulverizaciones inhalables a través del tracto respiratorio, tales como aerosoles. Algunas formas de inyección se pueden preparar por disolución o suspensión de la composición de la presente invención, junto con un estabilizante o un tampón, en agua y cargando la solución suspensión en formas unitarias de ampollas o vial. Para pulverizaciones, tales como aerosoles, un agente propulsor para pulverización de un concentrado dispersado en agua o polvo de humectación se puede usar en combinación con un aditivo.

El " antibiótico", como se usa en el presente documento, se refiere una sustancia o compuesto que se pueden administrar a animales para eliminar bacterias o inhibir su crecimiento y pretende incluir agentes antisépticos, bactericidas y antibacterianos. Los animales son mamíferos incluyendo seres humanos. Gracias a la ventaja de presentar una especificidad más elevada para *Salmonella* con respecto a otros antibióticos convencionales, el bacteriófago de la presente invención puede eliminar los agentes patógenos específicos sin afectar a las bacterias beneficiosas. Además, el bacteriófago de la presente invención no induce resistencia a fármacos de modo que se puede proporcionar como un nuevo antibiótico con un ciclo de vida largo.

De acuerdo con un aspecto adicional de la misma, la presente invención se refiere a un alimento o agua potable para animales, que comprende el bacteriófago como un principio activo.

50 Algunos antibióticos de aditivos alimentarios usados en la industria de pesca y ganadería están destinados a prevenir infecciones. Sin embargo, la mayoría de los antibióticos de aditivos alimentarios disponibles en la actualidad son problemáticos porque son aptos para inducir la aparición de cepas resistentes y se pueden transferir a seres humanos ya que permanecen en productos de ganado. La absorción de tales antibióticos residuales puede hacer que algunos patógenos humanos se conviertan en resistentes a antibióticos, dando como resultado la propagación de enfermedades. Además, muchos tipos de antibióticos de aditivos alimentarios, usados normalmente en combinación en alimentos para animales, puede causar la aparición de cepas resistentes a múltiples fármacos. Por lo tanto, el bacteriófago de la presente invención se puede usar como un antibiótico de aditivo alimentario que es lo suficientemente ecológico como para ser una solución a los problemas.



El alimento para animales de acuerdo con la presente invención se puede preparar mediante la adición del bacteriófago directamente o en una forma de aditivo alimentario separada a un alimento para animales. En un alimento para animales, el bacteriófago de la presente invención puede adquirir una forma líquida o una forma seca, y existe preferentemente en forma de un polvo seco. En este sentido, el bacteriófago de la presente invención se puede secar mediante secado con aire, secado natural, secado por pulverización o liofilización, pero estos procedimientos de secado no limitan la presente invención. El bacteriófago de la presente invención se puede añadir en forma de polvo en una cantidad de un 0,05 % a un 10 % en peso, preferentemente en una cantidad de un 0,1 % a un número 2 % en peso, basándose en el peso total del alimento para animales. El alimento para animales puede comprender otros aditivos convencionales útiles para la conservación del mismo a largo plazo, además del bacteriófago de la presente invención.

Al aditivo alimentario de la presente invención se le puede añadir otro microorganismo no patógeno. El microorganismo adicional disponible se puede seleccionar entre el grupo que consiste en *Bacillus subtilis* que puede producir proteasa, lipasa e invertasa, cepa de *Lactobacillus* sp. que puede ejercer actividad fisiológica y una función de descomposición en condiciones anaerobias, tales como en el estómago de ganado, hongos filamentosos que incluyen *Aspergillus oryzae* (J Animal Sci 43: 910-926, 1976) que aumenta el peso de los animales domésticos, aumenta la producción de leche y ayuda a la digestión y capacidad de absorción de alimentos, y levadura que incluye *Saccharomyce scerevisiae* (J Anim Sci 56: 735-739, 1983).

El alimento para animales que comprende ΦCJ7 de acuerdo con la presente invención puede incluir alimentos basados en plantas, tales como granos, nueces, productos secundarios alimenticios, algas, fibra, productos secundarios farmacológicos, aceite, almidones, harina, productos secundarios de grano, y alimentos de origen animal tales como proteínas, minerales, grasa, proteínas de células individuales, zooplancton, y desechos de alimentos, pero no se limita a los mismos.

El aditivo alimentario que comprende ΦCJ7 de acuerdo con la presente invención puede incluir aditivos para prevenir el deterioro de la calidad, tales como aglutinantes, emulgentes y conservantes, y aditivos para aumentar la utilidad, tales como aminoácidos, vitaminas, enzimas, probióticos, aromatizantes, nitrógeno no proteico, silicatos, agentes de tamponamiento, agentes colorantes, extractos, y oligosacáridos, pero no se limita a los mismos.

Cuando se proporciona con agua potable que contiene el bacteriófago de la presente invención, la población de bacterias de *Salmonella* en el intestino del ganado se puede reducir continuamente en el mismo ganado. Como resultado, se puede producir ganado sin *Salmonella*.

De acuerdo con otro un aspecto adicional de la misma, la presente invención se refiere a un agente de limpieza o un desinfectante, que comprende el bacteriófago como un principio activo.

El agente desinfectante que comprende el bacteriófago como un principio activo es muy útil para higiene de alimentos frente a, por ejemplo, intoxicación alimentaria. Con detalle, el agente desinfectante se puede usar, no solamente como un agente o un aditivo alimentario para prevenir la contaminación con *Salmonella*, sino también en la producción de ganado sin *Salmonella*. Para eliminar la *Salmonella*, el agente desinfectante también se puede pulverizar sobre aguas residuales domésticas y se puede aplicar a granjas avícolas, mataderos, lugares en los que murió el ganado, espacios de cocina e instalaciones de cocina, y cualquier zona en la que actúen las aves.

Además, el agente de limpieza que comprende el bacteriófago como un principio activo se puede usar en una zona corporal de animales vivos, tales como piel, Lomas y similares, ya está contaminada o potencialmente contaminada con bacterias de *Salmonella*.

Además, en el presente documento se describe un procedimiento para la prevención o tratamiento de enfermedades infecciosas mediadas por *Salmonella Enteritidis*, *Salmonella Typhimurium*, *Salmonella Gallinarum*, o *Salmonella Pullorum*, que comprende la administración de un bacteriófago, a un animal con necesidad del mismo, que tiene una actividad bactericida específica frente a *Salmonella Enteritidis*, *Salmonella Typhimurium*, *Salmonella Gallinarum*, o *Salmonella Pullorum*.

Además, en el presente documento se describe un procedimiento para la prevención o tratamiento de enfermedades infecciosas mediadas por *Salmonella Enteritidis*, *Salmonella Typhimurium*, *Salmonella Gallinarum*, o *Salmonella Pullorum*, que comprende la administración de una composición, a un animal con necesidad de la misma, para la prevención o tratamiento de enfermedades mediadas por *Salmonella Enteritidis*, *Salmonella Typhimurium*, *Salmonella Gallinarum*, o *Salmonella Pullorum*.

La composición de la presente invención se puede administrar en forma de una formulación farmacéutica en animales o se puede ingerir en forma de una mezcla con alimentos o agua potable para animales y preferentemente en forma de una mezcla con alimentos para animales. En la presente invención, los animales incluyen ganado, cerdos, pollo, aves de corral y seres humanos, pero no se limitan a los mismos.

Siempre y cuando alcance los tejidos diana, se puede tomar cualquier vía, ya sea oral o parenteral, para la administración de la composición de la presente invención. Con detalle, la composición de la presente invención se puede administrar a través de las vías oral, rectal, tópica, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, intraarterial,

transdérmica, intranasal, e inhalación.

El procedimiento para el tratamiento de enfermedades comprende la administración de la composición de la presente invención en una cantidad terapéuticamente eficaz. Para los expertos en la materia es evidente que la dosis diaria total la debería determinar un médico veterinario que trata a los pacientes dentro del alcance del criterio médico sensato. La cantidad terapéuticamente eficaz para un paciente dado puede variar dependiendo de diversos factores bien conocidos en la técnica médica, que incluyen el tipo y grado de la respuesta a conseguir, la edad, peso corporal, estado de salud, sexo y dieta del paciente, tiempo y vía de administración, la tasa de secreción de la composición, el período de tiempo de la terapia, composiciones en concreto de acuerdo a si se usan otros agentes con las mismas o no, etc.

Una mejor comprensión de la presente invención se puede obtener a través de los siguientes ejemplos que establecen para ilustración, pero que no se deben interpretar como limitantes de la presente invención.

