

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 647 413**

51 Int. Cl.:

A61K 38/16 (2006.01)
A61K 35/74 (2015.01)
A23L 33/135 (2006.01)
A61P 1/00 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)
C12N 9/22 (2006.01)
C07K 14/245 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.07.2013** **PCT/GB2013/051858**
87 Fecha y número de publicación internacional: **16.01.2014** **WO14009744**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.07.2013** **E 13740048 (7)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.09.2017** **EP 2872162**

54 Título: **Colicinas para tratar infecciones bacterianas**

30 Prioridad:

13.07.2012 GB 201212588

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
21.12.2017

73 Titular/es:

**THE UNIVERSITY COURT OF THE UNIVERSITY
OF GLASGOW (100.0%)
10 The Square, University Avenue
Glasgow, Strathclyde G12 8QQ, GB**

72 Inventor/es:

**WALKER, DANIEL y
SMITH, KAREN**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 647 413 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

Colicinas para tratar infecciones bacterianas

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a composiciones para su uso en el tratamiento de la enfermedad de Crohn, o para el tratamiento de una infección por *Escherichia coli* adherente-invasiva.

10 Antecedentes de la invención

Las colicinas son toxinas de proteínas normalmente codificadas por plásmidos de gran masa molecular que se dirigen hacia cepas específicas de *E. coli*. Se producen en aproximadamente el 30 % de los aislados naturales de *E. coli*. Se cree que su función principal es reducir la competición de las bacterias relacionadas durante momentos de estrés ambiental. Las colicinas están bien caracterizadas y su actividad citotóxica y mecanismos de entrada en las células diana se entienden en detalle molecular (Loftus *et al.*, 2006; Walker *et al.*, 2007). Las colicinas pueden destruir las células susceptibles a través de la despolarización de la membrana (por ejemplo, colicinas A, B, N, IA y E1), una actividad de la DNasa no específica (por ejemplo, colicinas E2, E7, E8 y E9), una actividad de la RNasa altamente específica dirigida contra el ARN ribosómico (colicinas E3, E4 y E6) o ARNt (colicinas E5 y D), o en el caso de la colicina M, mediante la inhibición de la síntesis de la pared celular. Normalmente, las colicinas son capaces de destruir las células susceptibles en concentraciones de nM ya que se unen con gran afinidad a su receptor de membrana externa específico. Por ejemplo, la colicina E9 ha demostrado que se une a su receptor BtuB de membrana externa con una afinidad de 2 nM (Housden *et al.*, 2005).

La enfermedad de Crohn (EC) es una forma que actualmente es incurable, crónica y debilitante de la enfermedad intestinal inflamatoria debido a causas desconocidas, que afecta en torno a 1:1000 personas en Reino Unido. Se ha registrado una incidencia mayor de 1:300 en los Estados Unidos. El desarrollo de la EC es multifactorial, pero un área de investigación de interés es la colonización anómala por *E. coli* adherente-invasiva (AIEC) patógena de la mucosa ílea. Estas bacterias colonizan la superficie de la mucosa ílea de los pacientes con Crohn como una biopelícula gruesa, y tienen la capacidad de invadir y multiplicarse en el interior de las células epiteliales (Boudeau *et al.*, 1999). El modelo animal de la enfermedad de Crohn proporciona más pruebas de un papel esencial de la AIEC en esta afección. Las cepas AIEC, pero no las cepas K-12 no patógenas de *E. coli*, demostraron agravar la colitis en un modelo de colon de ratón afectado por colitis (Carvalho *et al.*, 2008). Además, los ratones transgénicos que expresan CEACAM6 humano, que se necesita como receptor para la adhesión de la AIEC, son susceptibles de colonización por AIEC y, en consecuencia, aparece la colitis grave, mientras que la colonización y aparición de la colitis está ausente en los ratones de tipo salvaje (Carvalho *et al.*, 2009). La secuencia genómica recientemente publicada de la cepa LF82 de referencia indica que la AIEC presenta un intervalo de factores de virulencia conocidos (Miquel *et al.*, 2010). La capacidad para unirse e invadir las células epiteliales (Boudeau *et al.*, 1999) y de formar biopelículas son rasgos fenotípicos conocidos de la AIEC (Martínez-Medina *et al.*, 2009). La AIEC también es capaz de invadir y multiplicarse en el interior de macrófagos. La infección de las células hospedadoras por AIEC deriva en la sobreproducción de citocinas proinflamatorias clave, tales como TNF- α , que pueden contribuir a la inflamación y a la patogenia de la enfermedad en la enfermedad de Crohn (Glasser *et al.*, (2001)).

Como en otras infecciones bacterianas crónicas, se espera que la capacidad para formar biopelículas juegue un papel importante en la persistencia de la AIEC en el intestino y su resistencia a los antibióticos. Se sabe que la formación de biopelículas es un factor clave en la patogenia de un intervalo de infecciones bacterianas crónicas, tales como infecciones de pulmón por *Pseudomonas aeruginosa* en pacientes con fibrosis quística e infecciones recurrentes de las vías urinarias por *E. coli*. En cuanto a su estado planctónico, las biopelículas, que son esencialmente comunidades bacterianas fijadas a la superficie y rodeadas por una matriz polimérica extracelular, pueden mostrar un aumento de 10 a 1000 veces en su resistencia a los antibióticos y también mostrar una mayor resistencia a las defensas del hospedador. La actividad de los antibióticos proteicos y peptídicos contra las bacterias en las biopelículas no se entiende del todo bien. La producción y secreción de proteasas es un fenotipo conocido de ciertas biopelículas bacterianas. Las proteasas inactivarán fácilmente los antibióticos proteicos. La matriz extracelular también puede actuar como una barrera de difusión frente a los grandes antibióticos, reduciendo así su eficacia.

Actualmente, la EC no está bien tratada. No existe cura para la EC y el tratamiento se enfoca en aliviar los síntomas, utilizando, por ejemplo, corticosteroides, aminosalicilatos o inmunosupresores. Se han desarrollado anticuerpos anti-TNF- α inyectables y fragmentos de anticuerpo para el tratamiento de la EII (enfermedad intestinal inflamatoria), siendo eficaces en una subpoblación de pacientes con EC. Sin embargo, estos tratamientos son caros y presentan efectos secundarios significativos.

Escasos estudios han demostrado cierto beneficio clínico al utilizar antibióticos en el abordaje de la enfermedad de Crohn, a pesar de que existen relativamente pocas pruebas de su eficacia (Prantera y Lia Scribano, 2009). Los antibióticos más utilizados para el abordaje de la enfermedad de Crohn son el metronidazol y el antibiótico de fluoroquinolonas de amplio espectro, ciprofloxacino. Sin embargo, el uso a largo plazo de los antibióticos a de amplio

espectro está asociado con graves complicaciones, que incluyen infección por *Clostridium difficile*.

Un enfoque alternativo al tratamiento de la enfermedad de Crohn es el uso de probióticos, que son ingredientes alimenticios con microbios vivos con un efecto beneficioso en la salud del ser humano. Sin embargo, una revisión sistemática de los datos de los ensayos no demostró ningún beneficio del uso de un abanico de probióticos en el tratamiento de la enfermedad de Crohn (Rolfe *et al.*, 2006).

Por tanto, sigue existiendo en la técnica la necesidad de tratamientos alternativos para la EC.

10 Sumario de la invención

La presente invención ha descubierto que las colicinas son muy activas frente a los aislados de AIEC obtenidos a partir de pacientes con la enfermedad de Crohn. Las colicinas son eficaces no solo frente a las bacterias libres, sino también frente a la AIEC que se cultiva en el estado de biopelícula. Este hecho es sorprendente, pues normalmente las bacterias en una biopelícula son altamente resistentes a los antibióticos, y las colicinas son proteínas de gran peso molecular de las que no se esperaría que penetrasen eficazmente en la matriz extracelular de una biopelícula. En algunos casos, las colicinas fueron más eficaces contra la AIEC en una biopelícula que los antibióticos que se conocen por tener ciertos efectos en el tratamiento de la enfermedad de Crohn. La AIEC cultivada en una biopelícula también se destruyó con la adición de bacterias que fueron modificadas por ingeniería genética para que produjeran una colicina. Por tanto, las bacterias productoras de colicina podrían utilizarse para suministrar colicinas a la AIEC que se desarrolla en el cuerpo. Aún más sorprendentemente, en la presente invención se ha descubierto que las colicinas destruyen la AIEC intracelular cultivada en macrófagos infectados. Sin desear un vínculo a teoría alguna, esto sugiere que las colicinas absorbidas en vacuolas de macrófagos no están inactivadas en el entorno intracelular, y que las vacuolas que contienen la colicina se fusionan con las vacuolas que contienen la AIEC; ninguno de estos casos podría haberse predicho. Por lo tanto, las colicinas presentan características que las hacen útiles en los métodos terapéuticos del tratamiento de las infecciones bacterianas intracelulares o asociadas a biopelículas, por ejemplo, entre los pacientes con la enfermedad de Crohn.

