

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 612 916**

51 Int. Cl.:

**A61K 35/76** (2015.01)

**A61P 31/04** (2006.01)

**C12N 7/00** (2006.01)

**A23K 10/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.09.2012 PCT/KR2012/007555**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.03.2013 WO13042964**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.09.2012 E 12833444 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.11.2016 EP 2761029**

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

30 Prioridad:

**20.09.2011 KR 20110094648**

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

**19.05.2017**

73 Titular/es:

**CJ CHEILJEDANG CORPORATION (100.0%)  
330 Dongho-ro Jung-gu  
Seoul 100-400, KR**

72 Inventor/es:

**YANG, SI YONG;  
KIM, JAE WON;  
CHO, YOUNG WOOK;  
KIM, YOUNG SA y  
SHIN, EUN MI**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 612 916 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 activo contra Salmonella y composición antibacteriana que comprende el mismo

**Campo técnico**

La presente invención se refiere a un nuevo bacteriófago y a una composición antibacteriana que comprende el mismo.

**Antecedentes de la técnica**

*Salmonella* tiene un contenido de GC genómico promedio del 50 al 52 %, que es similar al de *Escherichia coli* y *Shigella*. El género *Salmonella* es un microorganismo patógeno que causa infecciones en el ganado, así como en los seres humanos. La división serológica contempla que *Salmonella enterica*, una especie de bacteria *Salmonella*, tiene una variedad de serovares incluyendo *Salmonella gallinarum*, *Salmonella pullorum*, *Salmonella typhimurium* (ST), *Salmonella enteritidis* (SE), *Salmonella typhi*, *Salmonella choleraesuis* (SC), *Salmonella derby* (SD). De ellos, *choleraesuis* y *derby* son patógenos adaptados al ganado porcino, *gallinarum* y *pullorum* son patógenos adaptados a las aves de corral, *typhimurium* y *enteritidis* son patógenos para los seres humanos y los animales y *typhi* es un patógeno adaptado a los seres humanos, todos los cuales causan la enfermedad en sus respectivas especies, produciendo un daño enorme a los agricultores y consumidores (Informe Zoobises; Reino Unido 2003).

Recientemente, la aplicación del sistema HACCP (análisis de riesgos y puntos críticos de control) se ha convertido en un requisito obligatorio para todos los mataderos de Corea a partir del 1 de julio de 2003, debido al alto riesgo de contaminación durante el curso de la fabricación de productos de origen animal con *Salmonella*, que causa daño directo a los cerdos y a la higiene de la carne y la cual se encuentra en el tracto digestivo de los cerdos (Jae-gil Yeh. Characterization and Counterplan of Salmonellosis in Pigs. Monthly Magazine of Pig Husbandry. 2004).

La fiebre paratifoidea, la enfermedad infecciosa aguda o crónica del tracto digestivo de los cerdos están causadas por la infección por *Salmonella*, se caracteriza por gastroenteritis y septicemia y principalmente se produce durante el período de engorde. En particular, algunas de las bacterias patógenas que causan esta enfermedad pueden causar intoxicación alimentaria en los seres humanos debido a la ingestión de carne, y por lo tanto, es una enfermedad que tiene gran importancia para la salud pública. Una variedad de tipos de bacteria *Salmonella* pueden ser patógenos. Entre ellas, *Salmonella choleraesuis* y *Salmonella typhisuis* conocidas por causar cólera del cerdo son las principales causas de septicemia aguda por *Salmonella*. La enteritis aguda se produce durante el período de engorde, y se acompaña de apetito irregular, diarrea acuosa grave, fiebre alta, pérdida de vitalidad, neumonía y signos nerviosos. La decoloración de la piel puede ocurrir en algunos casos graves. *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis* y *Salmonella derby* son las principales causas de enteritis crónica.

La salmonelosis se contrae por vía oral a través de los alimentos o agua contaminados con *Salmonella* y por lo tanto se deben evitar estas rutas. Los piensos, las materias primas o el agua contaminada o los cerdos adultos portadores de agentes patógenos pueden ser fuentes importantes de infección. Durante el período agudo de la infección, los cerdos expulsan hasta  $10^6$  *Salmonella choleraesuis* o  $10^7$  *Salmonella typhimurium* por gramo de heces. Sin embargo, en muchas infecciones experimentales se ha descrito la reproducción de la enfermedad con éxito con una dosis de  $10^8$  a  $10^{11}$  de *Salmonella*. En un experimento de inyección de  $10^3$  *Salmonella* en cerdos, los cerdos inyectados no mostraron síntomas de la enfermedad, pero otros cerdos criados en el mismo corral mostraron síntomas clínicos típicos. Estos resultados indican que una gran cantidad de *Salmonella* crece en cerdos infectados de forma natural, dando como resultado la infección de otros cerdos (Jung-Bok Lee. Control of the Recent Outbreaks of Porcine Salmonella and Proliferative Enteropathy. Korea Swine Association. 2009).

En la actualidad, las infecciones virales graves tales como el síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRS) y la infección por circovirus porcino (PCV2) han estado causando enormes pérdidas económicas a la industria porcina en Corea y, por lo tanto, el control de la enfermedad se ha centrado en estas enfermedades. Dado que estas enfermedades bacterianas pueden causar mucho daño, comparable al causado por enfermedades virales, debería realizarse con antelación la prohibición del uso de antibióticos en el pienso y la investigación de la aparición de la enfermedad o el control de la misma (Jung-Bok Lee. Control of the Recent Outbreaks of Porcine Salmonella and Proliferative Enteropathy, Infectious Disease Laboratory, College of Veterinary Medicine, Konkuk University, Livestock Product Safety, 2010) (Robert W. Wills, Veterinary Microbiology, 1999). Por otro lado, los bacteriófagos, también llamados fagos, son un tipo especializado de virus que infecta solo a bacterias particulares y controla el crecimiento de las bacterias y puede auto-replicarse solo dentro de la bacteria hospedadora. Después del descubrimiento de los bacteriófagos, se pusieron inicialmente grandes esperanzas en su uso para la terapia de enfermedades infecciosas. Sin embargo, cuando se generalizó el uso de los antibióticos de amplio espectro, los bacteriófagos fueron vistos como innecesarios debido a un espectro objetivo específico. Los antibióticos o agentes antimicrobianos se han usado ampliamente para el tratamiento de enfermedades infecciosas causadas por una infección bacteriana. Sin embargo, el mal uso y abuso de los antibióticos tuvo como resultado un aumento de la preocupación por la resistencia a los antibióticos y los efectos perjudiciales de los antibióticos residuales en los alimentos. Sin embargo, la eliminación de los actuales antibióticos en los piensos podría aumentar la aparición de enfermedades bacterianas incluyendo la salmonelosis que estaba controlada por los antibióticos, como se espera de

los datos experimentales de otros países. Por lo tanto, existe una necesidad urgente de establecer una guía práctica detallada para la gestión de la *Salmonella* (Jung-Bok Lee. Control of the Recent Outbreaks of Porcine Salmonella and Proliferative Enteropathy, Infectious Disease Laboratory, College of Veterinary Medicine, Konkuk University, Livestock Product Safety. 2010).

5 Esta creciente preocupación ha llevado a un resurgimiento del interés en los bacteriófagos. Siete bacteriófagos para el control de *E. coli* O157:H7 se desvelan en la Patente US-6.485.902 (2002) y dos bacteriófagos para el control de varios microorganismos se desvelan en la Patente US-6.942.858 (otorgada a Nymox en 2005). Muchas compañías han estado intentando activamente desarrollar diversos productos utilizando bacteriófagos. El sistema alimentario EBI (Europa) desarrolló un aditivo alimentario para la prevención de la intoxicación alimentaria causada por *Listeria monocytogenes*, denominado Listerix-P100, que es el primer producto bacteriófago aprobado por la FDA de los EE.UU. Un producto a base de fagos, LMP-102 también fue desarrollado como un aditivo alimentario contra *Listeria monocytogenes*, aprobado como GRAS (generalmente considerado como seguro). En 2007, un lavado a base de fagos producido por OmniLytics fue desarrollado para prevenir la contaminación por *E. coli* O157 de la carne durante la matanza, aprobado por el Servicio de Inspección y Seguridad de los Alimentos (FSIS) de la FDA de los EE.UU. En Europa, el fago de *Clostridium sporogenes* NCIMB 30008 y el fago de *Clostridium tyrobutiricum* NCIMB 30008 se registraron como conservantes de piensos contra la contaminación por *Clostridium* de los alimentos en 2003 y 2005, respectivamente. Tales estudios muestran que actualmente se están llevando a cabo investigaciones de bacteriófagos para el control de las bacterias no susceptibles a antibióticos y la contaminación de los productos animales por patógenos zoonóticos.

20 Sin embargo, la mayor parte de los estudios de control biológico con fagos se han centrado en el control de *E. coli*, *Listeria* y *Clostridium*. *Salmonella* también es un patógeno zoonótico y los daños debidos a este patógeno no se reducen. Como se ha mencionado anteriormente, puesto que *Salmonella* presenta resistencia a múltiples fármacos, se ha llevado a cabo en Corea la vigilancia de la resistencia antimicrobiana a nivel nacional bajo el decreto de aplicación de la Ley de prevención de enfermedades contagiosas (Orden Ejecutiva 16961), Orden de aplicación de la Ley de prevención de enfermedades contagiosas (Orden del Ministerio de Salud y Bienestar Social 179) y la Organización del Instituto Nacional de Salud (orden Ejecutiva 17164). En consecuencia, hay una necesidad de desarrollo de bacteriófagos para controlar la *Salmonella*.

### **Divulgación de la invención**

#### **Problema técnico**

30 Con el fin de superar los problemas que se producen por el mal uso o el uso excesivo de antibióticos de amplio espectro, como las bacterias resistentes a los medicamentos y los residuos de medicamentos en los alimentos, los presentes inventores aislaron un bacteriófago de fuentes naturales, bacteriófago que tiene una actividad bactericida específica contra la *Salmonella* que causa enfermedades graves en el ganado. En consecuencia, encontraron que el bacteriófago tiene una actividad bactericida específica contra *Salmonella choleraesuis* (SC), *Salmonella typhimurium* (ST), *Salmonella derby* (SD), *Salmonella infantis* (SI) y *Salmonella newport* (SN) sin afectar a las bacterias beneficiosas, además de mostrar una excelente resistencia al ácido y al calor, como se identifica por las propiedades morfológicas, bioquímicas y genéticas de las mismas. Además, encontraron que el bacteriófago se puede aplicar a composiciones para la prevención o el tratamiento de enfermedades mediadas por *Salmonella typhimurium*, como la salmonelosis del ganado y la intoxicación alimentaria por *Salmonella* y a diversos productos para la prevención y control efectivo de la proliferación de bacterias *Salmonella*, incluyendo aditivos alimentarios para el ganado, agua potable para el ganado, desinfectantes del granero y productos de limpieza para productos cárnicos, completando así la presente invención.

#### **Solución al problema**

45 Un objeto de la presente invención es proporcionar un nuevo bacteriófago que tiene una actividad bactericida contra *Salmonella choleraesuis*.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar una composición para la prevención o tratamiento de enfermedades infecciosas causadas por *Salmonella choleraesuis*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella derby*, *Salmonella infantis* o *Salmonella newport*, que comprende el bacteriófago como un principio activo.

50 Otro objeto más de la presente invención es proporcionar un antibiótico, que comprende el bacteriófago como un principio activo.