### **Modo para la Invención**

#### **EJEMPLO 1: Aislamiento de Bacteriófago de *Salmonella***

##### **1-1. Identificación sistemática de bacteriófago y aislamiento de bacteriófago individual**

De un matadero de pollos y una planta de eliminación de aguas residuales cercana se transfirieron 50 ml de cada muestra a un tubo de centrifuga, y se centrifugaron a 4000 rpm durante 10 min, seguido de filtración del sobrenadante a través de un filtro de 0,45  $\mu\text{m}$ . Se mezclaron 18 ml del filtrado de muestra con 150  $\mu\text{l}$  de un medio de cultivo en agitación de *Salmonella Enteritidis* (denominada "SE" en lo sucesivo en el presente documento) ( $\text{DO}_{600} = 2$ ) y 2 ml de 10x de medio de Luria-Bertani (denominado "medio de LB" en lo sucesivo en el presente documento), 10 g de triptona; 5 g de extracto de levadura; 10 g de NaCl; en un volumen final de 1 l). La mezcla se cultivó a 37 °C durante 18 horas y a continuación se centrifugó a 4000 rpm durante 10 min tras lo cual el sobrenadante se filtró a través de un filtro de 0,2  $\mu\text{m}$ . Por separado, una mezcla de 3 ml de agar al 0,7 % (p/v) y 150  $\mu\text{l}$  de del medio de cultivo en agitación de SE ( $\text{DO}_{600} = 2$ ) se vertió a través de una placa de LB y se permitió que solidificara. Sobre esta placa se extendieron 10  $\mu\text{l}$  del filtrado de cultivo, seguido de incubación durante 18 horas a 37 °C (como "agar de cobertura" se usó agar al 0,7 % y la valoración del lisado de fago se realizó en la cobertura de agar, denominada técnica de superposición de agar blando).

Una dilución del medio de cultivo de muestra que contenía el lisados de fago se mezcló con 150  $\mu\text{l}$  de un medio de cultivo en agitación de SE ( $\text{DO}_{600} = 2$ ) y se sometió a ensayo de superposición de agar blando para producir placas individuales. Dado que una placa individual consistía en el mismo bacteriófago, se tomó una placa y se disolvió en 400  $\mu\text{l}$  de una solución de SM (NaCl, 5,8 g; 0,2 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; Tris-Cl 1 M (pH 7,5), 50 ml;  $\text{H}_2\text{O}$ , en un volumen final de 1 l), y se dejó durante 4 horas a temperatura ambiente para aislar bacteriófagos individuales. Para amplificar el bacteriófago aislado, se tomaron 100  $\mu\text{l}$  del sobrenadante de la solución de bacteriófago individual, mezclados con 12 ml de agar al 0,7 % y 500  $\mu\text{l}$  de un medio de cultivo en agitación de SE, y se sometió a un ensayo de superposición de agar blando en una placa de LB (150 mm de diámetro). Se vertieron 15 ml de una solución de SM en una placa en la que se había completado la lisis, tras lo cual la placa se agitó cuidadosamente durante 4 horas a temperatura ambiente para eluir los bacteriófagos del agar de cobertura. La solución de SM que contenía los bacteriófago eluidos se recuperó, y se añadió cloroformo en una cantidad que corresponde a un 1 % del volumen final, y se mezcla bien durante 10 min. Después de centrifugación a 4000 rpm durante 10 minutos, el sobrenadante resultante se filtró a través de un filtro de 0,2  $\mu\text{m}$ , y se almacenó en el refrigerador hasta su uso.

##### **1-2. Lotes de bacteriófago a gran escala**

El bacteriófago seleccionados el cultivo a gran escala usando SE. La SE se cultivó con agitación. Después de centrifugar una alícuota de  $1,5 \times 10^{10}$  cfu (unidades formadoras de colonias) a 4000 rpm durante 10 min, el sedimento se volvió a suspender en 4 ml de una solución de SM. En la suspensión se inocularon  $7,5 \times 10^7$  pfu (unidades formadoras de placas) del bacteriófago a una MOI (multiplicidad de infección) de 0,005, seguido de incubación a 37 °C durante 20 min. Esta solución se inóculo en 150 ml de un medio de LB en un matraz, y se cultivó a 37 °C durante 5 h. Se añadió cloroformo en una cantidad correspondiente a 1 % del volumen final antes de agitar la solución de cultivo durante 20 min. Se añadieron DNasa I y RNasa A hasta una concentración final de 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , cada una. La solución se dejó a 37 °C durante 30 min. Se añadieron NaCl y PEG (polietilenglicol) hasta una concentración final de 1 M y un 10 % (p/v), respectivamente y se dejó a 4 °C durante un periodo adicional de 3 h. La solución se centrifugó a 4 °C y 12.000 rpm durante 20 min para descartar el sobrenadante. Una suspensión del sedimento en 5 ml de una solución de SM se dejó a temperatura ambiente durante 20 minutos y se mezcla bien con 4 ml de cloroformo. Después de centrifugación a 4 °C y 4000 rpm durante 20 min, el sobrenadante se filtró a través de un filtro de 0,2  $\mu\text{m}$  y a continuación se sometió a ultracentrifugación usando un gradiente de densidad de glicerol para purificar  $\Phi\text{CJ7}$  (densidad: 40 %, glicerol al 5 % a 35.000 rpm y 4 °C durante 1 h). El  $\Phi\text{CJ7}$  purificado se volvió a suspender en 300  $\mu\text{l}$  de una solución de SM, seguido de valoración. El  $\Phi\text{CJ7}$  se depositó en el Centro de Cultivos de Microorganismos Coreano (361-221, Honje 1, Seodaemun, Seúl) el 14 de agosto de 2009 con el número de referencia KCCM11030P.

**EJEMPLO 2: Examen sobre Infección de ΦCJ7 de Salmonella**

5 Para analizar el bacteriófago seleccionado para actividad lítica en especies de *Salmonella* distintas de SE, se realizaron intentos de infección cruzada con otras especies de *Salmonella*. Como resultado, ΦCJ7 no infectaba a SC (*Salmonella Choleraesuis*), SD (*Salmonella Derby*), SA (*Salmonella arizonae*), ni SB (*Salmonella bongori*), pero infectaba a SE (*Salmonella Enteritidis*), ST (*Salmonella Typhimurium*), SG (*Salmonella Gallinarum*) y SP (*Salmonella Pullorum*) (véase el Ejemplo 11). Los resultados en resumen en la Tabla 1, que sigue a continuación y se muestran en la FIG. 2.

Tabla 1

[Tabla 1] [Tabla] Infección de ΦCJ7 de <i>Salmonella</i>					
Serotipo	Nombre de la cepa	Formación de placa	Serotipo	Nombre de la cepa	Formación de placa
SE	SGSC 2282	O	SA	ATCC 13314	X
ST	ATCC 14028	O	SB	ATCC 43975	X
SG	SGSC 2293	O	SC	ATCC 10708	X
SP	SGSC 2295	O	SD	ATCC 6960	X

\* ATCC : El Centro de Biorrecursos Globales  
\* SGSC : Centro de Reserva Genética de *Salmonella*

**EJEMPLO 3: Morfología del Bacteriófago ΦCJ7**

10 El ΦCJ7 purificado se diluyó en una solución de gelatina al 0,01 %, y a continuación se fijó en una solución de glutaraldehído al 2,5 %. La muestra se depositó otra gota en una placa de mica revestida con carbono (aprox. 2,5 X 2,5 mm), se adaptó durante 10 min, y se lavó con agua destilada estéril. Una película de carbono se montó en una rejilla de cobre, se tiñó con acetato de uranilo al 4 % durante 30-60 segundos, y se secó. El examen con un microscopio electrónico de transmisión JEM-1011 (a 80 kV, aumento de X 120.000 ~ X 200.000), como se muestra en la FIG. 1, observó que el purificado ΦCJ7 consistía morfológicamente en una cápside isométrica y una cola no contráctil larga, lo que indica que pertenece a la familia Siphoviridae del morfotipo B 1.

**EJEMPLO 4: Análisis de Patrón de Proteína de ΦCJ7**

20 Se mezclaron 15 µl de una solución purificada de ΦCJ7 a una titulación de 1012 pfu/ml con 3 µl de una solución de muestra de SDS 5X, y se calentó durante 5 min. La proteína total de ΦCJ7 se desarrolló en un gel Bis-Tris NuPAGE al 4 ~ 12 % (Invitrogen). A continuación, el gel se tiñó con azul de Coomassie durante 1 h a temperatura ambiente. Las bandas principales se detectaron a aproximadamente 38 kDa, 63 kDa, 52 kDa y 12 kDa, como se muestra en la FIG. 3.

**EJEMPLO 5: Tamaño Total del ADN Genómico de ΦCJ7**

25 El ADN genómico de ΦCJ7 se aisló usando ultracentrifugación. En este sentido, a un cultivo de ΦCJ7 purificado se añadieron EDTA (ácido etilendiamintetraacético (pH 8,0)), proteinasa K, y SDS (dodecil sulfato sódico) a una concentración final de 20 mM, 50 µg/ml, y un 0,5 % (p/v), respectivamente, seguido de incubación a 50 °C durante 1 h. Un volumen igual de fenol (pH 8,0) se añadió y se mezcló bien. Después de centrifugación a 12.000 rpm y temperatura ambiente durante 10 min, el sobrenadante se mezcló bien con un volumen igual de PCI (fenol:cloroformo:alcohol isoamílico = 25:24:1). Otra centrifugación a 12.000 rpm y temperatura ambiente durante 30 10 min produjo un sobrenadante que se mezcló a continuación con un volumen a 1/10 de acetato sódico 3 M y dos volúmenes de etanol frío al 95 %, y se dejó a -20 °C durante 1 h. Después de centrifugación a 0 °C y 12.000 rpm durante 10 min, el sobrenadante se retiró completamente, y el sedimento de ADN se disolvió en 50 µl de TE (Tris-EDTA (pH 8,0)). El ADN extraído se diluyó 10 veces y la absorbancia se midió a DO<sub>260</sub> para determinar su concentración. Se cargó 1 µg del ADN genómico total sobre gel de agarosa PFGE al 1 % (electroforesis en gel de campo pulsado) y se sometió a electroforesis a temperatura ambiente durante 20 horas con la ayuda de un programa 7 de sistema de PFGE de BIO RAD (intervalo de tamaño de 25-100 kpb; amp del dispositivo de temporización 0,4-2,0 segundos, forma lineal; tensión directa 180 V; tensión inversa 120 V). Como se muestra en la FIG. 4, el ADN genómico de ΦCJ7 tenía una longitud de aproximadamente 39,2 44,1 kb.