En algunos casos, la colicina puede administrarse directamente al paciente que lo necesite. Por tanto, en algunos aspectos, la invención proporciona una colicina para su uso en un método para tratar la enfermedad de Crohn o para tratar una infección por AIEC, incluyendo cuando la infección por AIEC está asociada a una biopelícula y/o es una infección bacteriana intracelular.

En otro aspecto, la invención proporciona un polinucleótido que codifica una colicina para su uso en un método para tratar la enfermedad de Crohn o para tratar una infección por AIEC, incluyendo cuando la infección por AIEC está asociada a una biopelícula y/o es una infección bacteriana intracelular.

La AIEC hace referencia a un grupo patógeno de *E. coli*. La LF82 es la cepa prototípica. En ciertos casos de conformidad con la invención, una bacteria de *E. coli* es una bacteria de AIEC si cumple con los siguientes criterios: i) capacidad para adherirse e invadir las células epiteliales intestinales, ii) capacidad para sobrevivir y multiplicarse de forma extensiva en las vacuolas grandes en el interior de macrófagos sin desencadenar la muerte de las células hospedadoras, y iii) capacidad para inducir la liberación de TNF- α por parte de los macrófagos infectados. En otros casos, las bacterias de AIEC pueden identificarse mediante filogenética, tal y como se describe en Miquel *et al.* (2010), que informa de que la AIEC se encuentra en un complejo filogénico clonal de AIEC distinto de *E. coli*. Se cree que la AIEC también puede ser la causa de ciertas infecciones extraintestinales (Martínez-Medina *et al.* (2009)).

En ciertos casos de conformidad con la invención, la infección por AIEC puede asociarse a una biopelícula. Una infección bacteriana está "asociada a una biopelícula" cuando las células bacterianas de la infección están fijadas a la superficie e integradas en una matriz generalmente compuesta de polímeros secretados por bacterias.

La AIEC también invade y se multiplica en el interior de las células epiteliales y macrófagos del paciente. Las células infectadas hiperproducen TNF- α y otras citocinas proinflamatorias, que pueden contribuir a la inflamación y a la patogenia de la enfermedad. Por tanto, en ciertos casos de conformidad con la invención, el tratamiento se dirige a una infección intracelular por AIEC. Las bacterias pueden estar en las células epiteliales y/o en los macrófagos. Preferentemente, el tratamiento se dirige a la AIEC en macrófagos.

En otros casos, el tratamiento se dirige a las bacterias que están asociadas a una biopelícula, tales como AIEC, y a las bacterias intracelulares. Un tratamiento que se dirige a las bacterias de biopelícula e intracelulares puede ser más eficaz ya que quedarán menos células bacterianas después del tratamiento que pudieran restablecer la infección.

En algunos casos, la colicina puede suministrarse en forma de una bacteria que produce una o más colicinas. Por tanto, en algunos aspectos, la invención proporciona una bacteria para su uso en un método para tratar la enfermedad de Crohn o para tratar una infección por AIEC, incluyendo cuando la infección por AIEC está asociada a una biopelícula y/o es una infección bacteriana intracelular, en la que la bacteria produce una colicina.

- La bacteria puede ser cualquier bacteria que sea adecuada para administrarse a un sujeto. La bacteria puede producir naturalmente una colicina (es decir, una colicina endógena) o la bacteria puede haberse modificado por ingeniería genética para producir una colicina (es decir, una colicina heteróloga). Se entenderá que la bacteria también puede haberse modificado por ingeniería genética para mejorar la producción de una colicina endógena que la bacteria ya haya producido naturalmente. Preferentemente, la cepa es no patógena. Los lactobacilos, bifidobacterias, lactococos y cepas no patógenas de *E. coli* son ejemplos de bacterias adecuadas. Por ejemplo, las bacterias podrían ser K-12 W3110 de *E. coli*, que porta un plásmido que codifica una colicina, por ejemplo, el plásmido pColE1-K53 de colicina E1.
- La bacteria es capaz de producir la colicina en el sitio de la infección, por ejemplo, en el intestino de un sujeto que padece la enfermedad de Crohn. La bacteria libera la colicina, por ejemplo, mediante la secreción o después de la expresión de una proteína liberadora de colicina. En ciertos casos de conformidad con la invención, la producción y/o liberación de la colicina se inducen en condiciones que se encuentran durante la administración de la bacteria, o en condiciones que se encuentran en el sitio de la infección. Por ejemplo, la producción y/o liberación de la colicina pueden inducirse en las condiciones halladas en el sistema digestivo o en el íleo del paciente. La expresión de la colicina puede producirse bajo el control de un promotor que se activa en condiciones adecuadas, por ejemplo, cuando la bacteria compete con otra bacteria en el intestino. El promotor puede ser un promotor sensible a SOS. Un ejemplo de promotor es el promotor LexA.
- En algunos casos, la bacteria puede estar en una forma en la que la actividad de la bacteria se suspende. Por ejemplo, la bacteria puede estar liofilizada. La producción y/o liberación de la colicina se reanuda durante o después de la administración de la bacteria al sujeto, o cuando la bacteria alcanza el sitio de la infección. La bacteria puede producir más de una colicina. Por ejemplo, la bacteria puede producir y liberar dos, tres, cuatro o más colicinas.
- En algunos casos, las bacterias que tienen un efecto terapéutico pueden administrarse de forma conveniente en un producto alimenticio que alberga las bacterias como ingrediente. Por tanto, en ciertos casos de conformidad con la invención, la bacteria es adecuada para su uso como un ingrediente en un producto alimenticio. La *Lactococcus lactis*, que se utiliza en la producción de queso, es un ejemplo de una bacteria que es adecuada para su uso como ingrediente en un producto alimenticio.
- En un aspecto, la invención proporciona un producto alimenticio para su uso en un método para tratar la enfermedad de Crohn o para tratar una infección por AIEC, incluyendo cuando la infección por AIEC está asociada a una biopelícula y/o es una infección bacteriana intracelular, en el que el producto alimenticio comprende una colicina o una bacteria que produce y libera una colicina. La colicina tiene un efecto terapéutico.
- Un producto alimenticio es cualquier sustancia que proporcione nutrientes y que sea adecuada para su consumo por parte de un sujeto, incluyendo los productos que se consumen en forma de bebida. El producto alimenticio puede fortificarse con la adición de una bacteria como ingrediente. Como alternativa, el producto alimenticio puede ser un producto alimenticio fermentado por la bacteria o que tiene un ingrediente fermentado. Tras su consumo, la bacteria del producto alimenticio comienza o continúa produciendo la colicina y la libera directamente en el intestino. Entre los ejemplos de productos alimenticios que pueden utilizarse de conformidad con la invención están el queso, la leche, el yogur y los cereales.
- En otro aspecto, la invención proporciona el uso de una colicina, una bacteria que produce una colicina o un polinucleótido que codifica una colicina en la fabricación de un medicamento para tratar la enfermedad de Crohn o tratar una infección por AIEC, incluyendo cuando la infección por AIEC está asociada a una biopelícula o es una infección intracelular.
- En otro aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica para su uso en un método para tratar la enfermedad de Crohn o para tratar una infección por AIEC, incluyendo cuando la infección por AIEC está asociada a una biopelícula y/o es una infección bacteriana intracelular, comprendiendo la composición una cantidad farmacéuticamente eficaz de una colicina o una bacteria que produce una colicina, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- Preferentemente, la composición farmacéutica se formula para su administración oral. La composición farmacéutica puede formularse como producto alimenticio.
- En ciertos casos de conformidad con la invención, la composición farmacéutica se utiliza en un método profiláctico para prevenir la enfermedad de Crohn en un paciente que está en riesgo de padecer la enfermedad, por ejemplo, un paciente que tiene una predisposición genética a la enfermedad de Crohn. Barrett *et al.* (2008) describe factores de riesgo genéticos de ejemplo de la enfermedad de Crohn.
- Las colicinas son toxinas proteicas grandes que tienen un promedio de 500-600 restos y un peso molecular de aproximadamente 40 a 80 kDa. Su estructura se organiza en tres dominios, cada uno implicado en una fase distinta de su acción sobre una célula diana sensible. El dominio de unión al receptor (dominio R) está implicado en el reconocimiento de un receptor específico sobre la superficie de la célula diana. El dominio de translocación (dominio

T) está implicado en la translocación de la colicina a través de la membrana externa de la célula diana. El dominio citotóxico (dominio C) tiene la actividad de que es tóxico para la célula diana. Cada dominio funciona, en general, de forma independiente. Por tanto, en general, los tres dominios de distintas colicinas pueden intercambiarse.