Otro objeto más de la presente invención es proporcionar un pienso para animales o agua potable, que comprende el bacteriófago como un principio activo.

Otro objeto más de la presente invención es proporcionar un desinfectante o limpiador, que comprende el bacteriófago como un principio activo.

55 Otro objeto más de la presente invención es proporcionar un procedimiento para prevenir o tratar las enfermedades infecciosas causadas por *Salmonella choleraesuis*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella derby*, *Salmonella infantis* o

*Salmonella newport*, utilizando el bacteriófago o la composición.

### Efectos ventajosos de la invención

El nuevo bacteriófago de la presente invención tiene una actividad bactericida específica contra *Salmonella choleraesuis*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella derby*, *Salmonella infantis* o *Salmonella newport* sin afectar a las bacterias beneficiosas y una excelente resistencia al ácido y al calor y tolerancia a la desecación. Por lo tanto, el nuevo bacteriófago se puede utilizar para la prevención o tratamiento de la salmonelosis o la intoxicación alimentaria por *Salmonella*, la cual es una enfermedad infecciosa causada por *Salmonella choleraesuis*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella derby*, *Salmonella infantis* o *Salmonella newport* y que también puede ser ampliamente utilizado en los piensos animales, el agua potable para el ganado, desinfectantes y limpiadores.

### Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1 es una fotografía de microscopía electrónica de ΦCJ11, que pertenece a la familia *Siphoviridae* de morfotipo B 1, caracterizado por una cápside isométrica y una cola larga no contráctil;

La FIG. 2 es una fotografía que muestra la formación de placas de ΦCJ11 en un césped de bacterias *Salmonella*, en el cual (A,B;SC, C;SG, D;ST, E;SI, F,G;SD, H;SN), se observó la formación de placas en los céspedes de SC, ST, SI, SD y SN, pero no en el césped de SG;

La FIG. 3 es el resultado de la SDS-PAGE del bacteriófago ΦCJ11aislado, en el cual se detectaron las principales proteínas en 33 kDa, 55 kDa y 69,5 kDa, usando como marcador el patrón de proteínas Precision plus (BIO-RAD);

La FIG. 4 es el resultado de la PFGE del bacteriófago ΦCJ11 aislado, en el que un tamaño total del genoma de ΦCJ11 era de aproximadamente 140 kpb, utilizándose como marcador del tamaño de ADN, CHEF DNA Size Standard Lambda Ladder (Bio-Rad);

La FIG. 5 es el resultado de la PCR, realizada usando cada conjunto de cebadores para el ADN genómico de ΦCJ11, en el que A; un conjunto de cebadores de SEQ ID NOs. 5 y 6, B; un conjunto de cebadores de SEQ ID NOs. 7 y 8, C; un conjunto de cebadores de SEQ ID NOs. 9 y 10 y D; un conjunto de cebadores de SEQ ID NOs. 11 y 12, donde todos los carriles A, B, C y D tenían productos de PCR de aproximadamente 1 kpb o más de 2 kpb o menos;

La FIG. 6 es el resultado del ensayo de resistencia a los ácidos en el bacteriófago ΦCJ11, que muestra el número de bacteriófagos supervivientes a un pH de 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, en el cual el bacteriófago ΦCJ11 no perdió su actividad hasta pH 5,5, aunque el bacteriófago ΦCJ11 mostró actividad reducida a pH 4 y pH 3,5 y perdió por completo su actividad a pH 3,0 o inferior, en comparación con un control;

La FIG. 7 es el resultado del ensayo de resistencia al calor en el bacteriófago ΦCJ11, que muestra el número de bacteriófagos supervivientes a 37, 45, 53, 60 y 70 °C durante 0, 10, 30, 60 y 120 minutos, en el cual el bacteriófago ΦCJ11 mantuvo su actividad, incluso expuesto a 60 °C durante un máximo de 2 horas;

La FIG. 8 es el resultado del ensayo de tolerancia a la desecación en el bacteriófago ΦCJ11 secado con la ayuda de un concentrador SpeedVac, en el cual cuando se medían los cambios de título en condiciones secas en comparación con los títulos pre-secado, la actividad se mantuvo a 60 °C durante hasta 1 hora; y

La FIG. 9 es el resultado de los cambios en el peso corporal debido a la toxicidad después de la administración oral única de ratas Sprague-Dawley con ΦCJ11, en el cual la observación de los cambios de peso corporal antes y 1, 3, 7, 10 y 14 días después de la administración con ΦCJ11 no mostró cambios significativos en comparación con el grupo control (■; machos control, □; machos ΦCJ11, ●; hembras control, ○; hembras ΦCJ11).

### Mejor modo de llevar a cabo la invención

En un aspecto de conseguir los objetos anteriores, la presente invención proporciona un nuevo bacteriófago que tiene una actividad bactericida específica contra *Salmonella choleraesuis*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella derby*, *Salmonella infantis* o *Salmonella Newport*.

Los presentes inventores recogieron muestras fecales y de aguas residuales de pocilga y se aislaron de las mismas bacteriófagos que pueden lisar la célula hospedadora SC. También se encontró que estos bacteriófagos pueden lisar ST, SD, SI y SN (FIG. 2 y Tabla 1). Un examen morfológico al microscopio electrónico confirmó que el bacteriófago (ΦCJ11) pertenece a la familia *Siphoviridae* de morfotipo B1 (FIG. 1). Además, se encontró que el bacteriófago ΦCJ11 tiene proteínas estructurales principales de aproximadamente 69,5 kDa, 55 kDa y 33 kDa, según se mide por un análisis de patrones de proteínas (FIG. 3) y un análisis del genoma mostró que ΦCJ11 tiene un tamaño total del genoma de aproximadamente 97-145,5 kpb (FIG. 4). Además, los resultados del análisis de sus características genéticas mostraron que el bacteriófago incluye moléculas de ácido nucleico representadas por las SEC ID NOs. 1-4 dentro del genoma total (Ejemplo 6). Basándose en las SEQ ID NOs. 1 a 4, se comparó la similitud genética con otras especies. Se encontró que el bacteriófago mostraba una similitud genética muy pequeña con los bacteriófagos conocidos, lo que indica que el bacteriófago es un bacteriófago nuevo (Tabla 2). Para un análisis más detallado de las características genéticas, se utilizaron los conjuntos de cebadores específicos de ΦCJ11, concretamente, la SEQ ID NO. 5 y 6, SEQ ID NOs. 7 y 8, SEQ ID NOs. 9 y 10 y SEQ ID NOs. 11 y 12 para llevar a cabo la PCR. Se determinó que cada producto de PCR tenía un tamaño de 1,4 kpb, 1,2 kpb, 1,25 kpb y 1,5 kpb (FIG. 5).

Por otra parte, cuando SC, ST, SD, SI y SN se infectaron con ΦCJ11, se observaron las placas de fagos (zona clara en el agar blando creada por la lisis celular en una célula hospedadora por un bacteriófago) (FIG. 2). La estabilidad de ΦCJ11 fue examinada en diversas condiciones de temperatura y pH, lo que tiene como resultado que ΦCJ11 se mantiene de forma estable en una amplia gama de entornos de pH desde pH 3,5 a pH 11,0 (FIG. 6) y en entornos de alta temperatura de 37 °C a 70 °C (FIG. 7), e incluso después de la desecación (FIG. 8). Además, también se encontró que las cepas SC, ST, SD, SI y SN de tipo silvestre entran dentro del rango de la célula hospedadora de ΦCJ11 (Tabla 3).

Por último, los resultados de las pruebas de irritación cutánea y ocular en ΦCJ11 en conejos New Zealand White libres de patógenos específicos (SPF) mostraron que el índice de irritación primaria (PII) fue de 0,33, lo que indica que no es irritante y el índice de irritación ocular aguda (IAOI) fue 0 en grupos de lavado y no lavado durante todo el período experimental, lo que indica que no es irritante. Los resultados de la administración oral de ΦCJ11 no mostraron cambios en el aumento de peso (FIG. 9). Además, no se observó mortalidad, síntomas generales (Tabla 4) ni anomalía en los órganos (Tabla 5), lo que indica que no hay toxicidad.

En consecuencia, los presentes inventores designaron el bacteriófago como “bacteriófago ΦCJ11”, en el que el bacteriófago fue aislado a partir de muestras fecales y aguas residuales de pocilga, el cual tiene una actividad bactericida específica contra SC, ST, SD, SI y SN y las características anteriores y depositado en el Centro Coreano de Cultivo de Microorganismos (361-221, Honje 1, Seodaemun, Seúl) el 9 de septiembre, 2011, con el número de registro KCCM11208P.

En otro aspecto para conseguir los objetos anteriores, la presente invención proporciona una composición para la prevención o tratamiento de la enfermedad infecciosa causada por una o más bacterias *Salmonella* seleccionadas del grupo que consiste en *Salmonella choleraesuis*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella derby*, *Salmonella infantis* y *Salmonella newport*, que comprende el bacteriófago como un principio activo.

Al tener actividad bactericida específica contra *Salmonella choleraesuis*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella derby*, *Salmonella infantis* y *Salmonella newport*, el bacteriófago de la presente invención se puede utilizar con el propósito de prevenir o tratar las enfermedades causadas por estas bacterias. Preferentemente, los ejemplos de las enfermedades infecciosas incluyen la salmonelosis porcina y la intoxicación alimentaria causada por *Salmonella* por *Salmonella choleraesuis* o *Salmonella typhimurium* y la enteritis porcina aguda o crónica causada por *Salmonella derby*, *Salmonella infantis*, *Salmonella newport*, pero sin limitarse a las mismas.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término “salmonelosis” se refiere a los síntomas después de la infección por *Salmonella*, como fiebre, dolor de cabeza, diarrea y vómitos. Es decir, la salmonelosis es una infección con bacterias del género *Salmonella*, que se define con dos formas clínicas: una forma septicémica aguda que se asemeja a la fiebre tifoidea y una gastroenteritis aguda, incluyendo la enteritis, intoxicación alimentaria y septicemia aguda.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término “prevención” significa todas las acciones en las que está restringido o retardado por la administración de la composición progreso de la enfermedad.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término “tratamiento” significa todas las acciones en las que la afección ha tomado un giro hacia mejor o se ha restringido o modificado favorablemente por la administración de la composición.

La composición de la presente invención incluye ΦCJ11 en una cantidad de  $1 \times 10^2$  a  $1 \times 10^{12}$  UFP/ml y preferentemente en una cantidad de  $1 \times 10^6$  a  $1 \times 10^{10}$  UFP/ml.

Por otra parte, la composición de la presente invención puede incluir además un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término “vehículo farmacéuticamente aceptable” se refiere a un vehículo o diluyente que no causa irritación significativa a un organismo y no anula la actividad biológica ni las propiedades del compuesto administrado. Para la formulación de la composición en una preparación líquida, se puede usar un vehículo farmacéuticamente aceptable que sea estéril y biocompatible, tal como solución salina, agua estéril, solución de Ringer, solución salina tamponada, solución de infusión de albúmina, solución de dextrosa, solución de maltodextrina, glicerol, etanol y mezclas de uno o más de los mismos. Si es necesario, se pueden añadir otros aditivos convencionales tales como antioxidantes, tampones y agentes bacteriostáticos. Además, pueden añadirse adicionalmente a la composición diluyentes, dispersantes, tensioactivos, aglutinantes y lubricantes para preparar formulaciones inyectables tales como soluciones acuosas, suspensiones, y emulsiones, o formulaciones orales tales como pastillas, cápsulas, gránulos o comprimidos.