**EJEMPLO 6: Análisis Genético de ΦCJ7**

40 El análisis genético del ΦCJ7 purificado comenzó con doble digestión de 5 µg del ADN genómico de ΦCJ7 con las enzimas de restricción *StuI* y *NrnI*, *AfeI* y *HinCII*, y *SnaBI* y *PvuII*. El vector pCL1920 (Promega) se digirió con *SmaI*, y se trató con CIP (fosfatasa alcalina de intestino de ternero). También se usó un vector romo en forma de T (Sogent). El ADN genómico digerido se mezcló a una proporción de 3:1 con el vector, y se ligó a 16 °C durante 2 h.

El vector recombinante resultante se transformó en DH5 $\alpha$  de *E. coli* que a continuación se sembró en una placa de LB que contenía espicinomicina o kanamicina y X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-D-galactopiranosido) a la selección de color azul/ blanco. Las colonias seleccionadas se cultivaron durante 16 horas en un medio de cultivo que contenía el antibiótico con agitación. A continuación, los plásmidos se extrajeron usando un kit de purificación de plásmido (Promega).

La clonación de los plásmidos se confirmó por PCR usando conjuntos de cebador de FRT135 y FRT136 (SEC ID N<sup>os</sup>: 13 y 14) y M13 directo y M13 inverso (SEC ID N<sup>os</sup>: 15 y 16), y solamente se realizó selección de fragmentos de inserto con un tamaño de 1 kb o superior. Sus secuencias de bases se analizaron usando los conjuntos de cebador. Las secuencias de bases obtenidas de este modo se proporcionaban en las SEC ID N<sup>os</sup>: 1 a 4, respectivamente, cada una teniendo una longitud de 500 bp ~ 3 kpb, y se analizaron para similitud de secuencias con la ayuda de un programa blastx de NCBI, y los resultados se resumen en la Tabla 2, a continuación.

Tabla 2

[Tabla 2]

[Tabla] Similitud de Secuencias entre $\Phi$ CJ7 y Otros bacteriófagos						
N <sup>o</sup>	Organismo	Proteína	Blastx			
			Búsqueda	Sujeto	Identidad	valor de e
1	Fago KS7 de <i>Salmonella</i>	proteína hipotética	118-567	17-166	146/150 (97 %)	6e-84
	Fago SETP3 de <i>Salmonella</i>	proteína de tipo enolasa	567-103 1	1-155	145/155 (93 %)	5e-76
	Bacteriófago MB78	proteína hipotética	659-297	1-120	113/121 (93 %)	2e-60
2	Fago SETP3 de <i>Salmonella</i>	proteína hipotética	618-472	75-123	40/49 (81 %)	8e-31
	Fago T1 de <i>Enterobacteria</i>	supuesta endonucleasa	108-479	261-38 4	123/124 (99 %)	5e-60
	Fago Era 103 de <i>Erwinia</i>	proteína hipotética	498-119	1-119	69/119 (57 %)	1e-31
3	<i>Escherichia coli</i>	hipoxantina fosforribosiltransferasa	489-268	109-18 2	73/74 (98 %)	1e-33
	<i>Shigella flexneri</i>	hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa	285-506	126-19 9	73/74 (98 %)	1e-65
4	Fago de <i>Salmonella</i> KS7	proteína hipotética	103-113 1	3-346	349/371 (94 %)	0e-00
			1128-25	212-58 1	161/166 (96 %)	3e-93

#### EJEMPLO 7: Diseño de Secuencias de Cebador Específicas de $\Phi$ CJ7

Para identificar a  $\Phi$ CJ7, se diseñaron cebadores específicos de  $\Phi$ CJ7 basándose en las SEC ID N<sup>os</sup>: 1 a 4. La PCR se realizó usando cada conjunto de cebador de las SEC ID N<sup>os</sup>: 5 y 6, SEC ID N<sup>os</sup>: 7 y 8, SEC ID N<sup>os</sup>: 9 y 10, y SEC ID N<sup>os</sup>: 11 y 12. Se añadieron 0,1  $\mu$ g del ADN genómico de bacteriófago y 0,5 pmol de cada cebador a una mezcla previa (Bioneer), y el volumen final se ajustó a 20  $\mu$ l. La PCR se realizó con 30 ciclos de desnaturalización; 94 °C 30 segundos, hibridación; 60 °C 30 segundos, y polimerización; 72 °C, 1,5 min. Los productos de PCR obtenidos de este modo tenían una longitud de aproximadamente 500 bp ~ 3 kpb, con los conjuntos de cebador de las SEC ID N<sup>os</sup>: 5 y 6, SEC ID N<sup>os</sup>: 7 y 8, SEC ID N<sup>os</sup>: 9 y 10, y SEC ID N<sup>os</sup>: 11 y 12. Los resultados se muestran en la FIG. 5.

#### EJEMPLO 8: Estabilidad del pH del Bacteriófago

Para determinar si  $\Phi$ CJ7 sobrevive al entorno de pH bajo el estómago de pollo, el  $\Phi$ CJ7 se sometió a ensayo a la

estabilidad en un intervalo de pH amplio (pH 2,1, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 5,5, 6,4, 6,9, 7,4, 8,2, 9,0, 9,8, y 11,0). Se prepararon varias soluciones de (tampón de acetato sódico (pH 4,0, pH 5,5, y pH 6,4), tampón de citrato sódico (pH 2,5, pH 3,0, y pH 3,5), tampón de fosfato sódico (pH 6,9 y pH 7,4) y Tris-HCl (pH 8,2, pH 9,0, pH 10,0 y pH 11,0)) para que tuvieran una concentración de 0,2 M. Se mezclaron 180 µl de cada solución de pH con 20 µl de una solución de bacteriófago ( $1,0 \times 10^{11}$  pfu/ml) para dar cada solución de pH a una concentración de 1 M, seguido de incubación a temperatura ambiente durante 2 h. La solución de reacción se diluyó en serie, y se cultivaron 10 µl de cada dilución a 37 °C durante 18 horas con un procedimiento de superposición de agar blando para determinar las titulaciones de los lisados de fago. Los cambios de la titulación con el pH se midieron para determinar la estabilidad del bacteriófago con respecto al pH en comparación con las titulaciones de ΦCJ7 a 0 h. Los resultados mostraban que el bacteriófago no perdía su actividad y permanecía estable a pH inferior a 3,0. Sin embargo, perdía su actividad a pH 2,5 o inferior. Los resultados se muestran en la FIG. 6.

**EJEMPLO 9: Estabilidad al Calor del Bacteriófago**

Para uso como un aditivo alimentario, el bacteriófago se sometió ensayo para estabilidad al calor generado durante un procedimiento de formulación. En este sentido, se incubaron 200 µl de una solución de ΦCJ7 con una titulación de  $1,0 \times 10^{11}$  pfu/ml a 37 °C, 45 °C, 53 °C, 60 °C, 70 °C, o 80 °C durante 0 min, 10 min, 30 min, 60 min y 120 min. La solución se diluyó en serie, y 10 µl de cada dilución se cultivaron a 37 °C durante 18 horas con un procedimiento de superposición de agar blando para determinar las titulaciones de los lisados de fago. Los cambios en la titulación con la temperatura y el tiempo de exposición se midieron para determinar la estabilidad del bacteriófago al calor en comparación con las titulaciones a 0 h y 37 °C. Los resultados mostraban que el bacteriófago no perdía su actividad a 70 °C hasta 2 horas, perdía su actividad en menor medida cuando se exponía a 80 °C durante 10 min, pero perdía su actividad completamente cuando se exponía a 80 °C durante más de 10 min. Los resultados se muestran en la FIG. 7.

**EJEMPLO 10: Tolerancia a la Deseccación del Bacteriófago**

Para uso como un aditivo alimentario, el bacteriófago se sometió a ensayo para tolerancia a la condición seca establecida para un procedimiento de formulación. Basándose en los resultados obtenidos a partir del ensayo de estabilidad al calor, se realizó un ensayo de desecación usando una secadora por pulverización (Lab Plant).

Se añadieron dextrina y azúcar, sirviendo ambas como agentes estabilizantes, en una cantidad de un 40 % y un 2 % (p/v), respectivamente, a 50 ml de una solución de ΦCJ7 con una titulación de  $1,0 \times 10^{10}$  pfu/ml. La solución resultante se pulverizó dentro de una secadora por pulverización en la que la entrada y la salida se mantuvieron a 120 °C y 70 °C, respectivamente. 0,3 g del polvo obtenido de este modo se volvieron a suspender en 2 ml de una solución de SM y se midió para valores de titulación. Después de desecación, la actividad del bacteriófago no disminuyó en absoluto, en comparación con las titulaciones de secado previo. Los resultados se muestran en la FIG. 8.