- 5 Las colicinas se unen a receptores específicos, normalmente receptores de nutrientes, sobre la superficie de las células sensibles. Varias colicinas diferentes reconocen ciertos receptores específicos. Por ejemplo, las colicinas E1 a E9 y A se unen todas al receptor BtuB de la vitamina B₁₂ de *E. coli*, y las colicinas Ia e Ib se unen ambas al receptor Cir. Las colicinas de conformidad con la invención pueden unirse a cualquier receptor adecuado sobre la superficie de una célula diana. Entre los ejemplos de receptores se encuentran BtuB, FepA, Cir, Tsx, FhuA, OmpF, 10 OmpA, OmpW y IutA. Preferentemente, la colicina se une a FepA, BtuB o Cir. La colicina puede ser colicina E1, E3, E9, D o Ia. Más preferentemente, la colicina se une al receptor BtuB. La colicina puede ser colicina E1 o E9.

- 15 Las colicinas se translocan a través de la membrana externa de una célula diana utilizando los sistemas Tol o TonB de la célula diana. Las colicinas que utilizan el sistema Tol se clasifican como las colicinas del grupo A e incluyen las colicinas A, E1 a E9, K, L, N, S4, U e Y. Las colicinas que utilizan el sistema TonB se clasifican como las colicinas del grupo B e incluyen las colicinas B, D, H, Ia, Ib, M, 5 y 10. Las colicinas de conformidad con la invención pueden ser colicinas del grupo A o grupo B. Preferentemente, las colicinas son colicinas del grupo A.

- 20 El dominio citotóxico de una colicina es normalmente ionofórico o enzimático. Las colicinas ionofóricas son formadoras de poros y destruyen las células diana mediante despolarización de la membrana citoplásmica. Las colicinas enzimáticas normalmente actúan como nucleasas en el citoplasma. La colicina M degrada enzimáticamente los componentes que se necesitan para la síntesis de la pared celular.

- 25 En ciertos casos de conformidad con la invención, la colicina es una colicina ionofórica formadora de poros o despolarizante de membrana. Por ejemplo, la colicina puede ser colicina A, B, N, Ia, E1, K, U, Ib, 5, 10, S4 o Y. Preferentemente, la colicina ionofórica es colicina E1 o colicina Ia, más preferentemente colicina E1.

- 30 En otros casos de conformidad con la invención, la colicina es una colicina enzimática. Por ejemplo, la colicina puede ser una colicina nucleasa tal como E2, E3, E4, E5, E6, E7, E8, E9, D o la colicina puede ser colicina M. La colicina puede ser una DNasa. Por ejemplo, la colicina puede ser colicina E2, E7, E8 o E9. La colicina puede ser una RNasa ribosómica. Por ejemplo, la colicina puede ser colicina E3, E4 o E6. La colicina puede ser una RNasa de transferencia. Por ejemplo, la colicina puede ser la colicina E5 o D. Preferentemente, la colicina nucleasa es colicina E3, E9 o D, más preferentemente, colicina E9.

- 35 Los receptores de la membrana externa, las rutas de translocación y las actividades citotóxicas de las colicinas bien caracterizadas se muestran en la tabla 1.

Tabla 1 - Receptores de la membrana externa, rutas de translocación y actividades citotóxicas de las colicinas bien caracterizadas

40

Colicina	Receptor	Grupo de ruta de translocación	Dominio citotóxico
A, E1	BtuB	A	Formadora de poros
E2, E7, E8, E9	BtuB	A	DNasa
E3, E4, E6	BtuB	A	RNasa ribosómica
E5	BtuB	A	RNasa de transferencia
K	Tsx	A	Formadora de poros
N	OmpF	A	Formadora de poros
U	OmpA	A	Formadora de poros
B	FepA	B	Formadora de poros
D	FepA	B	RNasa de transferencia
Ia, Ib	Cir	B	Formadora de poros
5, 10	Tsx	B	Formadora de poros
M	FhuA	B	Inhibe la síntesis de la pared celular
S4	OmpW	A	Formadora de poros

Y		A	Formadora de poros
---	--	---	--------------------

En ciertos casos de conformidad con la invención, la colicina comprende un dominio citotóxico que tiene al menos un 50 %, más preferentemente un 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia de aminoácidos con una secuencia seleccionada de los restos 344-522 de la SEQ ID NO: 1 (el dominio citotóxico de la colicina E1), restos 451-551 de la SEQ ID NO: 2 (el dominio citotóxico de la colicina E3), restos 451-582 de la SEQ ID NO: 3 (el dominio citotóxico de la colicina E9), restos 591-697 de la SEQ ID NO: 4 (el dominio citotóxico de la colicina D), restos 403-626 de la SEQ ID NO: 5 (el dominio citotóxico de la colicina Ia), restos 451-581 de la SEQ ID NO: 6 (el dominio citotóxico de la colicina E2), restos 451-576 de la SEQ ID NO: 7 (el dominio citotóxico de la colicina E7), restos 451-573 de la SEQ ID NO: 8 (el dominio citotóxico de la colicina E8), SEQ ID NO: 9 (el dominio citotóxico de la colicina E4), restos 451-551 de la SEQ ID NO: 10 (el dominio citotóxico de la colicina E6), SEQ ID NO: 11 (el dominio citotóxico de la colicina E5), restos 392-592 de la SEQ ID NO: 12 (el dominio citotóxico de la colicina A), restos 292-511 de la SEQ ID NO: 13 (el dominio citotóxico de la colicina B), restos 187-387 de la SEQ ID NO: 14 (el dominio citotóxico de la colicina N), restos 140-271 de la SEQ ID NO: 15 (el dominio citotóxico de la colicina M), y los restos 299-499 de la SEQ ID NO: 16 (el dominio citotóxico de la colicina S4).

Preferentemente, la colicina tiene un dominio citotóxico que tiene al menos un 50 %, más preferentemente un 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia de aminoácidos con los restos 344-522 de la SEQ ID NO: 1 (el dominio citotóxico de la colicina E1), restos 451-551 de la SEQ ID NO: 2 (el dominio citotóxico de la colicina E3), restos 451-582 de la SEQ ID NO: 3 (el dominio citotóxico de la colicina E9), restos 591-697 de la SEQ ID NO: 4 (el dominio citotóxico de la colicina D), o los restos 403-626 de la SEQ ID NO: 5 (el dominio citotóxico de la colicina Ia).

La colicina presenta adicionalmente un dominio de unión al receptor capaz de unirse a un receptor de superficie sobre una célula diana sensible, y un dominio de translocación capaz de dirigir la translocación de la colicina a través de la membrana externa de una célula diana sensible.

El dominio de unión al receptor puede tener una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 50 %, más preferentemente un 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con una secuencia seleccionada de los restos 201-333 de la SEQ ID NO: 1 (el dominio de unión al receptor de la colicina E1), restos 316-450 de la SEQ ID NO: 2 (el dominio de unión al receptor de la colicina E3), restos 316-450 de la SEQ ID NO: 3 (el dominio de unión al receptor de la colicina E9), restos 299-402 de la SEQ ID NO: 5 (el dominio de unión al receptor de la colicina Ia), restos 316-450 de la SEQ ID NO: 6 (el dominio de unión al receptor de la colicina E2), restos 316-450 de la SEQ ID NO: 7 (el dominio de unión al receptor de la colicina E7), restos 316-450 de la SEQ ID NO: 8 (el dominio de unión al receptor de la colicina E8), restos 316-450 de la SEQ ID NO: 10 (el dominio de unión al receptor de la colicina E6), restos 173-391 de la SEQ ID NO: 12 (el dominio de unión al receptor de la colicina A), restos 36-139 de la SEQ ID NO: 15 (el dominio de unión al receptor de la colicina M), y los restos 119-299 de la SEQ ID NO: 16 (el dominio de unión al receptor de la colicina S4).