Las composiciones profilácticas o terapéuticas de la presente invención pueden aplicarse o pulverizarse a la zona afectada, o administrarse por vía oral o parenteral. La administración parenteral puede incluir la administración intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea o tópica.

La dosificación adecuada para la aplicación, pulverización o administración de la composición de la presente

invencción dependerá de una variedad de factores que incluyen procedimiento de formulación, el modo de administración, la edad, peso, sexo, afección y dieta del paciente o animal que está siendo tratado, el tiempo de administración, la vía de administración, la tasa de excreción y la sensibilidad de reacción. Un médico o veterinario que tiene experiencia ordinaria en la técnica puede determinar fácilmente y prescribir la cantidad efectiva de la composición requerida.

Ejemplos de las formas de dosificación oral que incluyen la composición de la presente invencción como un principio activo incluyen comprimidos, trociscos, pastillas para chupar, suspensiones acuosas o emulsivas, polvo o gránulos, emulsiones, cápsulas de gelatina dura o blanda, jarabes o elixires. Para la formulación tal como comprimidos y cápsulas, los siguientes son útiles: un aglutinante tal como lactosa, sacarosa, sorbitol, manitol, almidón, amilopectina, celulosa o gelatina; un excipiente tal como fosfato dicálcico; un disgregante tal como almidón de maíz o almidón de batata; y un lubricante tal como estearato de magnesio, estearato de calcio, estearilfumarato de sodio o cera de polietilenglicol. Para las cápsulas, además de los compuestos anteriormente mencionados se puede utilizar un vehículo líquido tal como lípido.

Las formas de dosificación parenteral que incluyen la composición de la presente invencción como principio activo se pueden formular en inyecciones por vía subcutánea, intravenosa, o intramuscular, supositorios, o aerosoles inhalables a través de las vías respiratorias, tales como aerosoles. Las formas inyectables se pueden preparar disolviendo o suspendiendo la composición de la presente invencción, junto con un estabilizante o un tampón, en agua y cargando la solución o suspensión en ampollas o formas unitarias de viales. Para las pulverizaciones, tales como aerosoles, se puede usar un propelente para la pulverización de un concentrado dispersado en agua o humectante en polvo en combinación con un aditivo.

En otro aspecto más de lograr los objetos anteriores, la presente invencción proporciona un antibiótico que comprende el bacteriófago como un principio activo.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "antibiótico" significa cualquier fármaco que se aplica a los animales para destruir los agentes patógenos y se utiliza en el presente documento como un término general para antisépticos, agentes bactericidas y agentes antibacterianos. Los animales son mamíferos, incluyendo humanos. El bacteriófago de la presente invencción, a diferencia de los antibióticos convencionales, tiene una alta especificidad por *Salmonella* con el fin de destruir a los patógenos específicos sin afectar a las bacterias beneficiosas y no induce la resistencia a los medicamentos de modo que pueda proporcionarse como un nuevo antibiótico con un ciclo de vida relativamente largo.

En otro aspecto más de lograr los objetos anteriores, la presente invencción proporciona un pienso para animales o agua potable que comprende el bacteriófago como un principio activo.

Los antibióticos incluidos en los alimentos utilizados en las industrias ganaderas y pesqueras están destinados a prevenir infecciones. Sin embargo, la mayoría de los antibióticos incluidos en los alimentos disponibles actualmente son problemáticos, ya que son propensos a inducir la aparición de cepas resistentes y pueden ser transferidos a los seres humanos, debido a que permanecen en los productos animales. La absorción de tales antibióticos residuales puede convertir a los patógenos humanos en resistentes a los antibióticos, dando como resultado la propagación de enfermedades. Además, puesto que hay una gran variedad de antibióticos incluidos en los alimentos, la creciente aparición global de cepas multirresistentes es una gran preocupación. Por lo tanto, el bacteriófago de la presente invencción se puede utilizar como un antibiótico incluido en los alimentos que es más respetuoso del medio ambiente y capaz de resolver los problemas anteriores.

El pienso para animales de la presente invencción se puede preparar añadiendo el bacteriófago directamente o en forma de aditivo para piensos separado a un pienso para animales. El bacteriófago de la presente invencción puede estar contenido en el pienso para animales en forma líquida o en forma sólida, preferentemente en forma de polvo seco. El procedimiento de secado puede realizarse mediante secado por aire, secado natural, secado por pulverización y liofilización, pero no se limita a estos. El bacteriófago de la presente invencción se puede añadir como una forma de polvo en una cantidad de 0,05 a 10 % en peso, preferentemente de 0,1 a 2 % en peso, basado en el peso del pienso para animales. El pienso para animales puede incluir otros aditivos convencionales para la conservación a largo plazo, además del bacteriófago de la presente invencción.

El aditivo para piensos de la presente invencción puede incluir adicionalmente otros microorganismos no patógenos. El microorganismo adicional disponible se puede seleccionar del grupo que consiste en *Bacillus subtilis* que puede producir proteasa, lipasa e invertasa, cepas de *Lactobacillus sp.* que pueden ejercer actividad fisiológica y una función de descomposición en condiciones anaerobias, tales como en el estómago del ganado, incluyendo hongos filamentosos *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 la capacidad de absorción de los alimentos y la levadura incluyendo *Saccharomyces cerevisiae* (J Anim Sci 56: 735-739, 1983).

El pienso que incluye  $\Phi$ CJ11 de la presente invencción puede incluir piensos de origen vegetal, tales como cereales, nuez, subproductos de alimentos, algas, fibra, subproductos de medicamentos, aceite, almidón, harina y subproductos de cereales y piensos de origen animal tales como proteína, materia inorgánica, grasas, minerales,

proteínas monocelulares, zooplancton y residuos de alimentos, pero sin limitarse a estos.

5 El aditivo para piensos que incluye ΦCJ11 de la presente invención puede incluir aglutinantes, emulsionantes y conservantes para la prevención del deterioro de la calidad, aminoácidos, vitaminas, enzimas, probióticos, aromatizantes, nitrógeno no proteico, silicatos, agentes de tamponamiento, agentes colorantes, extractos y oligosacáridos para mejora de la eficiencia y otras premezclas de piensos, pero sin limitarse a estos.

Además, el suministro de agua potable mezclada con el bacteriófago de la presente invención puede reducir el número de bacterias *Salmonella* en el intestino del ganado, obteniendo de ese modo ganado exento de *Salmonella*.

En otro aspecto más para conseguir los objetos anteriores, la presente invención proporciona un desinfectante o limpiador que comprende el bacteriófago como un principio activo.

10 En otro aspecto más para conseguir los objetos anteriores, la presente invención proporciona el uso del bacteriófago o la composición en un procedimiento para el tratamiento de enfermedades infecciosas causadas por *Salmonella choleraesuis*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella derby*, *Salmonella infantis* o *Salmonella newport*.

15 En detalle, el uso terapéutico de la presente invención comprende la etapa de administrar una cantidad farmacéuticamente eficaz del bacteriófago o la composición a un individuo que tiene enfermedades infecciosas causadas por *Salmonella choleraesuis*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella derby*, *Salmonella infantis* o *Salmonella Newport*.

El bacteriófago o la composición de la presente invención se puede administrar en la forma de una formulación farmacéutica en animales o puede ser ingerido como una mezcla con el pienso para animales o el agua de bebida por los animales y, preferentemente, como una mezcla con el pienso para animales.

20 Siempre y cuando llegue a los tejidos diana, se puede usar cualquier ruta, ya sea oral o parenteral, para administrar el bacteriófago o la composición de la presente invención. En detalle, la composición de la presente invención se puede administrar de una manera típica a través de cualquier vía tal como oral, rectal, tópica, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, intraarterial, transdérmica, intranasal e inhalación.

25 Será obvio para los expertos en la técnica que la dosis diaria total del bacteriófago o la composición de la presente invención a ser administrada por el procedimiento terapéutico debe ser determinada mediante un juicio médico apropiado por un médico. Preferentemente, la cantidad terapéuticamente eficaz para los pacientes dados puede variar dependiendo de varios factores bien conocidos en la técnica médica, incluyendo el tipo y grado de la respuesta que debe lograrse, el estado del paciente, tales como la edad, peso corporal, estado de salud, sexo y dieta, tiempo y vía de administración, la tasa de secreción de la composición, el período de tiempo de terapia, composiciones concretas en función de la utilización de otros agentes con la misma o no, etc.

30

### Modo de la invención

En lo sucesivo, la presente invención se describirá en más detalle con referencia a los Ejemplos. Sin embargo, estos ejemplos son solo para fines ilustrativos y la invención no pretende estar limitada por estos Ejemplos.

#### Ejemplo 1: Aislamiento del bacteriófago de *Salmonella*

##### 35 Ejemplo 1-1: Selección del bacteriófago y aislamiento de bacteriófagos individuales

Se transfirieron 50 ml de muestra de pocilga y aguas residuales del efluente a un tubo de centrifuga y se centrifugaron a 4.000 rpm durante 10 minutos. A continuación, el sobrenadante se filtró utilizando un filtro de 0,45 μm. Se mezclaron 18 ml de filtrado de la muestra con 150 μl de medio de cultivo en agitación de *Salmonella choleraesuis* ("SC") (DO<sub>600</sub>= 2) y 2 ml de 10x medio Luria-Bertani (triptona 10 g/l, extracto de levadura 5 g/l y NaCl 10 g/l; medio LB). La mezcla se cultivó a 37 °C durante 18 horas, y el medio de cultivo se centrifugó a 4.000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante se filtró utilizando un filtro de 0,2 μm. Se mezcló 3 ml de agar 0,7 % (p/v) y 150 μl de medio de cultivo en agitación de SC (DO<sub>600</sub>= 2) y se sembraron en una placa LB ("agar superior") y se dejó solidificar. Se extendió 10 μl del filtrado del cultivo sobre la misma y se cultivaron durante 18 horas a 37 °C y se llevó a cabo la titulación del lisado del fago en el agar de la parte superior, denominado procedimiento de superposiciones de agar blando.

45

El medio de cultivo de la muestra que contiene el lisado de fagos se diluyó adecuadamente y se mezcló con 150 μl de medio de cultivo con agitación de SC (DO<sub>600</sub>= 2), seguido por el procedimiento de superposiciones de agar blando, de modo que se obtuvieron placas individuales. Una única placa representa un bacteriófago y, por tanto, para el aislamiento de bacteriófagos individuales, se añadió una placa de fago a 400 μl de solución de SM (NaCl, 5,8 g/l, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, g/l, Tris-Cl 1 M (pH 7,5) 50 ml/l) y se dejó durante 4 horas a temperatura ambiente para aislar bacteriófagos individuales. Para purificar el bacteriófago en grandes cantidades, se tomaron 100 μl de sobrenadante de la solución de bacteriófago individual y se mezclaron con 12 ml de agar 0,7 % y 500 μl de medio de cultivo en agitación de SC, seguido por el procedimiento de superposiciones de agar blando en una placa LB que tiene un diámetro de 150 mm. Cuando se completó la lisis, se añadieron 15 ml de solución SM a la placa. La placa se agitó

50

suavemente durante 4 horas a temperatura ambiente para eluir los bacteriófagos del agar de la parte superior. Se recuperó la solución SM que contiene los bacteriófagos eluidos, se añadió cloroformo hasta un volumen final de 1 % y se mezcló bien durante 10 minutos. La solución se centrifugó a 4.000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante obtenido se filtró utilizando un filtro de 0,45 µm y se guardó en la nevera.