**EJEMPLO 11: Espectro de Cepas de Células Hospedadoras de Tipo Silvestre a las Que Infecta el Bacteriófago**

Se evaluó la actividad lítica de ΦCJ7 frente a *Salmonella Enteritidis* (36 cepas), *Salmonella Typhimurium* (22 cepas), *Salmonella Gallinarum* (56 cepas), *Salmonella Pullorum* (19 cepas), *Salmonella Choleraesuis* (2 cepas), *Salmonella Derby* (4 cepas) y *Salmonella Arizona* (1 cepa), y *Salmonella Bongori* (1 cepa) de tipo silvestre de Corea, obtenidas en el Laboratorio de Enfermedades Aviares, Colegio de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional de Seúl, y Servicio Nacional Veterinario de Investigación y Cuarentena y los Centros de Corea para Control y Prevención de Enfermedades, además de las cepas usadas en la presente invención, SE (SGSC SE2282), ST (ATCC ST14028), SG (SGSC SG2293), y SP (SGSC SP2295). Se mezclaron 150 µl de cada medio de cultivo en agitación de cepa ( $DO_{600} = 2$ ), y se cultivaron 10 µl de solución de ΦCJ7 ( $10^{10}$  pfu/ml) a 37 °C durante 18 horas usando un procedimiento de superposición de agar blando para controlar la formación de placas. Se observó que el bacteriófago ΦCJ7 presentaba una actividad lítica de un 94 % frente a todas las cepas de SE, ST, SG y SP. Los resultados en resumen en la Tabla 3, a continuación.

Tabla 3

[Tabla 3]

Actividad Lítica de ΦCJ7 frente a Cepas SE, ST, SG, y SP de Tipo Silvestre de Corea					
Serotipo	Nombre de la cepa	Formación de Placas de ΦCJ7	Serotipo	Nombre de la cepa	Formación de Placas de ΦCJ7
	SNU SG1	O		SNU ST1	O
	SNU SG2	O		SNU ST2	O
	SNU SG3	O		SNU ST3	O

ES 2 562 640 T3

(continuación)

Actividad Lítica de ΦCJ7 frente a Cepas SE, ST, SG, y SP de Tipo Silvestre de Corea					
Serotipo	Nombre de la cepa	Formación de Placas de ΦCJ7	Serotipo	Nombre de la cepa	Formación de Placas de ΦCJ7
SG	SNU SG4	O	ST	SNU ST4	O
	SNU SG5	O		SNU ST7	O
	SNU SG6	O		SNU ST8	O
	SNU SG7	O		SNU ST11	O
	SNU SG8	O		SNU ST12	O
	SNU SG9	O		SNU ST13	X
	SNU SG10	O		SNU ST14	O
	SNU SG11	O		SNU ST17	O
	SNU SG12	O		SNU ST18	O
	SNU SG13	O		SNU ST19	X
	SNU SG14	O		SNU ST20	O
	SNU SG15	O		SNU ST25	O
	SNU SG16	O		SNU ST26	O
	SNU SG17	O		SNU ST37	O
	SNU SG18	O		SNU ST38	O
	SNU SG19	O		SNU ST41	O
	SNU SG20	O		SNU ST42	O
	SNU SG21	O		ATCC UK1	O
	SNU SG22	O		ATCC 14028S	O
	SNU SG23	O		SGSC STM1412	O
	SNU SG24	O		SGSC STM260	O
SNU SG25	O	SGSC STM SA2197	O		
SNU SG26	O	SGSC SE2282	O		
SNU SG27	O	SGSC SE2377	O		
SNU SG28	O	PT4 S1400194	O		
SNU SG30	O	PT4 LA52	O		
SNU SG31	O	NVRQS SE004	O		
SNU SG32	O	NVRQS SE00S	O		
SNU SG33	O	KCDC SE00	O		
SNU SG34	O	KCDC SE00	O		
SNU SG36	O	KCDC SE01	O		
SNU SG37	O	KCDC SE01	O		

ES 2 562 640 T3

(continuación)

Actividad Lítica de ΦCJ7 frente a Cepas SE, ST, SG, y SP de Tipo Silvestre de Corea						
Serotipo	Nombre de la cepa	Formación de Placas de ΦCJ7	Serotipo	Nombre de la cepa	Formación de Placas de ΦCJ7	
	SNU SG38	O	SE	KCDC SE01	O	
	SNU SG39	O		KCDC SE01	O	
	SNU SG40	O		KCDC SE01	O	
	SNU SG41			KCDC SE01	O	
	SNU SG42	O		KCDC SE01	O	
	SNU SG43	O		KCDC SE01	O	
	SNU SG44	O		KCDC SE01	O	
	SNU SG45	O		KCDC SE01	O	
	SNU SG46	O		KCDC SE02	O	
	SNU SG47	O		KCDC SE02	O	
	SNU SG48	O		KCDC SE02	O	
	SNU SG49	O		KCDC SE02	O	
	SNU SG50	O		KCDC SE02	O	
	SGSC SG9184	O		KCDC SE02	O	
	SGSC SG2292	O		KCDC SE02	O	
	SGSC SG2293	O		KCDC SE02	O	
	SGSC SG2744	O		KCDC SE02	O	
	SGS SG2796	O		KCDC SE02	O	
SP	SNU SP1	O	SC	KCDC SE03	O	
	SNU SP4	O		KCDC SE03	O	
	SNU SP5	O		KCDC SE03	O	
	SNU SP8	O		KCDC SE03	O	
	SNU SP11	O		KCDC SE03	O	
	SGSC SP2294	O		KCDC SE03	O	
	SGSC SP2295	O		KCDC SE03	O	
	SGSC SP2737	O		KCDC SE03	O	
	SGSC SP2739	O		ATCC SC10708	X	
	SGSC SP2742	O		ATCC SC2929	X	
	SGSC SP2743	O		SD	ATCC SD6960	X
	SGSC SP2745	O			ATCC SD2466	O
SGSC SP2751	O		ATCC SD2467	O		

(continuación)

Actividad Lítica de ΦCJ7 frente a Cepas SE, ST, SG, y SP de Tipo Silvestre de Corea					
Serotipo	Nombre de la cepa	Formación de Placas de ΦCJ7	Serotipo	Nombre de la cepa	Formación de Placas de ΦCJ7
	SGSC SP4663	O		ATCC SD2468	X
	SGSC SP4664	O	SA	ATCC SA13314	X
	SGSC SP4665	O	SB	ATCC SB43975	X
	SGSC SP4666	O			
	SGSC SP4667	O			
	SGSC SA1684	O			

\* SNU : Laboratorio de Enfermedades Aviares, Colegio de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional de Seúl  
 \* SGSC : Centro de reserva genética de *Salmonella*  
 \* NVRQS : Servicio Nacional Veterinario de Investigación y Cuarentena  
 \* KCDC : Centros Coreanos para Control y Prevención de Enfermedades

**EJEMPLO 12: Ensayo de Toxicidad de Bacteriófago**

Para uso seguro en la prevención de la salmonelosis, intoxicación alimentaria por *Salmonella*, tifosis aviar y pullorosis, el bacteriófago se sometió a ensayo *in vivo* para toxicidad. El ensayo de toxicidad se realizó con dosificaciones orales individuales. En este ensayo, las ratas se administraron por vía oral con una sola dosis de ΦCJ7 y se controlaron para toxicidad aguda para determinar concentraciones letales aproximadas de ΦCJ7. En este sentido, en primer lugar, cada una de 10 ratas macho y hembra (SD) sin patógeno específico (SPF) de 7 semanas de edad, se mantuvieron en ayunas durante 24 horas antes de la administración de ΦCJ7. El día de la administración, cinco machos y cinco hembras se administraron por vía oral a una dosis de 10 ml/kg con ΦCJ7 con una titulación de  $1 \times 10^{12}$  pfu/ml usando una sonda oral a la vez que cinco controles se administran por vía oral con una mezcla de Tris-HCl 20 mM y MgCl<sub>2</sub> 2 mM. Cuatro horas después de la administración oral, se proporcionaron alimentos a las ratas. El control se realizó cada hora durante 4 horas, partiendo de 30 min después de la administración del día de la administración. A partir de ese momento, se controlaron una vez al día durante 14 días para síntomas generales. Ninguna de ellas murió. No se generaron y síntomas tóxicos ni síntomas clínicos observables con ΦCJ7. Los resultados se resumen en las Tablas 4 y 5, que siguen a continuación. Los pesos corporales se registraron antes de la administración y a los 1, 3, 7, 10 y 14 días después de la administración. No se observaron cambios significativos en el peso corporal, lo que indica que ΦCJ7 no causa una reacción tóxica suficiente para reducir el apetito ni para cambiar el peso corporal. Estos resultados se muestran en la FIG. 9. No se encontraron anomalías observables en ningún órgano examinado con la autopsia ni a simple vista. Por lo tanto, el nuevo bacteriófago ΦCJ7 no es tóxico.