Preferentemente, el dominio de unión al receptor tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 50 %, más preferentemente un 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con los restos 201-333 de la SEQ ID NO: 1 (el dominio de unión al receptor de la colicina E1), restos 316-450 de la SEQ ID NO: 2 (el dominio de unión al receptor de la colicina E3), restos 316-450 de la SEQ ID NO: 3 (el dominio de unión al receptor de la colicina E9), y los restos 299-402 de la SEQ ID NO: 5 (el dominio de unión al receptor de la colicina Ia).

Como alternativa, la colicina puede tener al menos un 50 %, más preferentemente un 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia de aminoácidos con una secuencia seleccionada de la SEQ ID NO: 1 (colicina E1), SEQ ID NO: 2 (colicina E3), SEQ ID NO: 3 (colicina E9), SEQ ID NO: 4 (colicina D), SEQ ID NO: 5 (colicina Ia), SEQ ID NO: 6 (colicina E2), SEQ ID NO: 7 (colicina E7), SEQ ID NO: 8 (colicina E8), SEQ ID NO: 10 (colicina E6), SEQ ID NO: 12 (colicina A), SEQ ID NO: 13 (colicina B), SEQ ID NO: 14 (colicina N), SEQ ID NO: 15 (colicina M) y SEQ ID NO: 16 (colicina S4). La identidad de secuencia puede determinarse utilizando una alineación BLAST estándar utilizando los parámetros por defecto.

En otro aspecto, la invención proporciona un método *in vitro* para destruir la AIEC, para destruir las bacterias asociadas a una biopelícula o para destruir las bacterias en un macrófago, comprendiendo el método el que la AIEC, la biopelícula o los macrófagos hagan contacto con una cantidad eficaz de una colicina o con una cantidad eficaz de una bacteria que produce una colicina.

A continuación, la invención se describirá con mayor detalle, a modo de ejemplo y no de limitación, haciendo referencia a los dibujos adjuntos. Para los expertos en la materia serán evidentes varias modificaciones y variaciones equivalentes cuando reciban la presente divulgación. Por consiguiente, las realizaciones a modo de ejemplo expuestas de la invención se consideran como ilustrativas y no limitantes. Pueden realizarse diversos cambios de las realizaciones descritas sin desviarse del alcance de la invención.

La presente invención incluye la combinación de los aspectos y rasgos preferidos descritos, exceptuando en donde tal combinación sea claramente inaceptable o se indique expresamente que tenga que evitarse. Los títulos de las secciones solo se utilizan en el presente documento para facilitar la lectura, pero en ningún caso tienen que interpretarse como limitantes.

5

Descripción de los dibujos

Figura 1. Destrucción de la LF82 de *Al E. coli*, que se cultiva en el estado de biopelícula, mediante colicinas y antibióticos de moléculas pequeñas. Biopelículas de aislado de LF82 de Crohn de *E. coli* tratadas con ampicilina, ciprofloxacina, metronidazol, rifaximina y colicinas E1, E3, E9 y D durante 1 h.

10

Figura 2. Supervivencia (%) de las biopelículas de LF82 después del tratamiento con la cepa W3110 pColE1-K53 productora de colicina E1 y la cepa W3110 no productora.

Figura 3. Destrucción de las bacterias intracelulares mediante colicina E1.

15

Figura 4. Destrucción de las bacterias intracelulares mediante colicina E9.

Descripción detallada de la invención

20

Colicinas

Las colicinas pueden obtenerse directamente a partir de los sobrenadantes bacterianos de la colicina, produciendo cepas bacterianas. Normalmente, la proteína se precipita desde el sobrenadante mediante precipitación de sulfato de amonio y la proteína se purifica mediante cromatografía por intercambio iónico e infiltración de gel. Como alternativa, la proteína recombinante podría producirse con un marcador de afinidad modificado por ingeniería genética, tal como un marcador His, y la proteína purificada mediante cromatografía por afinidad (cromatografía por afinidad por metales en el caso de la proteína marcada con His). En ciertos casos de conformidad con la invención, la colicina es un heterodímero con una proteína de inmunidad correspondiente. Los complejos de proteínas de inmunidad-colicina del tipo nucleasa son adecuados. En este caso, un marcador de afinidad puede modificarse por ingeniería genética sobre el complejo de proteína de inmunidad-colicina aislado mediante cromatografía por afinidad.

30

Bacterias que producen una colicina

Las cepas bacterianas que producen (es decir, expresan y secretan) una colicina pueden aislarse de la naturaleza. En tales casos, la colicina puede considerarse como endógena a dicha cepa. Como alternativa, las bacterias que producen (es decir, expresan y secretan) una o más colicinas pueden modificarse por ingeniería genética utilizando técnicas estándar que se conocen bien en la técnica. Tal modificación por ingeniería genética puede realizarse para mejorar la producción (es decir, expresión y/o secreción) de una colicina que ya han producido naturalmente las bacterias, es decir, para mejorar la producción de una colicina endógena. Como alternativa, las bacterias pueden modificarse por ingeniería genética para producir (es decir, expresar y secretar) una colicina heteróloga, es decir, una colicina que no producen naturalmente dichas bacterias.

40

Las colicinas normalmente están codificadas sobre plásmidos. Por tanto, las bacterias que producen una colicina pueden modificarse por ingeniería genética mediante la introducción de un plásmido que porte un gen de una colicina, a pesar de que pueden emplearse otros vectores de expresión o construcciones, incluyendo construcciones de expresión cromosómicamente integradas. Así, las bacterias pueden comprender un vector de expresión o una construcción de expresión que comprenda una secuencia de ácido nucleico que codifica una colicina, por lo que la bacteria es capaz de expresar y secretar colicina. La colicina puede ser endógena o heteróloga con respecto a la bacteria. En ciertos casos, el vector o construcción de expresión (por ejemplo, el plásmido) codifica adicionalmente (es decir, comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica) una proteína de inmunidad y/o una proteína liberadora de colicina, por lo que la bacteria es capaz de expresar dicha proteína de inmunidad y/o liberar la proteína, y secretarlas si procediera. Un ejemplo de un plásmido adecuado es pColE1-K53.

50

Las proteínas de inmunidad protegen a la célula de la actividad de las colicinas producidas por la propia célula o por células contiguas. Cada proteína de inmunidad es un antagonista específico de la actividad de una colicina correspondiente. Para las colicinas del tipo nucleasa, la proteína de inmunidad se une fuertemente con la colicina y previene que se degrade el ácido nucleico en el citoplasma. Normalmente, un complejo de proteína de inmunidad-colicina se libera a partir de la célula productora, pero la colicina se disocia del complejo de inmunidad antes o al entrar en una célula diana sensible. Por tanto, en ciertos casos de conformidad con la invención, la bacteria produce tanto una colicina, por ejemplo, una colicina del tipo nucleasa, como una proteína de inmunidad correspondiente. La bacteria puede liberar un complejo de proteína de inmunidad-colicina.

60

Las bacterias que producen una colicina formadora de poros también pueden producir una proteína de inmunidad correspondiente. Para las colicinas formadoras de poros, normalmente la proteína de inmunidad es una proteína de membrana interna que previene que la colicina exógena despolarice la membrana. La colicina ionofórica

65

citoplásmica no está activa en la célula productora. Por tanto, en ciertos casos de conformidad con la invención, la bacteria produce una colicina formadora de poros y una proteína de inmunidad correspondiente. En otros casos, la bacteria que produce la colicina formadora de poros no expresa el receptor que reconoce la colicina, de modo que la célula productora no es sensible a la colicina exógena creada por las células contiguas de la misma cepa. Un ejemplo de proteínas de inmunidad se divulga en Cascales *et al.* (2007) y Papadakis *et al.* (2011).

La colicina puede liberarse de la bacteria mediante cualquier medio adecuado. Por ejemplo, una secuencia de direccionamiento adecuada puede modificarse por ingeniería genética sobre la colicina para dirigir su secreción desde la célula. Como alternativa, la bacteria productora de colicina puede expresar conjuntamente una proteína liberadora de colicina. Las proteínas liberadoras de colicina, también conocidas como proteínas de lisis de colicina, son pequeñas lipoproteínas que tienen una secuencia consenso común que, en algunas ocasiones, se expresan conjuntamente con una colicina. La liberación de las colicinas desde una célula que expresa conjuntamente una proteína liberadora de colicina se produce a través de un solo mecanismo. La expresión de la proteína liberadora de colicina es letal para la célula productora. Las secuencias de aminoácidos de las proteínas liberadoras de lisis de ejemplo se divulgan en la figura 2 de Cascales *et al.* (2007).