**5 Ejemplo 1-2: Lotes de bacteriófago a gran escala**

Los bacteriófagos seleccionados se cultivaron en grandes cantidades utilizando SC. SC se cultivó en agitación y una alícuota de  $1,5 \times 10^{10}$  ufc (unidades formadoras de colonias) se centrifugó a 4.000 rpm durante 10 minutos y el sedimento se resuspendió en 4 ml de solución SM. El bacteriófago de  $9,0 \times 10^8$  UFP (unidades formadoras de placas) se inoculó a la misma (MOI: multiplicidad de infección = 0,001) y se dejó a 37 °C durante 20 minutos. La solución se inoculó en 150 ml de medio LB y se cultivó a 37 °C durante 5 horas. Se añadió cloroformo hasta un volumen final de 1 % y la solución del cultivo se agitó durante 20 minutos. Se añadió DNasa I y RNasa A a una concentración final de 1 µg/ml, respectivamente. La solución se dejó a 37 °C durante 30 minutos. Se añadió NaCl y PEG (polietilenglicol) a una concentración final de 1 M y 10 % (p/v), respectivamente y se dejó a 4 °C durante 3 horas adicionales. La solución se centrifugó a 4 °C y 12.000 rpm durante 20 minutos para descartar el sobrenadante. El sedimento se resuspendió en 5 ml de solución SM y se dejó a temperatura ambiente durante 20 minutos. Se añadieron 4 ml de cloroformo a la misma y se mezclaron bien, seguido de centrifugación a 4 °C y 4.000 rpm durante 20 minutos. El sobrenadante se filtró utilizando un filtro de 0,2 µm y el bacteriófago se purificó por ultracentrifugación en gradiente de densidad de glicerol (densidad: 40 %, glicerol 5 % a 35.000 rpm y 4 °C durante 1 hora). El bacteriófago purificado fue designado como "Bacteriófago ΦCJ11" y se resuspendió en 300 µl de solución SM, seguido por valoración. El bacteriófago ΦCJ11 se depositó en el Centro Coreano de Cultivo de Microorganismos (361-221, Honje 1, Seodaemun, Seúl) el 9 de septiembre de 2011 con el número de registro KCCM11208P.

**Ejemplo 2: Examen de la infección con ΦCJ11 de Salmonella**

Para analizar el bacteriófago seleccionado por su actividad lítica en especies de *Salmonella* distintas de SC, se hicieron intentos de infección cruzada con otras especies de *Salmonella*. Se observó que ΦCJ11 infectaba SC (*Salmonella choleraesuis*), ST (*Salmonella typhimurium*), SD (*Salmonella derby*), SN (*Salmonella newport*), SI (*Salmonella infantis*), SA (*Salmonella arizonae*) y SB (*Salmonella bongori*), pero no infectaba a SE (*Salmonella enteritidis*), SG (*Salmonella gallinarum*) y SP (*Salmonella pullorum*) (Tabla 1 y FIG. 2).

Tabla 1

[Tabla 1]

Infección con ΦCJ11 de <i>Salmonella</i>					
Serotipo	Nombre de la cepa	Formación de placas de fagos	Serotipo	Nombre de la cepa	Formación de placas de fagos
SC	ATCC 10708	O	SA	ATCC 12398	O
SN	SL 317	O	SB	ATCC 12397	O
SD	ATCC 2468	O	ST	13	O
SE	SGSC 2282	X	SI	SARB 26	O
SG	SGSC 2293	X	SP	SGSC 2295	X
* ATCC: Colección Americana de Cultivos Tipo					
* SGSC: Centro de Stocks Genéticos de Salmonella					

Por otra parte, la FIG. 2 es una fotografía que muestra la formación de placas de ΦCJ11 en un césped de bacterias *Salmonella*. Como se muestra en la FIG. 2 (A,B;SC, C;SG, D;ST, E;SI, F,G;SD, H;SN), se observó la formación de placas en los céspedes de SC, ST, SI y SD y SN, no, pero en el césped de SG.

**Ejemplo 3: Morfología de ΦCJ11**

El ΦCJ11 purificado se diluyó en la solución tampón SM y a continuación se montó sobre una rejilla de cobre, se tiñó con acetato de uranilo 2 % durante 3 a 5 segundos y se secó. Se realizó un examen en un microscopio electrónico de transmisión (LIBRA 120, Carl Zeiss transmission electron Microscope, 80 kV, aumento de  $\times 120.000 \sim 200.000$ ) (FIG. 1). La FIG. 1 es una fotografía de microscopía electrónica de ΦCJ11. Como se muestra en la FIG. 1, se observó que el ΦCJ11 purificado pertenece a la familia *Siphoviridae* de morfotipo B1, que se caracteriza por una cápside isométrica y una cola larga no contráctil.

**Ejemplo 4: Análisis del patrón de proteínas de ΦCJ11**

Se mezclaron 15 µl de una solución de ΦCJ11 purificado a un título de  $10^{11}$  UPF/ml con 3 µl de una solución de muestra 5xSDS y se calentó durante 5 minutos. Se llevó a cabo una SDS-PAGE 12 % y a continuación, el gel se tiñó

con azul de Coomassie durante 1 hora a temperatura ambiente (FIG. 3). La FIG. 3 es el resultado de la SDS-PAGE del bacteriófago ΦCJ11 aislado, en la que se utilizó el patrón de proteínas Precision Plus (Bio-Rad) como marcador. Como se muestra en la FIG. 3, se detectaron las principales proteínas a 33 kDa, 55 kDa y 69,5 kDa.

**Ejemplo 5: Análisis del tamaño del ADN genómico total de ΦCJ11**

5 Se aisló el ADN genómico del ΦCJ11 purificado usando ultracentrifugación. En detalle, al medio de cultivo de ΦCJ11 purificado se añadieron EDTA (ácido etilendiaminotetraacético (pH 8,0)), proteinasa K y SDS (dodecil sulfato de sodio) a una concentración final de 20 mM, 50 µg/ml y 0,5 % (p/v), respectivamente, seguido de incubación a 50 °C durante 1 hora. Se añadió un volumen igual de fenol (pH 8,0) y se mezcló bien. Después de la centrifugación a temperatura ambiente y 12.000 rpm durante 10 minutos, el sobrenadante se mezcló bien con un volumen igual de PC (fenol:cloroformo = 1:1). Se llevó a cabo otra centrifugación a temperatura ambiente y 12.000 rpm durante 10 minutos. A continuación, se obtuvo un sobrenadante y se mezcló con un volumen igual de cloroformo, seguido de centrifugación a temperatura ambiente y 12.000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante obtenido se mezcló con 1/10 de volumen de acetato de sodio 3 M y dos volúmenes de etanol frío 95 % y se dejó a -20 °C durante 1 hora. Después de centrifugación a 0 °C y 12.000 rpm durante 10 minutos, el sobrenadante se eliminó 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 se midió la absorbancia a una DO 260 para determinar su concentración. Se cargó 1 µg del ADN genómico total en gel de agarosa para PFGE (electroforesis en gel de pulso de campo) 1 % y se realizó la electroforesis a 14 °C durante 22 horas en un sistema de PFGE CHEF DR II de BIORAD en las condiciones de cambio de tiempo de rampa de 50-90 segundos, 6 V/cm (200V). Se utilizó como un marcador de tamaño de ADN la escalera lambda de patrón de tamaño de ADN, CHEF DNA Size Standard Lambda Ladder (Bio-Rad) (FIG. 4). La FIG. 4 es el resultado de la PFGE del bacteriófago ΦCJ11 aislado. Como se muestra en la FIG. 4, no se observó ADN de aproximadamente 140 kpb presente entre 48,5 a 1.000 kpb.

**Ejemplo 6: Análisis genético de ΦCJ11**

25 Para el análisis genético del ΦCJ11 purificado, se hizo una digestión doble de 5 µg de ADN genómico de ΦCJ11 con las enzimas de restricción *Pst*I, *Xba*I y *Bam*HI, *Eco*RI y *Sal*I. El vector pCL1920 (Promega) fue digerido con las enzimas de restricción *Pst*I, *Xba*I y *Bam*HI, *Eco*RI y *Sal*I y después se trató con CIP (fosfatasa alcalina de intestino de ternera). El ADN genómico digerido se mezcló en una proporción de 3:1 con el vector y se ligó a 16 °C durante 2 horas. El vector recombinante resultante se transformó en *E. coli* DH5a y se sembró después en una placa LB que contiene especinomicina y X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-D-galactopiranosido) para la selección de colonias azules/blancas. Las colonias seleccionadas se cultivaron durante 16 horas en un medio de cultivo que contiene el antibiótico con agitación. A continuación, los plásmidos se extrajeron usando un kit de purificación de plásmido (Promega).

35 La clonación de los plásmidos fue confirmada por PCR utilizando conjuntos de cebadores de FTR135 y FTR136 (SEQ ID NOs. 13 y 14) y la selección se hizo solo de los fragmentos de inserto que tienen un tamaño de 1 kb o más. Sus secuencias de nucleótidos fueron analizadas utilizando los conjuntos de cebadores. Las secuencias de nucleótidos así obtenidas se dan en las SEQ ID NOs. 1 a 4, respectivamente, teniendo cada una un tamaño de 1-2 kpb o menos y se analizaron para determinar la similitud de secuencia con la ayuda del programa NCBI blastx y blastn y los resultados se resumen en la siguiente Tabla 2.

Tabla 2

[Tabla 2]

Comparación de la similitud de secuencia entre ΦCJ11 y otros bacteriófagos						
	Organismo	Proteína	Blastx			
			Consulta	Sujeto	Identidad	Valor e
1	Fago de enterobacterias T5	proteína hipotética	436-627	1-64	63/64(98 %)	7e-32
	Fago de enterobacterias SPC35	proteína hipotética	10-423	1-139	127/139(91 %)	3e-31
	Fago de enterobacterias SPC35	proteína hipotética	3-863	30-315	264/291(91 %)	2e-116
	Fago de enterobacterias T5	proteína hipotética	3-863	30-315	255/291(88 %)	1e-113
	Fago de enterobacterias EPS7	proteína hipotética	3-761	29-281	235/253(93 %)	7e-107
	Fago de Klebsiella KP15	proteína hipotética	9-761	22-276	217/255(85 %)	4e-100

(continuación)