Tabla 4

[Tabla 4]

[Tabla] Ensayo de Toxicidad Oral de ΦCJ7 en Términos de Mortalidad y Síntomas Generales					
Sexo	Pfu/kg Dado	Mortalidad Final		Signos Clínicos	
		Macho	Hembra	Macho	Hembra
Macho	Control	0/5	0/5	0/5	0/5
	10 <sup>13</sup>	0/5	0/5	0/5	0/5
Hembra	Control	0/5	0/5	0/5	0/5
	10 <sup>13</sup>	0/5	0/5	0/5	0/5

Tabla 5



[Tabla 5]

[Tabla] Ensayo de Toxicidad Oral de ΦCJ7 en Términos de Anomalía en Órganos			
Sexo	Pfu/kg Dado	Hallazgo global	Frecuencia
		N.A.D <sup>a</sup>	5/5
Macho	Control	N.A.D	5/5
	10 <sup>13</sup>	N.A.D	5/5
Hembra	Control	N.A.D	5/5
	10 <sup>13</sup>	N.A.D	5/5

a: no se detectan anomalías.

**EJEMPLO 13: Eficacia del Bacteriófago**

5 Para evaluar la eficacia de ΦCJ7 para uso en la prevención y tratamiento de enfermedades mediadas por *Salmonella*, el bacteriófago se evaluó para su capacidad para controlar *Salmonella* en una granja de los pollos en la que 20.000 aves ponedoras se reprodujeron con una condición estricta frente a infección por *Salmonella*.

10 Se proporcionó agua potable que contenía ΦCJ7 a una concentración de 10<sup>6</sup> pfu/l durante un periodo de tiempo total de 25 días. En primer lugar, se proporcionó durante 17 días. A continuación, el agua potable sin ΦCJ7 se proporcionó durante 10 días antes de volver a comenzar con el suministro de agua potable que contenía ΦCJ7 durante 8 días. Antes y después del suministro de ΦCJ7, el control de *Salmonella* se realizó para entornos de lechos de paja y polvo y para muestras de desarrollo de polluelos, plumas y cáscaras de huevo. Antes del suministro de ΦCJ7, la *Salmonella* se detectó en las plumas de las incubadoras y los polluelos, lo que indica que es difícil controlar la *Salmonella* en una granja grande aunque las instalaciones para control de *Salmonella* se hagan funcionar en el mismo sitio. Por el contrario, después del suministro de ΦCJ7, no se detectó ninguna bacteria de *Salmonella* en los entornos y en las muestras de desarrollo. Por lo tanto, el suministro de ΦCJ7 en forma de agua potable era eficaz para la prevención de descarga de *Salmonella* y el control de *Salmonella*. Los resultados se resumen en la Tabla 6, a continuación.

Tabla 6

[Tabla 6]

[Tabla] Efecto de Desinfección de ΦCJ7 en <i>Salmonella</i>						
	día	Entorno		Muestra de desarrollo		
		Lecho de paja	Polvo	Polluelo	Pluma	Cáscara de huevo
Antes del suministro	-30	-	-	-	+	-
	-21	+	+	-	+	-
	-16	-	-	+	-	-
	-13	-	-	-	+	-
	0	-	-	-	-	-
Suministro primario de ΦCJ7	2	-	-	-	-	-
	4	-	-	-	-	-
	6	-	-	-	-	-
	8	-	-	-	-	-
	10	-	-	-	-	-
	12	-	-	-	-	-

(continuación)

[Tabla]						
Efecto de Desinfección de ΦCJ7 en <i>Salmonella</i>						
	día	Entorno		Muestra de desarrollo		
	14	-	-	-	-	-
	16	-	-	-	-	-
Interrupción del Suministro	-10	-	-	-	-	-
	-7	-	-	-	-	-
	-4	-	-	-	-	-
	-1	-	-	-	-	-
Suministro secundario de ΦCJ7	0	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-
	4	-	-	-	-	-
	6	-	-	-	-	-
	8	-	-	-	-	-
	9	-	-	-	-	-

**EJEMPLO 14: Eficacia del Bacteriófago como un Agente de Desinfección**

5 Para evaluar la eficacia del bacteriófago como un agente de limpieza frente a *Salmonella*. Para comparación, se usó Harasol (Yuhan Corporation, hipoclorito sódico al 4,6 %, un agente de desinfección para granjas de aves de corral, bancos y agua potable) como un control en la condición de agua ligera, materiales orgánicos, y leche.

10 Se prepararon ΦCJ7 con una titulación de 10<sup>9</sup> pfu/ml, Harasol (hipoclorito sódico al 4,6 %), y cepa de SE s. Después de su crecimiento a D.O. = 0,5, la SE se diluyó 5 veces en agua ligera para dar D.O. = 0,1. Se prepararon dos matraces de 250 ml, cada uno con 50 ml de agua ligera, una dilución de material orgánico, o una dilución de leche al 20 % en agua ligera. El bacteriófago se añadió en una cantidad de 10<sup>7</sup> pfu a un matraz a la vez que se añadía al otro una dilución del Harasol a 1/240. A cada matraz se le añadieron 2 ml del cultivo bacteriano con D.O. = 0,1, seguido de incubación a 37 °C y 200 rpm con toma de muestras a las 0,5 h, 2,5 h, 6 h, y 10 h. Las muestras se diluyeron en serie se extendieron sobre las placas de LB. Después de incubación a 37 °C durante 18 horas, se hizo recuento de las células para determinar la actividad bactericida. Cuando se usaba agua ligera, la actividad antibacteriana del agente de desinfección convencional fluctuaba en gran medida de acuerdo con las condiciones. Por el contrario, el bacteriófago ejercía actividad antibacteriana uniforme incluso en diversas condiciones. Los resultados se muestran en la FIG. 10.

**EJEMPLO 15: Eficacia del Bacteriófago como un Agente de Limpieza**

20 Para uso como un agente de limpieza para productos cárnicos, el bacteriófago se sometió a ensayo para capacidad para controlar bacterias de *Salmonella* en comparación con un agente de limpieza convencional (Hipoclorito sódico al 4~6 %). En este sentido, se adquirieron 50 g de cortes de pechuga de pollo en una tienda. Un cultivo con agitación de SE (D.O. = 2) se ajustó a una concentración de 10<sup>8</sup> cfu/ml y se extendió de forma uniforme en una cantidad de 200 µl sobre los cortes de pechuga de pollo que a continuación se secaron a temperatura ambiente durante 12 min. El bacteriófago ΦCJ7 cargado estaba contenido en los respectivos pulverizadores a una concentración de 10<sup>9</sup> pfu/l, 10<sup>10</sup> pfu/l, y 10<sup>11</sup> pfu/l y 50 ppm y el cloro como agente de limpieza estaba contenido en un pulverizador a una concentración de 50 ppm. Se pulverizaron a una tasa de una pulsación/segundo durante 10 segundos. Los cortes de pechuga de pollo tratados se colocaron en sus respectivos envases higiénicos a los que se añadieron a continuación 30 ml de un tampón de SM. Los envases se agitaron con un patrón semicircular. El WCR (aclorado de toda la carcasa) obtenido de este modo se diluyó en serie y las diluciones se extendieron sobre medios de LB, seguido de incubación a 37 °C durante 18 horas para determinar el número de SE. Inmediatamente después del tratamiento con el mismo, se encontró que el agente de limpieza dejaba bacterias de *Salmonella*. Sin embargo, se identificó que el bacteriófago ΦCJ7 era muy eficaz. Además, con el lapso de tiempo, el bacteriófago mostraba una actividad de

limpieza coherente, en comparación con el agente químico. Los resultados en resumen en la Tabla 7, a continuación.

Tabla 7

[Tabla 7]

[Tabla] Comparación de Eficacia de Limpieza entre ΦCJ7 y Agente de Limpieza		
Tiempo (min)	Sustancia	Tasa de Reducción de <i>Salmonella</i> (%)
0	Tampón de SM	
	PHI 10 <sup>9</sup> pfu/l	3,70
	PHI 10 <sup>10</sup> pfu/l	1,27
	PHI 10 <sup>11</sup> pfu/l	48,09
	Cloro 50 ppm	(+14,50)
30	Tampón de SM	
	PHI 10 <sup>9</sup> pfu/l	21,31
	PHI 10 <sup>10</sup> pfu/l	22,45
	PHI 10 <sup>11</sup> pfu/l	68,71
	Cloro 50 ppm	9,52
200	Tampón de SM	
	PHI 10 <sup>9</sup> pfu/l	36,00
	PHI 10 <sup>10</sup> pfu/l	43,75
	PHI 10 <sup>11</sup> pfu/l	49,63
	Cloro 50 ppm	12,59
1440	Tampón de SM	
	PHI 10 <sup>9</sup> pfu/l	24,39
	PHI 10 <sup>10</sup> pfu/l	60,58
	PHI 10 <sup>11</sup> pfu/l	73,33
	Cloro 50 ppm	13,33

5

**Aplicabilidad Industrial**

Al tener una actividad bactericida específica frente a una o más bacterias de *Salmonella* seleccionadas entre el grupo que consiste en *Salmonella Enteritidis* (SE), *Salmonella Typhimurium* (ST), *Salmonella Gallinarum* (SG), y *Salmonella Pullorum* (SP) sin afectar a las bacterias beneficiosas, además de presentar tolerancia a ácido, calor y desecación excelentes, como se ha descrito hasta el momento, el nuevo bacteriófago de la presente invención se puede usar ampliamente como un principio activo para agentes terapéuticos, alimentos animales o agua potable, agentes de limpieza y desinfectantes para prevenir y tratar las enfermedades infecciosas causadas por *Salmonella Enteritidis*, *Salmonella Typhimurium*, *Salmonella Gallinarum* o *Salmonella Pullorum* que incluyen salmonelosis, intoxicación alimentaria por *Salmonella*, Tifosis Aviar, y Pullorosis.