Probióticos

Un microorganismo vivo que confiere un beneficio de salud cuando se administra o consume en cantidades adecuadas se denomina probiótico u organismo probiótico. Un organismo probiótico puede utilizarse como ingrediente en un producto alimenticio o en un suplemento dietético. En algunos casos, la bacteria de conformidad con la invención es una bacteria probiótica.

Sujetos para el tratamiento

Los sujetos preferidos para el tratamiento mediante los métodos de la invención son mamíferos. Los sujetos preferidos son primates (incluyendo seres humanos), roedores (incluyendo ratones y ratas) y otros animales de laboratorio, domésticos y de ganadería, incluyendo, pero no limitándose a, conejos, perros, gatos, caballos, vacas, ovejas, cabras, etc.

Composiciones farmacéuticas y métodos de tratamiento

Las colicinas y las bacterias descritas en el presente documento pueden formularse en composiciones farmacéuticas. Estas composiciones pueden comprender, además de una de las sustancias anteriores, un excipiente farmacéuticamente aceptable, vehículo, tampón, estabilizador u otros materiales muy conocidos por los expertos en la materia. Tales materiales no deberían ser tóxicos y no deberían interferir con la eficacia del principio activo. La naturaleza precisa del vehículo u otro material puede depender de la vía de administración, por ejemplo, vía oral, intravenosa, cutánea o subcutánea, nasal, intramuscular e intraperitoneal. Los ejemplos de composiciones y métodos adecuados para la administración se proporcionan en Esseku y Adeyeye (2011) y Van den Mooter G. (2006).

Preferentemente, la vía de administración es oral. Las composiciones farmacéuticas para la administración oral pueden ser en forma de comprimido, cápsula, polvo o líquido. Un comprimido puede incluir un vehículo sólido, tal como gelatina o un adyuvante. Las composiciones farmacéuticas líquidas incluyen, en general, un vehículo líquido tal como agua, petróleo, aceites animales o vegetales, aceite mineral o aceite sintético. Pueden incluirse una solución salina fisiológica, dextrosa u otra solución de sacáridos o glicoles, tal como etilenglicol, propilenglicol o polietilenglicol.

Para la inyección intravenosa, cutánea o subcutánea, o para la inyección en el sitio del dolor, el principio activo estará en forma de una solución acuosa parenteralmente aceptable, que no tiene pirógenos y que tiene un pH, isotonicidad y estabilidad adecuados. Los expertos relevantes en la técnica son muy capaces de preparar soluciones adecuadas utilizando, por ejemplo, vehículos isotónicos tales como una inyección de cloruro de sodio, inyección de Ringer, inyección de Ringer lactada. Pueden incluirse conservantes, estabilizantes, tampones, antioxidantes y/u otros aditivos, según proceda. Cualquiera que sea la naturaleza del principio activo que se va a proporcionar a un individuo (por ejemplo, una célula, un polipéptido, una molécula de ácido nucleico, otro agente farmacéuticamente útil de acuerdo con la presente invención), la administración se realiza preferentemente en una "cantidad profilácticamente eficaz" o en una "cantidad terapéuticamente eficaz" (según sea el caso, aunque la profilaxis puede considerarse terapia), siendo esto suficiente para mostrar un beneficio al individuo. La cantidad real administrada y el índice y el curso temporal de administración dependerán de la naturaleza y gravedad de lo que se está tratando. La prescripción del tratamiento, por ejemplo, las decisiones sobre la posología, etc., son responsabilidad de los médicos de familia y otros facultativos, y normalmente se tiene en cuenta el trastorno que ha de tratarse, el estado del paciente individual, el sitio de administración, el método de administración y otros factores conocidos por los facultativos. Los ejemplos de las técnicas y protocolos mencionados anteriormente se pueden hallar en *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 20ª edición, 2000, pub. Lippincott, Williams & Wilkins.

Una composición puede administrarse sola o en combinación con otros tratamientos, incluyendo otras colicinas o

bacterias productoras de colicina, ya sea simultáneamente o de forma consecutiva, dependiendo de la afección que deba tratarse.

Secuencias

5 SEQ ID NO: 1
Colicina E1 (UniProt: P02978, última modificación el 21 de julio de 1986. Versión 1. Suma de verificación: A77C351BBC1AB7C1)
Estructura de dominio: Dominio T 1-200, Dominio R 201-333, Dominio C 334-522

10 METAVAYYKDGVPYDDKGQVIITLLNGTPDGSGSGGGGGKGGSKSESSAAIHATAKWSTAQLKKT
QAEQAARAKAAAEQAQAKAKANRDALTQRLKDIVNEALRHNASRTPSATELAHANNAAMQAEDERL
RLAKAEKARKEAEAAEKAFQAEQRRKEIEREKAETERQLKLAEAEKRLAALSEEAKAVEIAQ
KKLSAAQSEVVKMDGEIKTLNSRLSSSIHARDAEMKTLAGKRNELAQASAKYKELDELVKKLSPR
ANDPLQNRPFPEATRRRVGAGKIREEKQKQVTASETRINRINADITQIQKAISQVSNRNRAGIAR
VHEAEENLKKAQNNLLNSQIKDAVDATVSFYQTLTEKYGEKYSKMAQELADKSKGKKIGNVNEAL
AAFEKYKDVLNKKFSKADRDAIFNALASVKYDDWAKHLDQFAKYLKITGHVSFGYDVVSDILKIK
DTGDWKPLFLTLEKKAADAGVSYVVALLEFSLLAGTTLGIWGIAIVTGILCSYIDKNKLNTINEVL
GI

15 SEQ ID NO: 2
Colicina E3 (UniProt: P00646, última modificación el 1 de abril de 1988. Versión 1. Suma de verificación: E444CE918D89ECD6)
Estructura de dominio: Dominio T 1-315, Dominio R 316-450, Dominio C 451-551

MSGGDGRGHNTGAHSTSGNINGGPTGLGVGGGASDGSWSENPNWGGGSGSGIHWGGGSGHGNG
GGNGNSGGGSGTGGNLSAVAAPVAFGFPALSTPGAGGLAVSISAGALSAAIADIMAALKGPFKFG
LWGVALYGVLP SQIAKDDPNMMSKIVTSLPADDITESPVSSLPLDKATVNVNVRVVDVKDERQN
ISVVS GVPMSVPVVDAPKTERPGVFTASIPGAPVLNISVNNSTPAVQTLSPGVNTNTDKDVRPAG
FTQGGNTRDAVIRFPKDSGHNAVYVSVSDVLS PDQVKQRQDEENRRQQEWDATHPVEAAERNYER
ARAE LNQANEDVARNQERQAKAVQVYNSRKSELDAA NKTLADAI AEIKQFNRFADP MAGGHRMW
QMAGLKAQRAQTDVNNKQAAFDAAAKEKSDADAALSSAMESRKKKEDKKRSAENNLNDEKNKPRK
GFKDYGH DYHPAPKTENIKGLGDLKPGIPKTPKQNGGKRRKRTGDKGRKIYEWDSQHGELEGYR
ASDGQHLGSFDPKTGNQLKGPDPKRNIKKYL

20 SEQ ID NO: 3
Colicina E9 (UniProt: P09883, última modificación el 1 de octubre de 1996. Versión 4. Suma de verificación: 47A71B57B45AFDD9)
Estructura de dominio: Dominio T 1-315, Dominio R 316-450, Dominio C 451-582

25 MSGGDGRGHNTGAHSTSGNINGGPTGIGVSGGASDGSWSENPNWGGGSGSGIHWGGGSGRGNG
GGNGNSGGGSGTGGNLSAVAAPVAFGFPALSTPGAGGLAVSISASELSAAIAGIIAKLKKVNLKF
TPFGVVLSSLIPSEIAKDDPNMMSKIVTSLPADDITESPVSSLPLDKATVNVNVRVVDVKDERQ
NISVVS GVPMSVPVVDAPKTERPGVFTASIPGAPVLNISVNDSTPAVQTLSPGVNTNTDKDVRPA
GFTQGGNTRDAVIRFPKDSGHNAVYVSVSDVLS PDQVKQRQDEENRRQQEWDATHPVEAAERNYE

RARAE LNQANEDVARNQERQAKAVQVYNSRKSELDAANKTLADAIAEIKQFNRFADHPMAGGHRM
WQMAGLKAQRAQTDVNNKQAAFDAAAKEKSDADAALSAAQERRKQKENKEKDAKDKLDKESKRNK
PGKATGKGKPVGDKWLDDAGKDSGAPIPDRIADKLRDKEFKSFDDFRKAVWEEVSKDPELSKNLN
PSNKSSVSKGYSPFTPKNQVVGGRKVYELHHDKPISQGGEVYDMDNIRVTTPKRHIDIHRGK