Comparación de la similitud de secuencia entre ΦCJ11 y otros bacteriófagos						
	Organismo	Proteína	Blastx			
			Consulta	Sujeto	Identidad	Valor e
	Fago de enterobacterias RB43	proteína que contiene el dominio putativo SPFH	9-839	18-257	223/2 81 (79 %)	7e-99
	Fago de enterobacterias RB16	proteína hipotética	9-761	18-272	219/2 55(86 %)	2e-98
2	Fago de enterobacterias EPS7	proteína hipotética	412-771	1-120	109/1 20(91 %)	7e-57
	Fago de enterobacterias T5	proteína hipotética	490-771	1-94	94/94( 100 % )	3e-46
	Fago de enterobacterias T5	proteína D11	532-2	1-177	175/1 77(99 %)	5e-96
	Fago de enterobacterias SPC35	proteína D11	532-2	1-177	174/1 77(98 %)	2e-95
	Fago de enterobacterias EPS7	proteína D11	532-8	1-175	163/1 75(93 %)	4e-90
	Fago de enterobacterias EPS7	proteína hipotética	872-528	5-120	96/11 6(83 %)	2e-46
3	Fago de enterobacterias SPC35	proteína de la cola Pb4	777-4	1-258	221/2 58(86 %)	4e-128
	Fago de enterobacterias T5	proteína de la cola Pb4	777-4	1-258	197/2 58(76 %)	6e-115
	Fago de enterobacterias SPC35	proteína de la cola Pb3	1322-780	769-949	178/1 81(98 %)	2e-96
	Fago de enterobacterias EPS7	proteína de la cola Pb3	1322-780	769-949	160/1 81(88 %)	9e-88
	Fago de enterobacterias T5	proteína estructural de la cola Pb3	1322-780	769-949	156/1 81(86 %)	8e-84
	Fago de enterobacterias EPS7	proteína de la cola Pb4	423-4	1-140	112/1 40(80 %)	2e-62
4	Fago de enterobacterias SPC35	endonucleasa flap	980-564	153-291	138/1 39(99 %)	1e-73
	Fago de enterobacterias T5	endonucleasa flap	980-564	153-291	138/1 39(99 %)	1e-73
	Fago de enterobacterias EPS7	endonucleasa flap	980-564	153-291	135/1 39(97 %)	4e-72
	Fago de enterobacterias SPC35	desoxiUTP pirofosfatasa putativa	564-157	1-136	130/1 36(96 %)	3e-70
	Fago de enterobacterias T5	desoxiUTP pirofosfatasa putativa	564-160	1-135	130/1 35(96 %)	2e-69
	Fago de enterobacterias EPS7	desoxiUTP pirofosfatasa putativa	564-157	1-136	128/1 36(94 %)	2e-67

**Ejemplo 7: Diseño de las secuencias del cebador específico de ΦCJ11**

5 Con el fin de identificar ΦCJ11, se diseñaron cebadores específicos de ΦCJ11 sobre la base de las SEQ ID NOS. 1-4. Se realizó una PCR usando cada conjunto de cebadores de las SEQ ID NOS. 5 y 6, SEQ ID NOs. 7 y 8, SEQ ID NOs. 9 y 10 y SEQ ID NOs. 11 y 12. Se añadió 0,1 µg de ADN genómico del bacteriófago y 0,5 pmol de cada cebador a una pre-mezcla (Bioneer) y el volumen final se ajustó a 20 µl. La PCR se realizó con 30 ciclos de desnaturalización; 94 °C 30 segundos, hibridación; 55 °C 30 segundos y polimerización; 72 °C, 1,5 minutos (FIG. 5). La FIG. 5 es el resultado de la PCR, realizada usando cada conjunto de cebadores para el ADN genómico de

5 ΦCJ11. A; un conjunto de cebadores de SEQ ID NOs. 5 y 6, B; un conjunto de cebadores de SEQ ID NOs. 7 y 8, C; un conjunto de cebadores de SEQ ID NOs. 9 y 10 y D; un conjunto de cebadores de SEQ ID NOs. 11 y 12. Todos los carriles A, B, C y D tenían productos de PCR de aproximadamente 1 a 2 kpb. Como se muestra en la FIG. 5, los productos de PCR obtenidos de este modo tenían un tamaño de aproximadamente 1 kpb o más de 2 kpb o menos, con los conjuntos de cebadores de SEQ ID NOs. 5 y 6, SEQ ID NOs. 7 y 8, SEQ ID NOs. 9 y 10 y SEQ ID NOs. 11 y 12.

**Ejemplo 8: Estabilidad del bacteriófago frente al pH**

10 Con el fin de determinar si ΦCJ11 sobrevive de manera estable en un entorno de pH bajo en el estómago del cerdo, el ΦCJ11 se ensayó para determinar su estabilidad en una amplia gama de pH (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 pH (tampón de acetato de sodio (pH 2,1, 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 de sodio (pH 6,9 y pH 7,4) y Tris-HCl (pH 8,2, pH 9,0, pH 9,8 y pH 11,0)) a una concentración de 0,2 M. Se mezcló 180 µl de cada solución de pH con 20 µl de una solución de bacteriófago (1,0 × 10<sup>11</sup> UFP/ml) para dar cada solución de pH una concentración de 1 M, seguido de incubación a temperatura ambiente durante 2 horas. La solución de reacción se diluyó en serie y 10 µl de cada dilución se cultivó a 37 °C durante 18 horas por un procedimiento de superposiciones de agar blando para determinar los títulos de los lisados de fagos (FIG. 6). La FIG. 6 es el resultado del ensayo de resistencia a los ácidos en el bacteriófago ΦCJ11, que muestra el número de bacteriófagos supervivientes 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 ΦCJ11 no perdió su actividad hasta un pH de 5,5. Sin embargo, el bacteriófago ΦCJ11 mostró actividad reducida a pH 4 y pH 3,5 y perdió por completo su actividad a pH 3,0 o inferior, en comparación con un control. Como se muestra en la FIG. 6, el bacteriófago no perdió su actividad y se mantuvo estable por debajo de pH 5,5, mientras que perdió su actividad a pH 3,0 o inferior.

**Ejemplo 9: Estabilidad del bacteriófago frente al calor**

25 Para su uso como aditivo alimentario, el bacteriófago se ensayó para determinar su estabilidad al calor generado durante un procedimiento de formulación. A este respecto, se incubó 200 µl de una solución de ΦCJ11 con un título de 1,0 × 10<sup>11</sup> UFP/ml a 37 °C, 45 °C, 53 °C, 60 °C y 70 °C durante 0 minutos, 10 minutos, 30 minutos, 60 minutos y 120 minutos. La solución se diluyó en serie y 10 µl de cada dilución se cultivó a 37 °C durante 18 horas por un procedimiento de superposiciones en agar blando para determinar los títulos de los lisados de fagos (FIG. 7). La FIG. 7 es el resultado del ensayo de resistencia al calor en el bacteriófago ΦCJ11, que muestra el número de bacteriófagos supervivientes a 37 °C, 45 °C, 53 °C, 60 °C y 70 °C durante 0, 10, 30, 60 y 120 minutos. Como se muestra en la FIG. 7, el bacteriófago ΦCJ11 mantuvo su actividad a pesar de su exposición a 60 °C hasta 2 horas.

**Ejemplo 10: Tolerancia a la desecación del bacteriófago**

35 Para su uso como aditivo alimentario, el bacteriófago ΦCJ11 se ensayó para determinar la tolerancia a las condiciones de sequedad establecidas para un procedimiento de formulación. Tomando como base los resultados obtenidos en el ensayo de estabilidad frente al calor, se llevó a cabo un ensayo de desecación utilizando un concentrador SpeedVac. Se secó 200 µl de una solución de ΦCJ11 que tiene un título de 1,0 × 10<sup>11</sup> de UPF/ml a vacío a 60 °C durante 2 horas y el sedimento obtenido se resuspendió completamente en 200 µl de la solución SM a 4 °C durante un día y se midió para determinar los valores del título (FIG. 8). La FIG. 8 es el resultado del ensayo de tolerancia a la desecación en el bacteriófago ΦCJ11 desecado con la ayuda de un concentrador SpeedVac. Como se muestra en la FIG. 8, cuando se midieron los cambios de título en las condiciones de sequedad en comparación con los títulos pre-secado, la actividad se mantuvo a 60 °C hasta 1 hora.

**Ejemplo 11: Espectro de infección del bacteriófago**

45 Se ensayó la actividad lítica de ΦCJ11 frente al tipo silvestre (2 cepas), *Salmonella choleraesuis* (5 cepas), *Salmonella typhimurium* (17 cepas), *Salmonella infantis* (4 cepas), *Salmonella newport* (6 cepas), *Salmonella derby* (2 cepas) y *Salmonella dublin* (3 cepas), obtenidas del Laboratorio de enfermedades aviares, de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Nacional de Seúl, además de SC (ATCC SC10708) utilizada en el experimento. Se mezcló 150 µl de medio de cultivo en agitación (DO<sub>600</sub> = 2) de cada cepa y 10 µl de solución de ΦCJ11 con un título de 10<sup>10</sup> UFP/ml se cultivó a 37 °C durante 18 horas utilizando un procedimiento de superposiciones de agar blando para controlar la formación de placas (Tabla 3). Se observó la formación de placas del fago en 8 cepas de SC.

Tabla 3

50

[Tabla 3]

Cepas de tipo silvestre SC, ST, SD, SI, SN infectadas por ΦCJ11							
Serotipo	Nombre de la cepa		Formación de placas de fagos	Serotipo	Nombre de la cepa		Formación de placas de fagos
<b>SC</b>	<i>S. choleraesuis</i>	ATCC 2929	○	<b>SI</b>	<i>S. infantis</i>	SARB 26	○
	<i>S. choleraesuis</i>	ATCC 2930	○		<i>S. infants</i>	SARB 27	○

(continuación)

Cepas de tipo silvestre SC, ST, SD, SI, SN infectadas por ΦCJ11							
Serotipo	Nombre de la cepa		Formación de placas de fagos	Serotipo	Nombre de la cepa		Formación de placas de fagos
	<i>S. choleraesuis</i>	ATCC 2932	○	<b>SN</b>	<i>S. infantis</i>	S1326/28	○
	<i>S. choleraesuis</i>	ATCC 2933	○		<i>S. infantis</i>	B09-106	○
	<i>S. choleraesuis</i>	ATCC 2425	○		<i>S. newport</i>	SARB 36	○
	<i>S. choleraesuis</i>	ATCC 10708	○		<i>S. newport</i>	SARB 37	○
	<i>S. choleraesuis</i>	SNU#1	○		<i>S. newport</i>	SARB 38	○
	<i>S. choleraesuis</i>	SNU#2	○		<i>S. newport</i>	7257	○
<b>ST</b>	<i>S. typhimurium</i>	SNU ST1	○	<b>SD</b>	<i>S. newport</i>	SL 317	○
	<i>S. typhimurium</i>	SNU ST2	○		<i>S. newport</i>	SL 254	○
	<i>S. typhimurium</i>	SNU ST4	○	<b>SD</b>	<i>S. derby</i>	ATCC 2466	○
	<i>S. typhimurium</i>	SNU ST7	○		<i>S. derby</i>	ATCC 2468	○
	<i>S. typhimurium</i>	SNU ST8	○	<b>SD</b>	<i>S. dublin</i>	SA 4405	○
	<i>S. typhimurium</i>	SNU ST11	○		<i>S. dublin</i>	RKS 4699	○
	<i>S. typhimurium</i>	SNU ST12	○		<i>S. dublin</i>	88/6	○
	<i>S. typhimurium</i>	SNU ST13	○	<b>SA</b>	<i>S. arizonae</i>	ATCC 12398	○
	<i>S. typhimurium</i>	SNU ST14	○	<b>SB</b>	<i>S. hongori</i>	ATCC 12397	○
	<i>S. typhimurium</i>	SNU STJ7	○	<b>SH</b>	<i>S. heidelberg</i>	SARA 33	○
	<i>S. typhimurium</i>	SNU ST18	○		<i>S. heidelberg</i>	SARA 23	○
	<i>S. typhimurium</i>	SNU ST 19	○	<b>SM</b>	<i>S. maimi</i>	SARB 28	n
	<i>S. typhimurium</i>	SNU ST20	○		<i>S. maimi</i>	SARB 29	○
	<i>S. typhimurium</i>	SNU ST26	○	<b>SP</b>	<i>S. panama</i>	SARB 39	○
	<i>S. typhimurium</i>	SNU ST38	○		<i>S. panama</i>	SARB 40	○
	<i>S. typhimurium</i>	SNU ST41	○		<i>S. panama</i>	SARB 41	○
<i>S. typhimurium</i>	SNU ST42	○	<i>S. panama</i>		7261	○	