10

15

<110> CJ Cheiljedang Corporation

<120> Nuevo bacteriófago y composición antibacteriana que comprende al mismo

<130> OPA10064/PCT

<150> US61/239.748

<151> 03-09-2009

20

<160> 16

ES 2 562 640 T3

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 1394

<212> ADN

5 <213> Bacteriófago KCCM11030P

<400> 1

```

cctatagtat cgaaaggcta ctogatgacg cgaggtaaca acgtgtggcg agtagacctg      60
gccggtggcg ggggttcgcca ggggctgat acatactttg atatgttccc gattaacggt      120
accctggtcg taccaccggt ggggcggcaa gcattcctca gtttcatgga gaaggtagac      180
ggaggggctt ccagtttctg gatgaaacac gacttgggtc agggtatcga ggattaccag      240
gttactctaa catctacgtg gaacgagtcc accgaacgac ggaagaactg ggttaataact      300
ttcacggcca cagccgagaa atcaccattc caggaagccg gcagcgctctg tottaaccag      360
aatctgcccg acttatatgg atgctacggc gattgtcttg gtgaatttct taaaacttac      420
ggagtgtacc aaactacatt ccctcgaatc tgggacccaa tgcaatgagt caggaatcag      480
tagaagcggc ataccggcgt aagctggcgt ccaatcccga tggcgagatg gattttatta      540
ccctggagat atcccaccct cttctttcga agcgtctggt gcttgtgcgc ggggctaacg      600
acttgaccgc tactctagag acgggtgagg ttgttacatt cgagggtaac cogatggagg      660
ccaagaacgc cgccaacaat aacgatatgg accagaccgc ctctttctct ttgccggatg      720
tgcttaatat actggacgag gaaatggacc gcatccctta tgataataag gaattgccca      780
aattcatctt ccggcgttac gtgagcacgg acctgtcata cccatgcgat gggccgggtg      840
tatatgaatt gcaaacactc acacaagaga aaggagtgtt cacagcggaa acaggtacac      900
ccatgcttaa ccaacgagct accggaatcc tgatgacgcc ggaggagatt cctttacttc      960
gagggatact gacatcgtga atattaacga ttacactggc ctgccgtatg acttcgcgcg      1020
ccgtaattgt tggcaccacg tccgcaacgt ccgggctgac gcggggttat caactccaat      1080
gttcgatgta acaagcccaa cggcaataga tgcagcttcc gatgacggcc attoagaacc      1140
taaaggtctt aggcgagtgc ttactccgca gaattttgac gccgttctac tcggtgtgaa      1200
acatcgaggg cggatagtgt ggcacgctgg ggtatattac gaagggatgg ttagccactg      1260
tgagctggcg tccagacagg ttagactgga tagtctggaa gaccttaaag atacttattc      1320
ggagattgaa ttttggcgct agtaattcac tacacacgaa acgaagacgg cacatttgac      1380

gttaaacggt atcg      1394

```

<210> 2

<211> 672

<212> ADN

10 <213> Bacteriófago KCCM11030P

ES 2 562 640 T3

<400> 2

aaccgggagg tgtcgcgta ttatgcgtat aagttcgggg attgtatgat ttcagcacat 60  
cacgggcatt gttctaactt tactaaagta gagcagtcta taataggtaa gtatcggggag 120  
atgtacgggc agtgtaagtt cacatatgtc catacgggtc acctacacca cggggcggtt 180  
aaagagacta atctttotaat tgttgagcaa caccagacat tagcggctaa agatgagtat 240  
tctagtaaag gcggttatta ttcaggtaga agcgcaaatg tgattacata ccataaacgt 300  
tacggggagg tgtcccgcat aagtatacct gttgaaatgc tgcgagacat aaacccaaa 360  
tcaacatact aaaatgtagg tgaaggatg gattggagtg aggtttttag ctacaaaaac 420  
ggcgtcctat actggaaagt caaatcatgt cgcgtaacg atgtgaatgt aggggatgtg 480  
gccgggagtt tgtgtaaaaa cggctattgg tatgtcatgt tcggtaaccg taagtttaa 540  
aggtctaggg tgggtgatga gatgttctca ggtaagattc caaaaggatt tgtcatagac 600  
cacaccaacc atgatacctg tgacgacaga attgaaaacc tgtcatgcaa atccagaagg 660  
gacaacatgg tt 672

<210> 3  
<211> 581  
<212> ADN  
<213> Bacteriófago KCCM11030P

5

<400> 3

gacggatggc ttgctgcgtg atctggatgt gttctccacg tccggactgg cottgocctg 60  
gcgtaccgtc acgggatttc caacctcaag ctgaaacacg ccaaccacaa ataaaaatgc 120  
catgccggat gcaacacatc cggcaacttc aacttactc gtccagcaga atcactttgc 180  
cgatatacgg cagatgacgg taacgctgtg cgtaatcaat gccgtaacce accacaaact 240  
catccgggat cgagaaaccg ataaattcta cggggacggt cacttcacga cgggacggtt 300  
tatccagcag cgtacaaatc gccagcgact tccggttcgag caggottaag atctcacgca 360  
ctttogacag tgtatccccg agtcgatgat atcttcaaca atcagcacgt cottgocacg 420  
gatattctca tocagatctt tgaggatttt cacatcatgg gtggtggaca tgcogctacc 480  
gtagctggag gcggtcataa agtcgacttc atgagatacc tgaacttcac ggcacaggtc 540  
cgccataaac ataatgagc cacgcagcaa ggcacggtc a 581

<210> 4  
<211> 1008  
<212> ADN  
<213> Bacteriófago KCCM11030P

10

<400> 4

ES 2 562 640 T3

acaggcaatt tagcatactc atggtcgcgt cgcaatcgcc gtgaggaacg cgctgacatt 60  
aacgtttaca ccacgacctc cggcacctgg gatgagtttg ttgaacttat gcaaccgctt 120  
aaacgttcgc gccggaacco caagacagac cocggotaca ttaccgocgc ttgtaccgcc 180  
acggtaagct ctaccggtaa agaagccgcc gaaggtatgt tctatogctg caatgctct 240  
gttacgtctt catccctggc ctatgccgac gtggacagcg cgaocgccga agagtctgca 300  
accgactgtg agatggtgcg cgagtcacgt tacgcaatga tgctctacac cacggcatcc 360  
cacaccgaag aagcgccgcy ctaccgocgc gttatgcctg taocgactcc ggtaaccggt 420  
ggcgacatca tccgcatccg gtacggcctg ttggcacact tccttaaagg togtgacgtg 480  
gatagcgccg ggttcaccct gtocgagcct atgtaocgcc cgcggtagg aagccaggtc 540  
atcgtgtctg aaagtagccg catgattacg gcgagcaagc ttatggagga agttcctgaa 600  
attaacgtta ccggtgcttc tgattataaa gttccggagg gtgaacaatc cgaattaacc 660  
gacctgttg aagagttcgc ttttgaatc ggccggacgta tgaccgaccg cggcctgcaa 720  
atgcccgcca cgcgggagca cgcgcccaa tacactaccg gcgaacctaa gcaggacgac 780  
ttcctgttct gttggccgcy cgacggcttc gagcgaccca acgttacctt gtaccacgat 840  
accgacctgg tagctacggg cgggatgaag cotggoggac gggatatgtg ggcttacgct 900  
tgtgcccga cccgcttacc ttttgaccgt gtggagtgcc gcttgggtgg gcggaggggg 960  
tcacttgca cgaagaagac ctggacgacg agaccaccag caccacaa 1008

5 <210> 5  
<211> 18  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> cebador

<400> 5  
cctatagtat cgaaaggc 18

10 <210> 6  
<211> 22  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

15 <220>  
<223> cebador

<400> 6  
cgataacgtt taacgtcaa tg 22

20 <210> 7  
<211> 18  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> cebador

ES 2 562 640 T3

<400> 7  
aaccgggagg tgctgccg 18

5 <210> 8  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> cebador

10 <400> 8  
aaccatgttg tcccttctgg 20

<210> 9  
<211> 18  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

15 <220>  
<223> cebador

<400> 9  
gacggatggc ttgctgcg 18

20 <210> 10  
<211> 18  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> cebador

25 <400> 10  
tgaccgatgc cttgctgc 18

<210> 11  
<211> 20  
<212> ADN  
30 <213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> cebador

<400> 11  
acaggcaatt tagcatactc 20

35 <210> 12  
<211> 22  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
40 <223> cebador