SEQ ID NO: 4

Colicina D (UniProt: P17998, última modificación el 1 de noviembre de 1990. Versión 1. Suma de verificación: F468B4A0172ABBB1) Estructura de dominio: Dominio C 591-697

5

MSDYEGSGPTEGIDYGHSMVWPSTGLISGGDVKPGGSSGIAPSMPPGWDYSPQGIALVQSVLF
PGIIRRIILDKELEEGDWSGWSVSVHSPWGNEKVSAAARTVLENGLRGGLPEPSRPAAVSFARLEP
ASGNEQKIIRLMVTQQLEQVTDIPASQLPAAGNNVPVKYRLMDLMQNGTQYMAIIGGIPMTVPV
DAVPVPDRSRPGTNIKDVSAPVSPNLPDLVLSVGQMNTPVLSNPEIQEEGVIAETGNYVEAGYT
MSSNNHDVIVRFPEGSDVSPLYISTVEILDSNGLSQRQEAENKAKDDFRVKKEEAVARAEAEKAK
AELEFSKAGVNQPPVYTQEMMERANSVMNEQGALVLNNTASSVQLAMTGTGVWTAAGDIAGNISKF
FSNALEKVTIPEVSPLLMRISLGALWFHSEEACAGSDIVPGRNLEAMFSLSAQMLAGQGVVIEPG
ATSVNLPVRGQLINSNGQLALDLLKTGNESIPAAVPVLNAVRDTATGLDKITLPAVVGAPSRITL
VNPVPQPSVPTDTGNHQPVPVTPVHTGTEVKSVEMPVTTITPVSDVGGLRDFIYWRPDAAGTGVE
AVYVMLNDPLDSGRFSRKQLDKKYKHAGDFGISDTKKNRETITKFRDAIEEHLSDKDTVEKGTYR
REKGSKVYFNPNTMNVVIIKSNGEFLSGWKINPDADNGRIYLETGEL

SEQ ID NO: 5

Colicina Ia (UniProt: P06716, última modificación el 24 de octubre de 2003. Versión 2. Suma de verificación: 3DCODF322F405D39)
Estructura de dominio: Dominio T 1-298, Dominio R 299-402, Dominio C 403-626

10

MSDPVRITNPGAESLGYDSGHEIMAVDIYVNPPRVDVFHGTTPPAWSSFGNKTIWGGNEWVDDSP
TRSDIEKRDKEITAYKNTLSAQKQENENKRTEAGKRLSAAIAAREKDENTLKTTLRAGNADAADIT
RQEFRLLQAELEYGFRTEIAGYDALRLHTESRMLFADADSLRISPREARSLEQAEKRQKDAQN
ADKKAADMLAEYERRKGILDTRLSELEKNGGAALAVLDAQQARLLGQQTRNDRAISEARNKLSSV
TESLNTARNALTRAQQLTQQKNTPDGKTIVSPEKFPGRSSTNHSIVVSGDPRFAGTIKITTSV
IDNRANLNYLLSHSGLDYKRNI LNDRNPVVTEDVEGDKKIYNAEVAEWDKLRQRLLDARNKITS
ESAVNSARNNLSARTNEQKHANDALNALLKEKENIRNQLSGINQKIAEEKRKQDELKATKDAINF
TTEFLKSVSEKYGAKAEQLAREMAGQAKGKKIRNVEEALKTYEKYRADINKKINAKDRAAIAAAL

15

ESVKLSDISSNLNRF SRGLGYAGKFTSLADWITEFGKAVRTENWRPLFVKTTETIIAGNAATALVA
LVFSILTGSALGIIGYGLLMAVTGALIDESLVEKANKFWGI

SEQ ID NO: 6

Colicina E2 (UniProt: B5TQU9, última modificación el 4 de noviembre de 2008. Versión 1. Suma de verificación: B046C6FC7BF0FE2C)
Estructura de dominio: Dominio T 1-315, Dominio R 316-450, Dominio C 451-581

20

MSGGDGRGHNTGAHSTSGNINGGPTGLGVGGGASDGSWSENPNWGGGSGSGIHWGGGSGHGNG
GGNSNSGGGSGTGGNLSAVAAPVAFGFPALSTPGAGGLAVSISAGALSAAIADIMAALKGPFKFG
LWGVALYGVLP SQIAKDDPNMMSKIVTSLPADDITESPVSSLPLDKATVNVNVRVDDVKDERQN
ISVVSGVPMSVPVVDAPKPTERPGVFTASIPGAPVLNISVNNSTPAVQTLSPGVTNNTDKDVRPAG
FTQGGNTRDAVIRFPKDSGHNAVYVSVSDVLS PDQVKQRQDEENRRQQEWDATHPVEAAERNYER
ARAE LNQANEDVARNQERQAKAVQVYNSRKSELDAANKTLADAIAEIKQFDRFAHDPMAGGHRMW
QMAGLKAQRAQT DVNNKQA AFDAAAKEKSDADAALSAAQERRKQKENKEKDAKDKLDKESKRNP
GKATGKGKPVGDKWLDDAGKDSGAPIPDRIADKLRDKEFKNFDDFRKKFWEEVSKDPDL SKQFKG
SNKTNIQKGKAPFARKKDQVGGRRERFELHHDKPISQDGGVYDMNNIRVTTPKRHIDIHRGK

SEQ ID NO: 7

Colicina E7 (UniProt: Q47112, última modificación el 30 de mayo de 2000. Versión 2. Suma de verificación: E5B05E73B2E17249)

Estructura de dominio: Dominio T 1-315, Dominio R 316-450, Dominio C 451-576

MSGGDGRGHNSGAHNTGGNINGGPTGLGGNGGASDGSWSENPNWGGGSGSGVHWGGGSGHGNG
GGNSNSGGGSSNSVAAPMAFGFPALAPGAGTLGISVSGEALSAAIADIFAALKGPFKFSAWGIA
LYGILPSEIAKDDPNMMSKIVTSLPAETVTNVQVSTLPLDQATVSVTKRVTDVVKDTRQHI AVVA
GVPMSPVPVNAKPTRTPGVFHASFPVPSLTVSTVKGLPVSTTLPRGITEDKGRTAVPAGFTFGG
GSHEAVIRFPKESGQKPVYVSVTDVLT PAQVKQRQDEEKRLQQEWNDAHPVEVAERNYEQARAE L
NQANKDVARNQERQAKAVQVYNSRKSELDAANKTLADAKAEIKQFERFAREPMAGHRMWQMAGL
KAQRAQT DVNNKKA AFDAAAKEKSDADVALSSALERRKQKENKEKDAKAKLDKESKRNP KGATG
KGKPVNNKWLNNAGKDLGSPVPDRIANKLRDKEFKSFDDFRKKFWEEVSKDP EL SKQFSRNNNDR
MKVGKAPKTRTQDVSGKRTSFELHHEKPISQNGGVYMDNISVVT PKRHIDIHRGK

SEQ ID NO: 8

Colicina E8 (UniProt: C6GJY4, última modificación el 1 de septiembre de 2009. Versión 1. Suma de verificación: 42ECBDB92E0DB52)

Estructura de dominio: Dominio T 1-315, Dominio R 316-450, Dominio C 451-573

MSGGDGRGHNTGAHSTSGNINGGPTGIGVSGGASDGSWSENPNWGGGSGSGIHWGGGSGRGNG
GGNGNSGGGSGTGGNLSAVAAPVAFGFPALSTPGAGGLAVSISASELSAAIAGIIAKLKKVNLKF
TPFGVVLSSLIPSEIAKDDPNMMSKIVTSLPADDITESPVSSLPLDKATVNVNVRVDDVKDERQ
NISVVSGVPMSVPVVDAPKPTERPGVFTASIPGAPVLNISVNNSTPAVQTLSPGVTNNTDKDVRPA
GFTQGGNTRDAVIRFPKDSGHNAVYVSVSDVLS PDQVKQRQDEENRRQQEWDATHPVEAAERNYE
RARAELNQANEDVARNQERQAKAVQVYNSRKSELDAANKTLADAIAEIKQFNRFADHDPMAGGHRM
WQMAGLKAQRAQT DVNNKQAADADAALSAAQERRKQKENKEKDAKDKLDKESKRNP KGATGKGK
PVGDKWLDDAGKDSGAPIPDRIADKLRDKEFKNFDDFRKKFWEEVSKDP EL SKQFNPGNKKRLSQ
GLAPRARNKDTVGGRRSFELHHDKPISQDGGVYMDNLRITTPKRHIDIHRGQ