\* SGSC: Centro de stocks genéticos de Salmonella  
\* ATCC: Colección Americana de Cultivos Tipo  
\* SNU: Laboratorio de enfermedades aviarias, Facultad de Veterinaria, Universidad Nacional de Seúl

**Ejemplo 12: Ensayo de toxicidad del bacteriófago**

5 Se realizaron pruebas de irritación cutánea y ocular en conejos New Zealand White libres de patógenos específicos (SPF) que son frecuentemente utilizados en el ensayo de toxicidad del bacteriófago ΦCJ11 para la prevención de la salmonelosis y la intoxicación alimentaria por *Salmonella* y de los cuales existen datos experimentales acumulados que permiten un análisis sencillo de los resultados experimentales. La piel normal abdominal (piel no lesionada) y la

10 piel abdominal lesionada de conejos heridos se cubrieron y se pusieron en contacto con 2,5 cm x 2,5 cm de gasa aplicada con la sustancia de ensayo, aplicándose 0,5 ml/sitio. No se observaron cambios en los síntomas generales y se observó una ligera pérdida de peso 1 día después de la aplicación de la sustancia de ensayo, lo cual probablemente se puede atribuir al estrés debido a la aplicación oclusiva de la sustancia de ensayo. En el ensayo de irritación cutánea, el índice de irritación primaria (PII) fue de 0,33, lo que indica que no es irritante. Para el ensayo de irritación ocular, se aplicó la sustancia de ensayo al ojo izquierdo de un conejo y después se comparó con el ojo derecho, al que no se aplicó la sustancia de ensayo. Durante el período experimental, no se observaron síntomas

15 generales ni cambios anormales en el peso corporal en relación con la aplicación de la sustancia de ensayo. Después de la aplicación de la sustancia de ensayo, el examen ocular mostró que el índice de irritación ocular aguda (IAOI) era "0", lo que indica que no es irritante. Por lo tanto, estos resultados indican que el nuevo bacteriófago

ΦCJ11 no tiene toxicidad.

Además, el ensayo de toxicidad se llevó a cabo mediante la administración oral única de ratas Sprague-Dawley con ΦCJ11. Un grupo al que se administró la sustancia de ensayo fue tratado con  $1 \times 10^{11}$  UFP/kg de ΦCJ11 y un grupo de control tratado con excipiente fue tratado con un vehículo [Tris-HCl 20 mM (pH 7,0) + MgCl<sub>2</sub> 2 mM] como un excipiente y a 10 ratas de cada grupo (5 hembras y 5 machos) se administró por vía oral una sola dosis. La mortalidad, los síntomas generales, los cambios en el peso corporal y los hallazgos de la autopsia fueron controlados durante 2 semanas y se compararon entre sí. El control se llevó a cabo cada 6 horas, a partir de los 30 minutos hasta 1 hora después de la administración en el día de la administración. A continuación, los síntomas generales fueron controlados una vez al día durante 14 días y se registraron los mismos (Tablas 4 y 5).

10 Tabla 4

[Tabla 4]

Mortalidad y síntomas generales tras la administración oral de ΦCJ11																
Sexo	Hecho (UFP)	Día después del tratamiento														Mortalidad
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
Machos	Control	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	10 <sup>11</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Hembras	Control	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	10 <sup>11</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

Tabla 5

[Tabla 5]

Hallazgos de la autopsia tras la administración oral de ΦCJ11			
Sexo	Fin (UFP)	Hallazgo macroscópico	Frecuencia <sup>A</sup>
Machos	Control	Ningún hallazgo macroscópico	5/5
	10 <sup>11</sup>	Ningún hallazgo macroscópico	5/5
Hembras	Control	Ningún hallazgo macroscópico	5/5
	10 <sup>11</sup>	Ningún hallazgo macroscópico	5/5

<sup>A</sup> Número de animales con el signo/número de animales examinados.

15 Como se muestra en las Tablas 4 y 5, ninguno de ellos murió y ΦCJ11 no provocó síntomas tóxicos ni síntomas clínicos notables. Los resultados se resumen en las Tablas 4 y 5. Los pesos corporales se registraron antes de la administración y 1, 3, 7, 10 y 14 días después de la administración. No se observaron cambios significativos en el peso corporal en comparación con el grupo control.

20 Por otro lado, los resultados de los cambios en el peso corporal indican que ΦCJ11 no causa una reacción tóxica suficiente para reducir el apetito o para cambiar el peso corporal. Estos resultados se muestran en la FIG. 9. La FIG. 9 es el resultado de los cambios en el peso corporal debido a la toxicidad después de la administración oral única de ratas Sprague-Dawley con ΦCJ11. Como se muestra en la FIG. 9, la observación de cambios en el peso corporal antes de la administración y 1, 3, 7, 10 y 14 días después de la administración con ΦCJ11 mostró que no hay cambios significativos en el peso corporal en comparación con el grupo control (■; machos control, □; machos ΦCJ11, ●; hembras control, ○; hembras ΦCJ11).

25 Por lo tanto, se encontró que el ADL del nuevo bacteriófago ΦCR11 era superior a  $1 \times 10^{11}$  UFP/kg en ratas de ambos sexos, y por lo tanto, no es tóxico.



5

TRATADO DE BUDAPEST SOBRE EL RECONOCIMIENTO INTERNACIONAL DEL DEPÓSITO DE MICROORGANISMOS A LOS FINES DEL PROCEDIMIENTO EN MATERIA DE PATENTES  
FORMULARIO INTERNACIONAL

Para

**CJ CheilJedang Corporation**  
**500 5-GA NAMDAEMUN-RO,**  
**CHUNG-KU, SEOUL**  
**REPUBLIC OF KOREA.**

RECEPCIÓN EN EL CASO DE UN DEPÓSITO ORIGINAL emitido según la Regla 7.1 de la AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL identificada en la parte inferior de esta página

I. IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO		
Referencia identificativa dada por el DEPOSITANTE: Bacteriófago Φ-CJ11	Número de registro dado por la AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL: KCCM11208P	
II. DESCRIPCIÓN CIENTÍFICA Y/O DESIGNACIÓN TAXONÓMICA PROPUESTA		
El microorganismo identificado en I anteriormente se acompañó por: <input type="checkbox"/> una descripción científica <input type="checkbox"/> una designación taxonómica propuesta (Marcar con una cruz lo aplicable)		
III. RECEPCIÓN Y ACEPTACIÓN		
Esta Autoridad Depositaria Internacional acepta el microorganismo identificado en I anteriormente, que recibió el 9 de septiembre de 2011 (fecha del depósito original) <sup>1</sup>		
IV. AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL		
Nombre: Dirección:	Korean Culture Center of Microorganisms  <b>361-221, Yurim B/D</b> <b>Hongje-1-dong</b> <b>Sondaemun-gu</b> <b>SEOUL 120-091</b> <b>Republic of Korea</b>	Firma(s) de la(s) persona(s) que tiene(n) poder para representar a la Autoridad Depositaria Internacional u oficial(es) autorizado(s):  Fecha: 9 de septiembre de 2011

10 Cuando se aplica la regla 6.4 (d), tal fecha es la fecha en la que se adquirió el estado de autoridad depositaria internacional; cuando un depósito hecho fuera del Tratado de Budapest después de la adquisición del estado de autoridad depositaria internacional se convierte en un depósito según el Tratado de Budapest, dicha fecha es la fecha en la que el microorganismo se recibió en la autoridad depositaria internacional.  
Formulario BP/4 Página única

15 <110> CJ CheilJedang Corporation

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

<130> OPA12111PCT

20

<150> 10-2011-0094648

<151> 20-09-2011

ES 2 612 916 T3

<160> 14

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 1643

<212> ADN

<213> bacteriófago CJ11

<400> 1

```

taaactgccg gcttaatatt aaggggagga gccattatg agtaaataatg gttttgtaaa      60
taacggactt aatcaaagta tgggctccca gcagcccatg cggggtctgg ataacccta      120
cttacaacag ttgcaacagc gtttagcaga agcgcaacag atgcagcaac aactccagca      180
aaatcctgga agtggttagtc ctatgcaaat gatgcagcaa atgaatgggc agtcgcaaat      240
gccccaaaca atgcagcaac agatgccgca gcagcaagtt cagcaacaaa cccaacaacc      300
gcaggtttct gcggaaggac aggcagtact agcccttttc gaagacttctg caaagacaga      360
ggatgggaag cagcttgtat cacttatggg taagttaaat agcttctgcc aaagccaagt      420
tgcaaaagct caaaatggtg gtaataactc ctaaggagga attatgtgtt gcagaaaatc      480
tgtttcgtgc tgccaatgc ctgtagcacg ttgttctctc tcagcaatgt ttacacaaat      540
accggcgttc aatccgtttg cctttaagcc tactcttata ctgcccccta gagtagattt      600
tcagtcaagg ttggcctccc gtatgggtgg ttgctgtaat aagagtatat ggttctaag      660
aaccaaacia taaagcccct agtcgaaaga cttaggggct tttcttttat cttaaataca      720
gaaaagccct gcgctctcca gggaacgcag ggcttacttc agatgttacg tgcggatatt      780
atattattacg catatccatg atcatttggc catcatagcc agtgccaacc acagtctgcg      840
gtacaccacc tttggatatt ctgagcacga atcatttcaa ctttccagtt gcttccagcg      900
aatcatctca ggagtaatgg tacgttgcaa tgcggcgta gcttcagctt ctttcttagc      960
tgcgtacagt ttggcatctg cgtcacgttc gttagcaata gcttggttat tacgagcttc     1020
ggatctgct tctgcttgtt taacctctg ctgtgcttct tgttcaacac gagccagttc     1080
agetttcgca gcattaacct gttcttcacg aactttggta ttctgtacct gttccatgat     1140
taccggtggc aaagtaatat cctgaagaaa tacctgtta actgtgtaac catatgggcg     1200
tgcatactct tcaacttctt gttgaattgc agtttgcaat tgagcctgaa ttttagcatc     1260
aaacaaatct tgtgcttttag gtacagactt accaaactca cgaatagtag acagtaattt     1320
ttcagttaca tatttgtcta acgcttgatc ctgagtaact gcattaatac ggttaatcgg     1380
tgccttagaa ccatcaaact gcaacataac agtcagggtca acagtggtatt taaactatc     1440
ctgactagga acctgaagtt tatctaattt tagagcaata tcttttagtac taaaagtatc     1500
gaaagaagca aaaggattta caatatgaaa gccgggtaat actgggctag ggtcaacttt     1560
accagggaaa gtctgggttt taacagtacc gtcttgaaca acagtatagg agttaagggc     1620
cagaactaaa cctaccaaac caa                                     1643