<400> 12  
ttgtggtgct ggtggttctt cg 22

<210> 13  
<211> 20  
45 <212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> cebador

50 <400> 13  
cgggcctctt cgctattacg 20

# ES 2 562 640 T3

<210> 14  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

5 <220>  
<223> cebador

<400> 14  
aggcttaccg gtcttactgt 20

10 <210> 15  
<211> 17  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> cebador

15 <400> 15  
gtaaaacgac ggccagt 17

<210> 16  
<211> 16  
<212> ADN  
20 <213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> cebador

<400> 16  
aacagctatg accatg 16

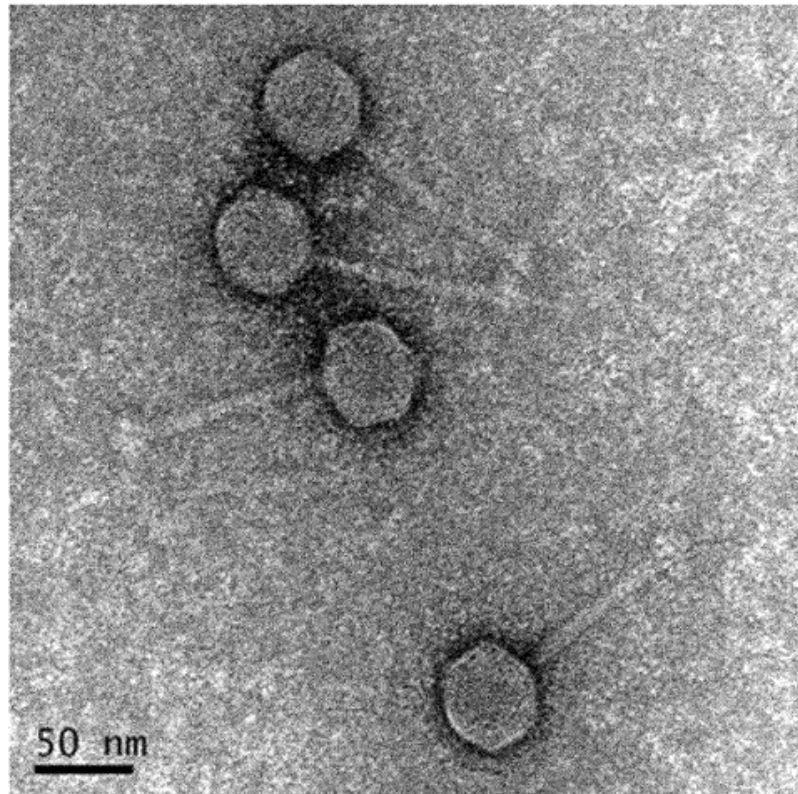
25



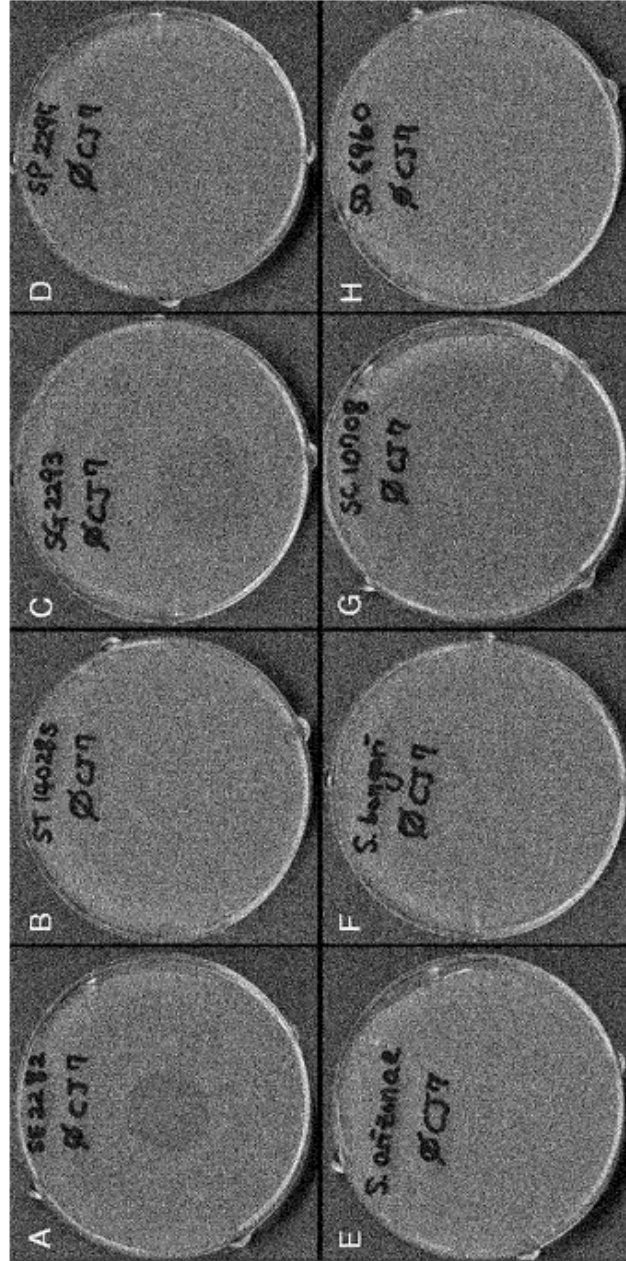
**REIVINDICACIONES**

1. Un bacteriófago aislado que tiene una actividad bactericida específica frente a una o más bacterias de *Salmonella* seleccionadas entre el grupo que consiste en *Salmonella Enteritidis*, *Salmonella Typhimurium*, *Salmonella Gallinarum* y *Salmonella Pullorum*, que está depositado con el número de acceso KCCM11030P.
- 5 2. Una composición para prevención o tratamiento de enfermedades infecciosas causadas por una o más cepas de *Salmonella* seleccionadas entre el grupo que consiste en *Salmonella Enteritidis*, *Salmonella Typhimurium*, *Salmonella Gallinarum* y *Salmonella Pullorum*, que comprende el bacteriófago de la reivindicación 1 como un principio activo.
- 10 3. La composición de acuerdo con la reivindicación 2, en la que las enfermedades infecciosas son salmonelosis e intoxicación alimentaria por *Salmonella* cuando las producen *Salmonella enteritidis* o *Salmonella Typhimurium*, Tifosis aviar cuando la produce *Salmonella Gallinarum* y pullorosis cuando la produce *Salmonella Pullorum*.
4. Una composición para su uso como un antibiótico, que comprende el bacteriófago de la reivindicación 1 como un principio activo.
- 15 5. Un alimento o agua potable para animales, que comprende el bacteriófago de la reivindicación 1 como un principio activo.
6. Un agente desinfectante o de limpieza, que comprende el bacteriófago de la reivindicación 1 como un principio activo.

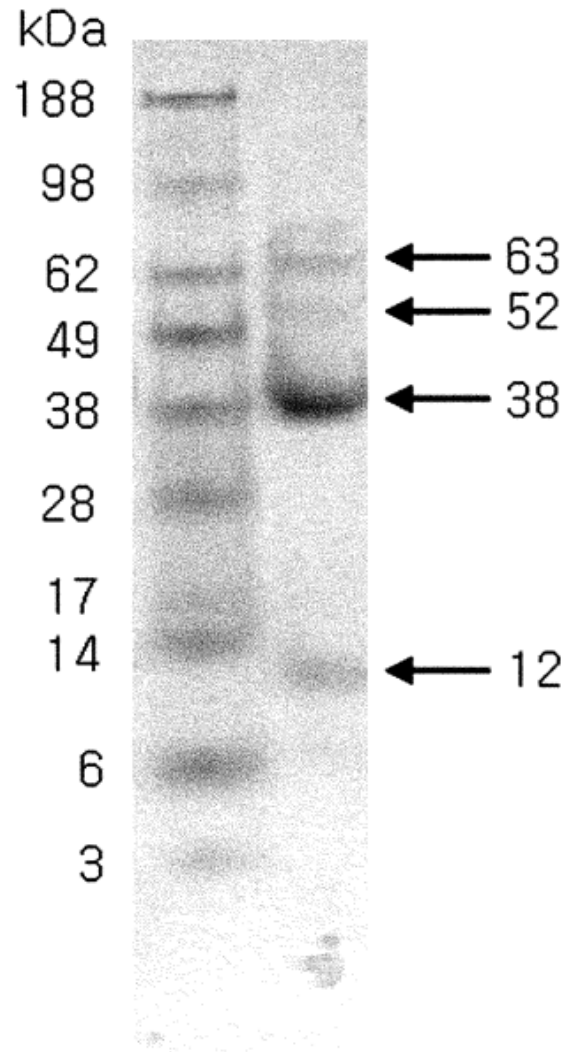
[Fig. 1]