SEQ ID NO: 9

Dominio citotóxico de colicina E4 (UniProt: Q47109, última modificación el 1 de noviembre de 1996. Versión 1. Suma de verificación: 6F997EED8BF568D1)

ERFAREPMAAGHRMWQ MAGLKAQRAQTDVNNKKA AFDAAAKEKSDADAALSSAMESRKKKEDKKR
SAENKLNEEKNKPRKGVKDYGH DYHPAPKTEEIKGLGELKKAPKKT PKQGGGRRDRWIGDKGRK
IYEWDSQHGELEGYRASDGEHIGAFDPKTGKQIKGPD PKGRNIKKYL

SEQ ID NO: 10

Colicina E6 (UniProt: P17999, última modificación el 1 de noviembre de 1990. Versión 1. Suma de verificación: D223D7F0770392EO)

Estructura de dominio: Dominio T 1-315, Dominio R 316-450, Dominio C 451-551

MSGGDGRGHNTGAHSTSGNINGGPTGLGVGGGASDGSGWSEN NPWGGGSGSGIHWGGGSGHGNG
GGNGNSGGGSGTGGNLSAVAAPVAFGFPALSTPGAGGLAVSISAGALSAAIADIMAALKGPFKFG
LWGVALYGVLP SQIAKDDPNMMSKIVTSLPADDITESPVSSLPLDKATVNVNVRVDDVKDERQN
ISVVS GVPMSVPVVD AKPTERPGVFTASIPGAPVLNISVNNSTPAVQTLSPGV TNNTDKDVRPAG
FTQGGNTRDAVIRFPKDSGHNAVYVSVDVLS PDQVKQRQDEENRRQQEWDATHPVEAAERNYER
ARAE LNQANEDVARNQERQAKAVQVNSRKSELDAANKTLADAI AEIKQFNRF AHDPMAGGHRMW
Q MAGLKAQRAQTDVNNKQA AFDAAAKEKSDADAALSSAMESRKKKEDKKRSAENKLNEEKNKPRK
GVKDYGH DYHPDPKTEDIKGLGELKEGKPKTPKQGGG GKRARWYGD KGRKIYEWDSQHGELEGYR
ASDGQHLGSFEPKTGNQLKGPD PKRNIKKYL

SEQ ID NO: 11

Dominio citotóxico de colicina E5 (UniProt: P18000, última modificación el 1 de noviembre de 1990. Versión 1. Suma de verificación: 9DE1713F474B2BA4)

RFAHDPMAGGHRMWQ MAGLKAQRAQTDVNNKQA AFDAAAKEKADADAALSTAMESRKKKEDNKRD
AEGKLNDELAKNKGKIPGLKIDQKIRGQMPERGWTEDDIKNTV SNGATGTSFDKRSPKKT PPDYL
GRNDPATVYGSPGKYVVVNDRTGEVTQISDKTDPGWVDD SRIQWGNKNDQ

SEQ ID NO: 12

Colicina A (UniProt: P04480, última modificación el 13 de agosto de 1987. Versión 1. Suma de verificación: B80FA1F52A8CFC5D)

Estructura de dominio: Dominio T 1-172, Dominio R 173-391, Dominio C 392-592

MPGFNYGGKGDGTGWSSERSGSGPEPGGGSHGNSGGH DRGDSSNVGNESVTVMKPGDSYNTPWGKV
IINAAGQPTMNGT VMTADNSSMVPYGRGFTRVLNSLVNNPVSPAGQNGGKSPVQTAVENYLMVQS
GNLPPGYWLSNGKVMTEVREERTSGGGGKNGNERTWT VKVPREVPQLTASYNEGMRIRQEAADRA
RAEANARALAE EEARAIASGKS KA EFDAGKRVEAAQA AINTAQLNVNNLSGAVSAANQVITQKQA
EMTPLKNE LAANQ RVQETLKFINDPIRSRIHFNM RSLIRAQHNVDTKQNEINAAVANRDALNS
QLSQANNILQ NARN EKS AADAALSAATAQRLQAE AALRAAAEAAEKARQRQAE EAERQRQAMEVA
EKAKDERELLEKTSELIAGMGDKIGEHLGD KYKAI AKDIADNIKNFQGKTIRSFDDAMASLNKIT
ANPAMKINKADRDALVNAWKHVDAQDMANKLGNLSKAFKVADVVMKVEKVREKSIEGYETGNWGP
LMLEVESWVLSGIASSVALGIFSATLGAYALSLGVP AIAVGIAGILLAAVVGALIDDKFADALNN
EIIRPAH

SEQ ID NO: 13

Colicina B (UniProt: P05819, última modificación el 23 de enero de 2007. Versión 3. Suma de verificación: 8ABB972CF1925964)

Estructura de dominio: Dominios T y R 1-291, Dominio C 292-511

MSDNEGSVPTEGIDYGDTMVVWPSTGRIPGGDVKPGGSSGLAPSMPPGWDYSPQGIALVQSVLF
 PGIIRRIILDKELEEGDWSGWSVSVHSPWGNEKVSAAARTVLENGLRGGLPEPSRPAAVSFARLEP
 ASGNEQKIIRLMVTQQLEQVTDIPASQLPAAGNNVPVKYRLTDLMQNGTQYMAIIGGIPMTVPVV
 DAVPVPDRSRPGTNIKDVSAPVSPNLPDLVLSVGQMNTPVRSNPEIQEDGVISETGNYVEAGYT
 MSSNNHDVIVRFPEGSGVSPLYISAVEIILDSNSLSQRQEAENNAKDDFRVKKEQENDEKTVLTKT
 SEVIISVGDKVGEYLGDKYKALSREIAENINNFQGKTIRSYDDAMSSINKLMANPSLKINATDKE
 AIVNAWKAFNAEDMGNKFAALGKTFKAADYAIKANNIREKSIEGYQTGNWGPLMLEVESWVISGM
 ASAVALSLSLTLGSALIAFGLSATVVGVFVVIAGAIGAFIDDKFVDELNHKIIK

- 5 SEQ ID NO: 14
 Colicina N (UniProt: P08083, última modificación el 1 de agosto de 1988. Versión 1. Suma de verificación:
 1C4342E222F8CED)
 Estructura de dominio: Dominios T y R 1-186, Dominio C 187-387

MGSNGADNAHNNNAFGGKPNPGIGNTSGAGSNGSASSNRGNSNGWSWSNKPKNKNDGFHSDGSYHIT
 FHGDNNKPKPGGNSGNRGNGDGASAKVGEITITPDNSKPGRYISSNPEYSLAKLIDAESIKG
 TEVYTFHTRKGQYVKVTPDSNIDKMRVDYVNWKGPKYNNKLVRKRVFSQFLLFRKEEKEKEKEA
 LLKASELVSGMGDKLGEYLGVKYKNVAKEVANDIKNFHGRNIRSYNEAMASLNKVLANPKMKVKNK
 SDKDAIVNAWKQVNAKDMANKIGNLGKAFKVADLAIKVEKIREKSIEGYNTGNWGPLMLEVESWI
 10 IGGVVAGVAISLFGAVLSFLPISGLAVTALGVIGIMTISYLSSFIDANRVSNINNISSVIR

- SEQ ID NO: 15
 Colicina M (UniProt: P05820, última modificación el 1 de noviembre de 1988. Versión 1. Suma de verificación:
 B41B7BE107EC1DBA)
 15 Estructura de dominio: Dominio T 1-35, Dominio R 36-139, Dominio C 140-271

METLTVHAPSPSTNLPSYGNAGFSLSAPHVPGAGPLLQVQVVSFFQSPNMCLQALTQLEDYIKKH
 GASNPLTLQIISTNIGYFCNADRNLVLHPGISVYDAYHFAKPAPSQYDYRSMNMKQMSGNVTTPI
 VALAHYLVGNGAERSVNIANIGLKISPMKINQIKDIIKSGVVGTFPVSTKFTTHATGDYNVITGAY
 LGNITLTKTEGTLTISANGSWTYNGVRSYDDKYDFNASTHRGIIGESLTRLGAMFSGKEYQILLP
 GEIHIKESGKR