```

<210> 2

ES 2 612 916 T3

<211> 1464  
 <212> ADN  
 <213> bacteriófago CJ11

5 <400> 2

taggtataca ctgggatact aactcttcta aatggaaggt agaaataact aactgtatag 60  
 gtgttaaaat atatggtggg ttattccctt atgaagaatt agagttagct ataaataaag 120  
 ctaacgaact tagagcacag catctaggta tggattccag gcaagaacta ttcaaaggat 180  
 atatttgccg acgtgaggac ttagataagt aaaattgcat ttggcaatag ctcataaatg 240  
 atgtataata tatacataaa tttgagagag aaagtttcgg attgataaga aagtccgaag 300  
 cagaaaaata aaaatttttag ttgctaaatt ctctcgaaat ctagtataat atatacataa 360  
 attcgaggag aaaacaaaaa ttaaattctt cgattatgaa aagctatact tactagctag 420  
 aggaaattcc gacctaat ttaagttatt caaaagaatg cttacagagc ctgatgctca 480  
 ccaattattg gtcggttcct cattcatttt gaatgaatca acaatagttg ataatccaaa 540  
 taaattgtct aatagacaac tggcagaata tctaggaatt ttaagtctac gaaattatgc 600  
 cgaatacaag tttacaaacg atcctagttt ggacatacaa tatgttccag tatggatacc 660  
 acgttttagta atcgacacta acccactaat cgcaattaac aaatcgaaat taatctttaa 720  
 agaggaaata aaatatggct aagtcttggg gcgaaactac tggcggttct aacgataaaa 780  
 tgaattcct gaagttcaac aacggatca ctctgttctg tatcgtttct ggtgttcttc 840  
 cacgttatgt ctattggctg actaataaag agggtagcgt agctcctttc gaatgtctcc 900  
 gttttaaccg tgacaaagag agctttgttc gtggtaaagc tgatccggtt catgagatgg 960  
 gcttcttcga gaaagaactg gataaagatg gtaatcgtgt tccgctgaaa ccgaagaaaa 1020  
 actatatcgc ttttgttctc gaccgttctg ataacaaact gaaagtaatg gaagtcaagg 1080  
 ctactattct gaaaggcatc cagtctatca tgaagcagtt gagtctggca actccgtttg 1140  
 atattgatat ttctatcgag aaaaaaggta aaggtttctg tactgagtat gatgtacagc 1200  
 agattgctgc tatgcagttc cagattaagc tgcaagatcc taacagtgca gagtctaagc 1260  
 aatatgctgc aggcattgcaa gcttggcgta atcatgggtca tagctgtttc ctgtgtgaaa 1320  
 ttgttatccg ctcaacaattc cacacaacat acgagccgga agcataaagt gtaaagcctg 1380  
 ggggtgcctaa tgagtgagct aactcacatt aattgcggtg cgctcactgc ccgctttcca 1440  
 gtcgggaaac ctgtcgtgcc agct 1464

10 <210> 3  
 <211> 1324  
 <212> ADN  
 <213> bacteriófago CJ11

15 <400> 3

ES 2 612 916 T3

tactgaatct atataagaaa caacaaattc gcgaacgtta gcgccagctc ctctatcca	60
ttcccattgt acacggagat catatctttc tttaccatca gcaatccttg cagctttgaa	120
agtaatgttg ttaggagcag taggaggtac aaagttatac tctacagtaa gaactttgga	180
aaattcaaag tatccagaag agtctacagt tacaccatct ggcatggtaa cttgcccaga	240
tatgcgact ttgtaatccc caacaggaac accaccaaat ctaatagtgg gagatagtgg	300
acctatataa tactttacc acgggctatt tgaaggttga gtacttttta actcaatagt	360
acaataacta gcttctcctg tagtctctat aactactata ggggcaccta caccacatc	420
tactggatca gcctctgac tagcggcagt aatagtaggt tttctcttag tactaaaggt	480
agttttattg gataagttta tgccaatfff agcctctaag agctcagagt ctataataga	540
gtcatagaaa gcccctttaa cctcataaga agttgaagg gttagattat taatcattac	600
aaagaaagta tctataccgg tatagtcacg tctatcaata ctttctccta actttaacca	660
aaaggatcta ccaataacgt cataatcagt atatatagag tgctggacat atgccattgt	720
atatccagtc attatactat ttaagaccat tttggctggg gcattattcg aaatcattaa	780
atggatgccc actccacaga ctggtcccca tcatctcctt ctgctctaag acgaaaatat	840
agttttctat tgatccctag agcatcactg ttatggagag caaaatctgc cttattatac	900
attaataaat agtcataagt atactgattt tcaatacgt cacttcttag cattctattc	960
tgggaatcat agatctccag agtatagaat atactttcta ttatatcttc ttctggatc	1020
ctatcccaag ctagttttac gtctgggccc acaaactcag ttacatctcc agaagccgta	1080
ttagttaccc taaaattaga tactacgctt aggttttttag cagagttaag ttctatagat	1140
aatgttactg gagaacttct tctaccgttt atatccacag ccttatttc aaatattgct	1200
aaacctgcag gttctccaac tatctcttgg atcatgcgtt cattgggatt tgtttctagt	1260
tgctgcacaa tatacggctc agcatggcct gaatgtacga tagaatagta aactacgtta	1320
ttag	1324

- 5
- <210> 4
  - <211> 1666
  - <212> ADN
  - <213> bacteriófago CJ11
  - <400> 4

ES 2 612 916 T3

cagaaaataa cattaccttc tttatctggt tttagtacaa ccgtttctgg tttagtagtt 60  
 ttaatctgat aagttgatgt actagtatca atacctacca tattaggatc ggtaaaatta 120  
 ttgcttcct gaacttccaa atccgccttc cccacgatct gtctccccta gttcgtcaac 180  
 gatttcaaaa ttatgagttg agtagtgtgg tactactact agctgacaaa gtctttcaaa 240  
 attttcaga gtttgaattt cagaaccata gttataaagg ttcattctta tagttccacg 300  
 atagtctgag tcaatcactc ctgcggtggt tgcaatcadc agatgacgct tacctaagga 360  
 gctaogagga actaccaaac cgaaccaacc tcgcggaatt totaccgoga caccgggtgc 420  
 aatcattaag gatttgctg gtgcaatagc acgtaaactc gcagcagggg tagtaccaaa 480  
 gaacgctcgc agatccatac ctgcggcadc ttcggaacca atcttaggcg tacaatctgg 540  
 atgagttaat ttaattttaa tcattgttct gcaatctcca aaatatcttt tgtaaattta 600  
 tctaatacat cttgacctac agcagcaata gcatccacac agtaggtagg taaatcaacc 660  
 agaattaggt ttcgataaag caattcttcc gaagcattta aattctgtat atattctgtt 720  
 tttccaggca gtggaagctg atcaataata tccagaacgt taccaaattc acgaataata 780  
 ttatacccac gctttgcccc aataccctca acacctcgga tattatcccc taaatcacc 840  
 ataattgctt tcagggagat aaactgctct acatcgtcaa cattatgatg ctcatacata 900  
 tcacgaagat gatattcacg acgtgttggt aaagagaagc gagatacttt atcagttaat 960  
 aaagtatccc agtcaccatc ggtagaaatt agccaaacat gatcatatag atgcccaatc 1020  
 agcttaacaa tataagctgc catatcatct gcttctaccc cacgaatagt gaaagttggg 1080  
 aatgtagttt cacataattc gaaagcatct ttcaagtact cgaagaattg ttcattctaat 1140  
 gctttctcct cttccgtacg ctgogagtat ttctcatctc gattcccttt atactcaggg 1200  
 agatgctcta ggcggaatgc agactccct ttatctccta aaactattgt agttctagca 1260  
 gagtaagatt ttgcaagaga ctgaatagtg gaaacataac ttgaggcaaa tggtttttta 1320  
 ctattgttat gcttgaagcg aaagcctaag ttagttccat cgacaatcat taggttacga 1380  
 cgggaagcca tttcggett cctctcctca ataaattttc cccaggattt actcattatt 1440  
 taattaagtc ctcaacagat gcatgatgta gccacggctc aaataaacca attacgattt 1500  
 ccatgtcttt cttatttaac accatatggg tacgactcat taagttgtca accatcgggt 1560  
 ctgagctatc caaagctatt aaccactgtc ctctgtcttt tttgaatatt aatgcaggtt 1620  
 tggagttcat ctgctcacct tcacgtgagc actgctgcca ccactt 1666

5 <210> 5  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Cebador

<400>5  
 cccattatga tgaaataggg 20

15 <210> 6  
 <211> 19  
 <212> ADN

# ES 2 612 916 T3

	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador	
5		
	<400> 6	
	ctatactggt gtccaagac	19
10	<210>7	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
15	<220>	
	<223> Cebador	
	<400> 7	
	gatactaact ctctaagt	20
20	<210> 8	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
25	<220>	
	<223> Cebador	
	<400> 8	
	cttagactct gaactgtag	20
30	<210> 9	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
35	<220>	
	<223> Cebador	
	<400> 9	
	ctgaatctat ataagaaaca ac	22
40	<210> 10	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
45	<220>	
	<223> Cebador	
	<400> 10	
	cgaagttac tattctatcg	20
50	<210> 11	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
55	<220>	
	<223> Cebador	
	<400> 11	
	gttttagta caaccgttc	20
60	<210> 12	
	<211> 19	
	<212> ADN	
65		