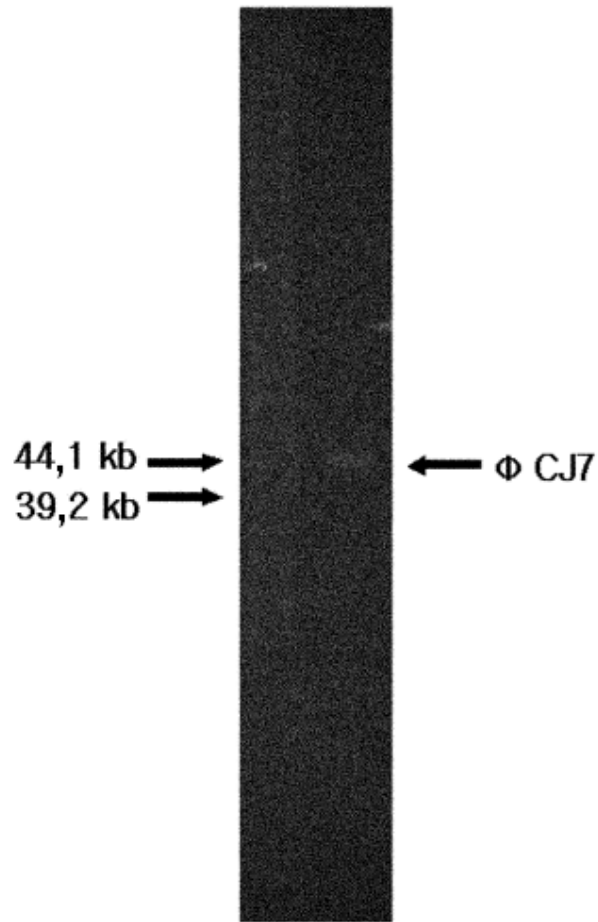
[Fig. 2]



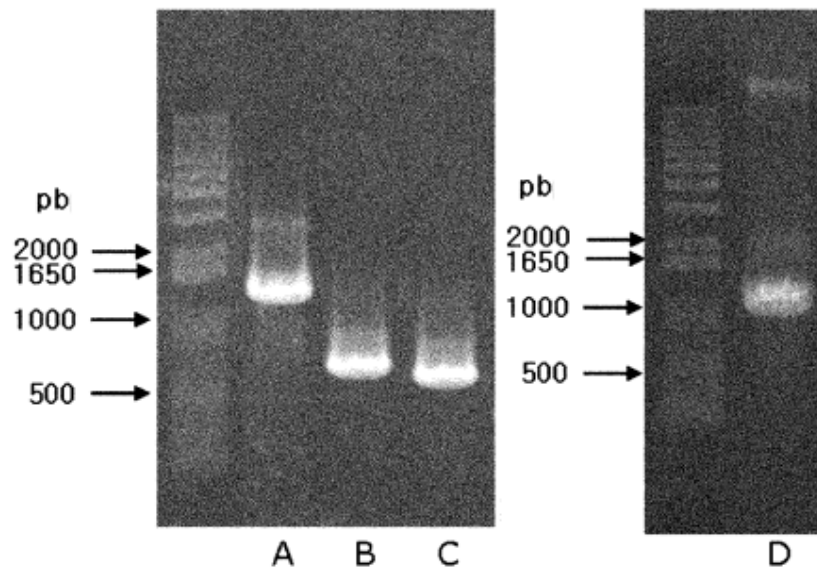
[Fig. 3]



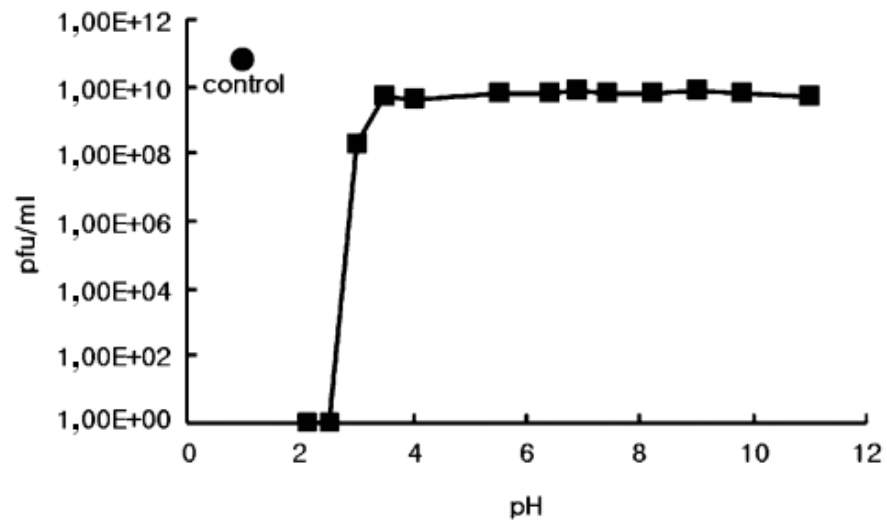
[Fig. 4]



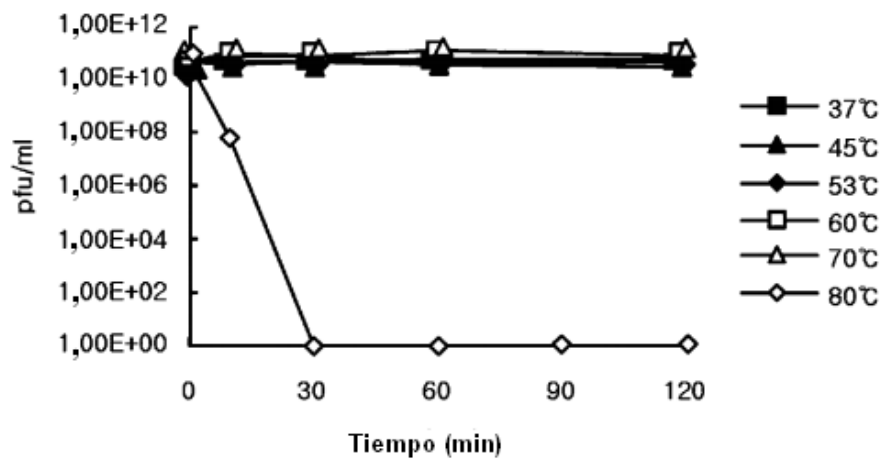
[Fig. 5]



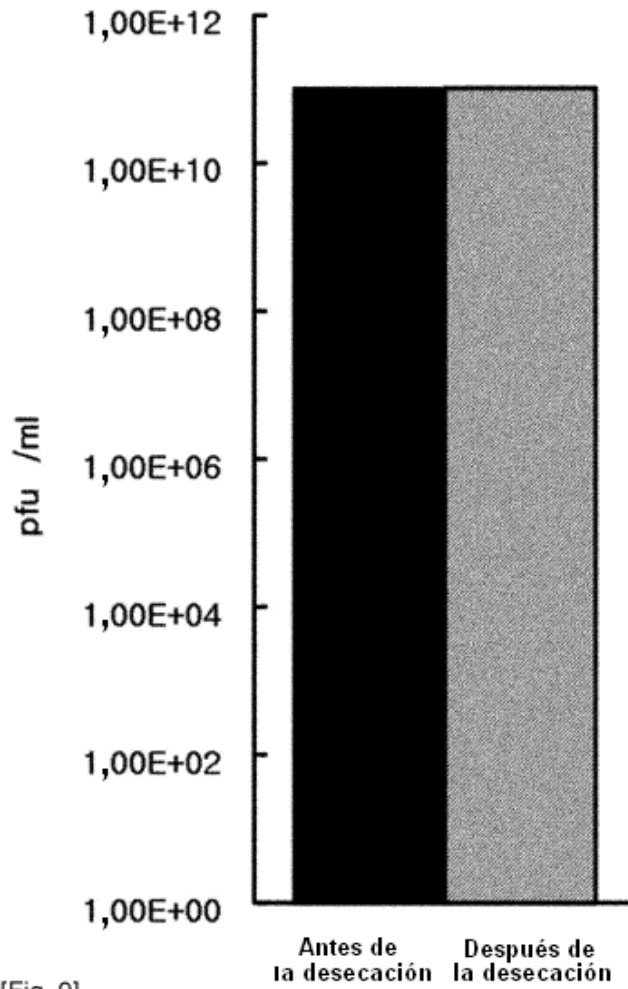
[Fig. 6]



[Fig. 7]

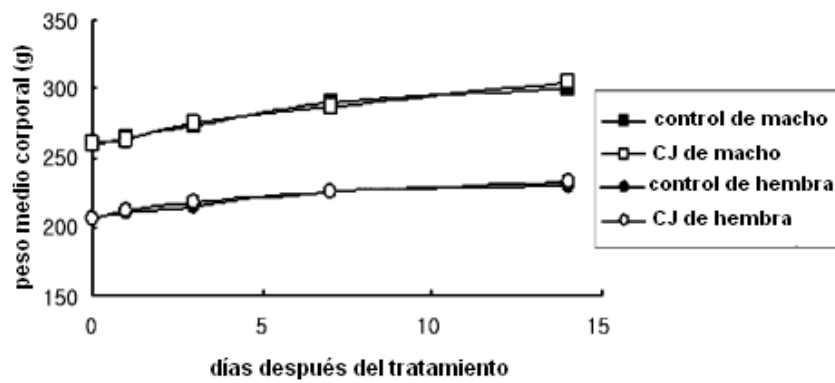


[Fig. 8]



[Fig. 9]

peso corporal de las ratas



[Fig. 10]