# ES 2 612 916 T3

<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Cebador

5

<400> 12  
cagatgaact ccaaacctg 19

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

10

<220>  
<223> Cebador

15

<400> 13  
cgggcctctt cgctattacg 20

20

<210> 14  
<211> 22  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

25

<220>  
<223> Cebador

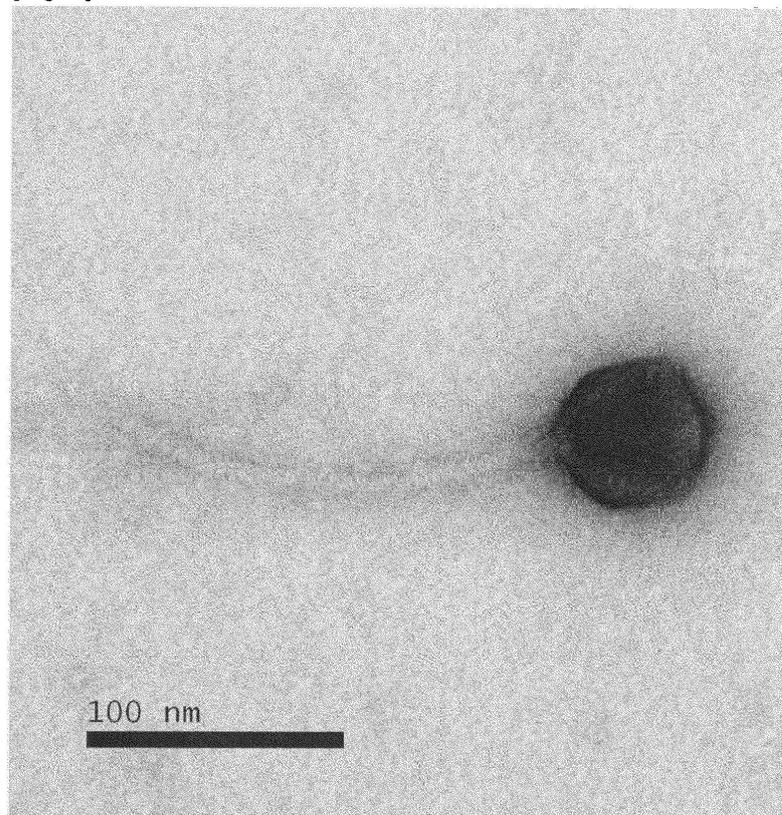
<400> 14  
aggctaccg gtctactgt cg 22

30

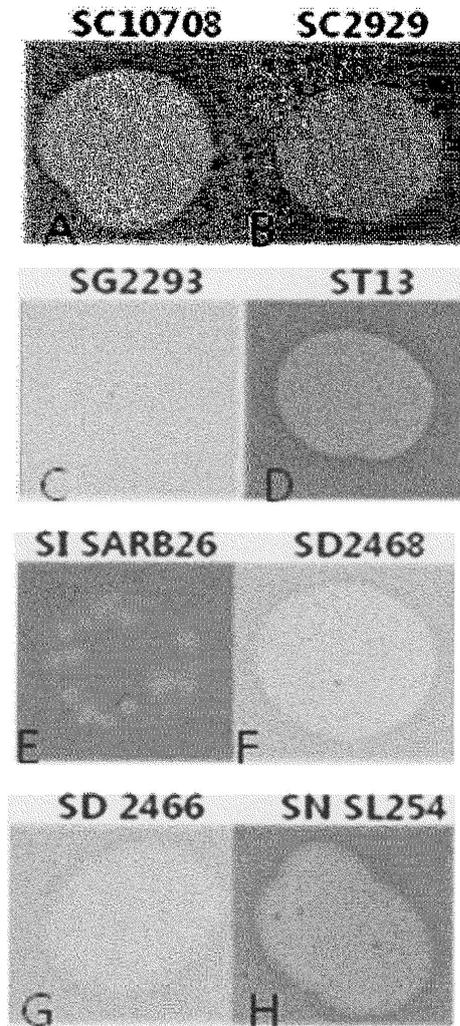
**REIVINDICACIONES**

1. Un bacteriófago aislado que tiene una actividad bactericida específica contra *Salmonella choleraesuis*, el cual se identifica por el número de registro KCCM11208P.
- 5 2. Una composición para su uso en la prevención o tratamiento de enfermedades infecciosas causadas por bacterias *Salmonella* seleccionadas del grupo que consiste en *Salmonella choleraesuis*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella derby*, *Salmonella infantis*, *Salmonella newport* y combinaciones de las mismas, que comprende el bacteriófago de la reivindicación 1 como un principio activo.
- 10 3. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en la que la enfermedad infecciosa causada por *Salmonella choleraesuis* o *Salmonella typhimurium* es la salmonelosis o intoxicación alimentaria por *Salmonella* y la enfermedad infecciosa causada por *Salmonella derby*, *Salmonella infantis* y *Salmonella newport* es la intoxicación alimentaria por *Salmonella* de tipo infección bacteriana.
4. Una composición para su uso como un antibiótico, que comprende el bacteriófago de la reivindicación 1 como un principio activo.
- 15 5. Un pienso o agua potable para animales , que comprende el bacteriófago de la reivindicación 1 como un principio activo.
6. Un desinfectante o limpiador, que comprende el bacteriófago de la reivindicación 1 como un principio activo.
- 20 7. El bacteriófago de la reivindicación 1, o la composición de la reivindicación 2 para su uso en un procedimiento para prevenir o tratar enfermedades infecciosas causadas por una o más bacterias *Salmonella* seleccionadas del grupo que consiste en *Salmonella choleraesuis*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella derby*, *Salmonella infantis*, *Salmonella newport* y combinaciones de las mismas en los animales que lo necesitan.

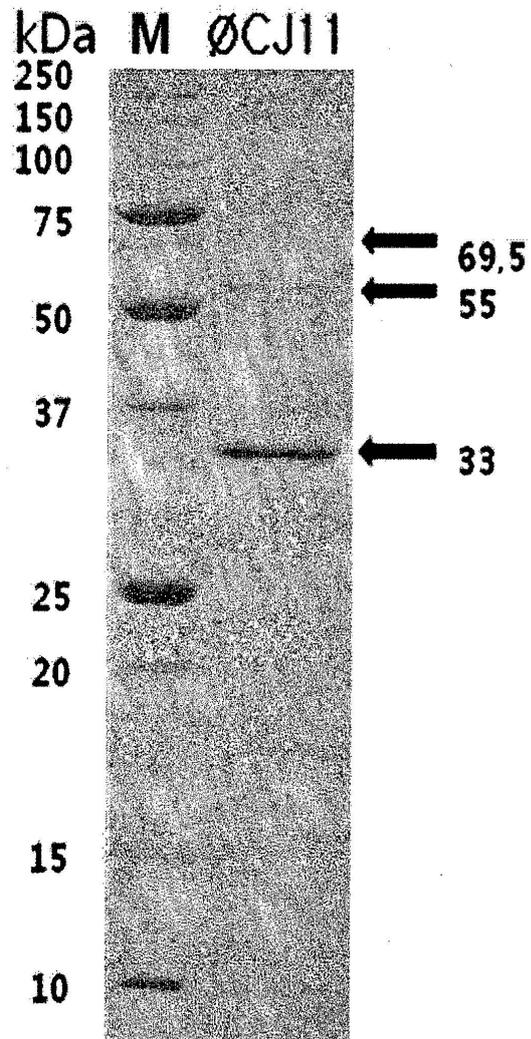
[Fig. 1]



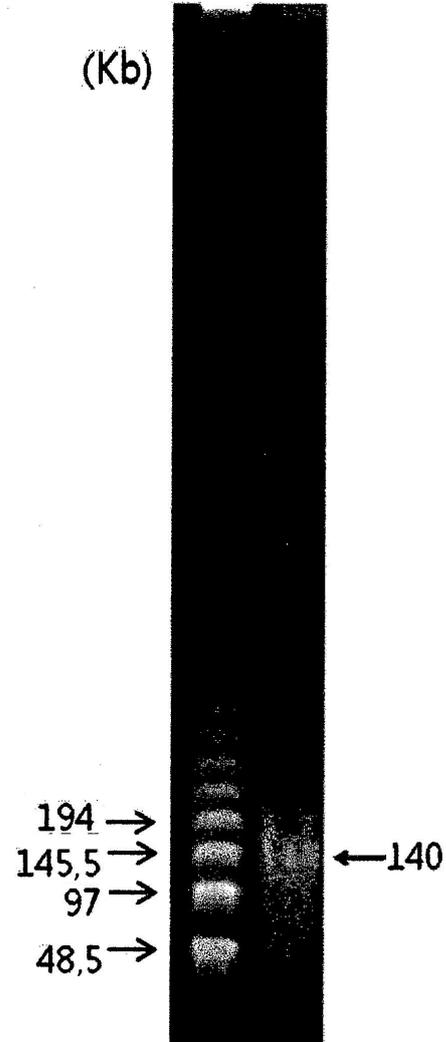
[Fig. 2]



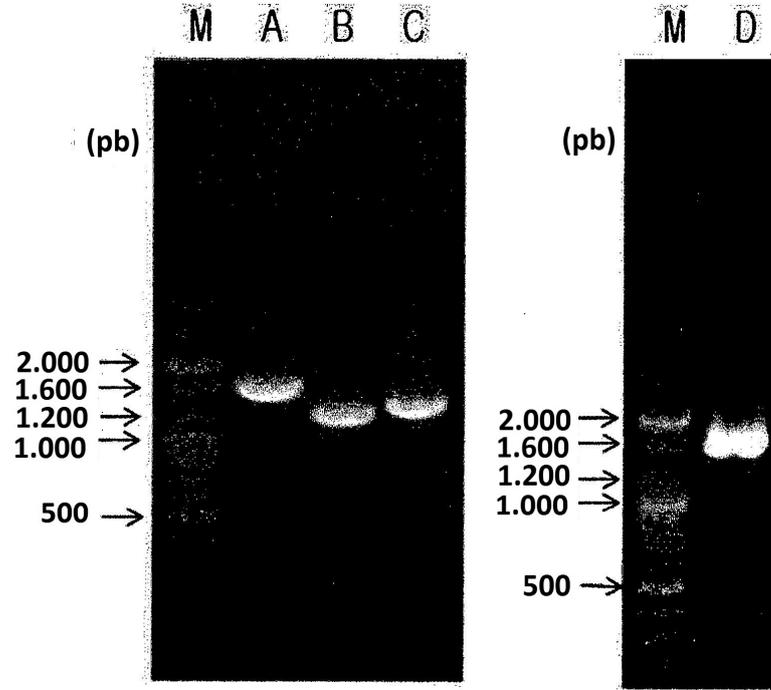
[Fig. 3]



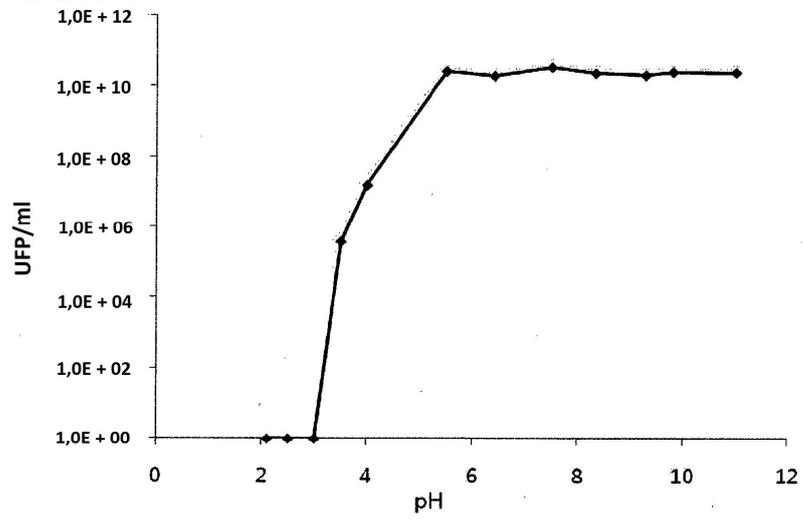
[Fig. 4]



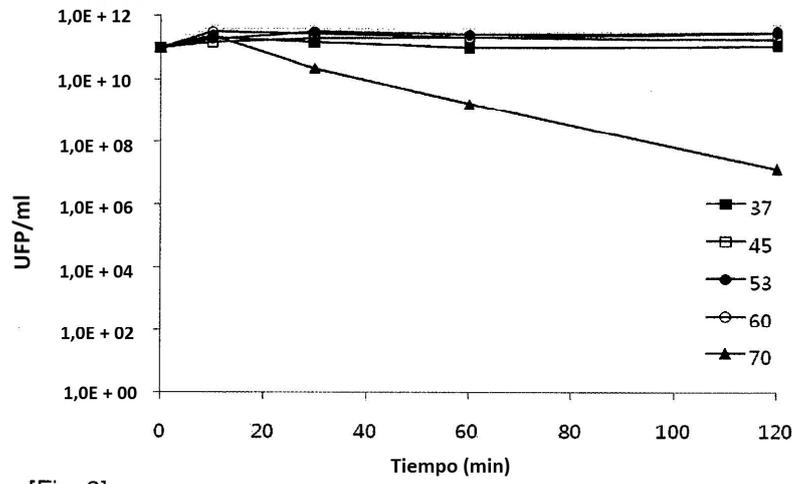
[Fig. 5]



[Fig. 6]



[Fig. 7]



[Fig. 8]