- SEQ ID NO: 16
 20 Colicina S4 (UniProt: Q9XB47, última modificación el 1 de noviembre de 1999. Versión 1. Suma de verificación:
 3E36C7271BF1D293)
 Estructura de dominio: Dominio T 1-118, Dominio R 119-299, Dominio C 299-499

MAKELSVYGPTAGESMGGTGANLNQGGNNNSNSGVHWGGSGSGNGGREHGSQTGWGWSKTNNP
 DVPPYVDDNGQVRITITNGLVKTPVYGVPGAGGNSDVQGGYIPENPNDEVARKWDKNNLPREIDV
 SIDGFKYRVTLNDNGRAIGILRTGVRPYVGSEKAKAGIMEKINHKTPEEIYEALGFNKDESQRQE
 KAKQQAEDAWDRLPNVRKFDVDVEQFHYLVLDYGNVLSVTRTGVRPYVGSEKAKAGIMDKVD
 HKTPEEIYEALGFNNEEPQRQNQAKKAAYDVYFSFSMNRDRIQSDVLNKAEEVISDIGNKVGDYL
 25 GDAYKSLAREIADDDVKNFQGKTIRSYDDAMASLNKVLNPGFKFNRADSDALANVWRSIDAQDMA
 NKLGNISKAFKFADVVMKVEKVREKSIEGYETGNWGPLMLEVESWVLSGASAVALGVFSATLGA
 YALSLGAPAIAGVIGILLAAVVGALLDDKFADALNKEIIPAH

Ejemplos

Ejemplo 1

5 Actividad de las colicinas frente a AI *E. coli*

Cuatro aislados de *E. coli* adherente-invasiva (AIEC) se obtuvieron de pacientes con la enfermedad de Crohn (aislados 95, 419, 615 y las cepas LF82 y del tipo AIEC) demostraron ser sensibles a las colicinas E1, E3, E9 y D en ensayos aleatorios, donde la colicina purificada se aplicó puntualmente sobre un césped de células.

10 En resumen, se añadieron 25 µl de cultivo bacteriano de fase logarítmica ($OD_{600}=0,6$) a 5 ml de agarosa fundida al 0,8 % y se vertió sobre la parte superior de una placa de agar LB. Se aplicó puntualmente una gota de 2 µl de cada colicina (0,2 mg/ml) sobre la placa de recubrimiento. Las placas se incubaron durante 18 h y se examinaron las zonas de inhibición. Todos los aislados de *E. coli* analizados fueron sensibles a la actividad citotóxica de las cuatro
15 proteínas de colicina, tal y como se indicó por la presencia de zonas limpias que representaban la destrucción de las células (no se muestra).

Ejemplo 2

20 Actividad de una cepa productora de colicina E1 frente a biopelículas de AIEC

El estado clínicamente relevante de AI *E. coli* en la mucosa intestinal infectada es el estado de la biopelícula en la que las bacterias muestran la tolerancia mejorada a los antibióticos. Por lo tanto, se analizó la capacidad de las colicinas para destruir la AI *E. coli* en el estado de biopelícula utilizando un ensayo de fisiología y genética MBEC
25 (*Physiology and Genetics Assay*) (Innovotech). En este ensayo, el cultivo de la biopelícula se produce sobre 96 PEGS idénticos que sobresalen de la tapa de una placa de 96 micropocillos. La formación de la biopelícula se demostró utilizando microscopía electrónica (no se muestra).

Para determinar la citotoxicidad de las colicinas frente a las películas de LF82 se comparó el porcentaje de supervivencia celular de AIEC en las biopelículas tratadas con colicinas con las expuestas a antibióticos que habitualmente se prescriben para el tratamiento de la enfermedad de Crohn (figura 1). Las biopelículas se formaron sobre la plataforma de placa de 96 pocillos con PEG MBEC™ durante 24 h, y después se expusieron durante 1 h a diluciones de 150 µl de los antibióticos (ampicilina, ciprofloxacina, metronidazol y rifaximina) y colicinas (E1, E3, E9 y D) en PBS estéril, en el intervalo de concentración 0,002 µg/ml-200 µg/ml. Todas las diluciones de antimicrobianos
30 se realizaron tres veces y las biopelículas control sin antimicrobianos se trataron con 150 µl de PBS estéril. Después de este tratamiento, se analizó la viabilidad de las células asociadas a la biopelícula utilizando el tinte metabólico XTT. La sal XTT cambia de color cuando se metaboliza por células viables. Este cambio de color puede compararse con las biopelículas sin tratar y sin antimicrobianos, indicando el porcentaje de supervivencia en las biopelículas expuestas a los antimicrobianos.

40 Se analizó también la capacidad de las colicinas E1 (una colicina formadora de poros), E3 (una RNasa ribosómica), E9 (una DNasa), D (una RNasa de transferencia) e la (una colicina formadora de poros) para destruir 6 cepas adicionales de AIEC en el estado de biopelícula. Todas mostraron una buena actividad de destrucción contra las múltiples cepas. Las colicinas E1 (una colicina despolarizante de membrana) y E9 (una colicina DNasa), fueron las más eficaces al destruir la AIEC en el estado de biopelícula. Para todos los aislados, las colicinas E1 y E9 mostraron una actividad antimicrobiana superior contra las células asociadas a la biopelícula que los antibióticos ampicilina, metronidazol y rifaximina.

Ejemplo 3

50 Actividad de una cepa productora de colicina E1 contra biopelículas de AIEC

Se contempla que las colicinas podrían suministrarse en forma de una cepa bacteriana productora de colicina. Para determinar si la adición de una cepa de *E. coli* productora de colicina a LF82 dio como resultado la destrucción de las bacterias asociadas a una biopelícula se añadió K-12 W3110 de *E. coli* que portaba el plásmido pColE1-K53 de la colicina E1 a biopelículas de LF82 de 24 horas.

Las biopelículas de la cepa LF82 se formaron durante 24 h en la plataforma de placa de 96 pocillos con PEG MBEC™. Se cultivó también un cultivo de W3110 pColE1-K53 con un volumen de 150 µl en los pocillos de una placa de parte inferior plana de 96 pocillos en caldo LB suplementado con una concentración subinhibitoria del antibiótico ciprofloxacina (0,001 µg/ml). La ciprofloxacina induce la producción de colicina a través de la activación de la respuesta SOS al daño de ADN. El antibiótico induce la expresión de la proteína de colicina E1 en esta cepa K12 de *E. coli*. Las películas de LF82 de 24 h se expusieron a la cepa W3110 pColE1-K53 durante 1, 2, 4, 6 y 24 h. Los PEG con las biopelículas de LF82 tratadas se retiraron entonces de la placa, colocándolos en 1 ml de PBS estéril, sometidos a ultrasonidos y mezclándolos bien para eliminar las bacterias de la superficie. Los expuestos se sembraron sobre una placa de agar LB que contenía 50 µg/ml de ampicilina para seleccionar las colonias de LF82
60
65

resistentes a la ampicina. Las placas se incubaron durante 18 h y las colonias se contaron para determinar la supervivencia de las células asociadas a la biopelícula de LF82 después del tratamiento con la cepa K-12 productora de la colicina E1. Como control, las biopelículas de LF82 también se expusieron a la cepa K-12 W3110 no productora de colicina para garantizar que la presencia de la cepa K-12 no afectaba a la viabilidad de las células de LF82.

La adición de la cepa productora de colicina W3110 pColE1-K53 redujo considerablemente la supervivencia de la LF82, mientras que la adición de W3110 carente del plásmido de la colicina E1 no tuvo ningún efecto en la supervivencia de la cepa de *Al E. coli* (figura 2).

Ejemplo 4

Actividad de las colicinas E1 y E9 en un modelo de macrófago de infección por AIEC

La *Al E. coli* es capaz de infectar y multiplicarse en los macrófagos y células epiteliales. Para determinar si la colicina E1 es capaz de destruir las bacterias intracelulares, se infectaron macrófagos RAW de murino (J774) con LF82 de *Al E. coli* y se trataron con colicina E1 (figura 3).

Los macrófagos RAW de murino (J774) se cultivaron en placas de cultivo de tejido de 24 pocillos en medios de cultivo de tejido RPMI (que contenían suero fetal de ternero al 3 %, L-glutamato al 1 %, pen/strep al 1 %) a 37 °C en CO₂ al 5 % hasta que las células alcanzaron el 70-80 % de confluencia. Los macrófagos se infectaron entonces con LF82 de *E. coli* a una multiplicidad de infección de 50 (MOI 50). Después de 2 h de infección, los macrófagos se expusieron al antibiótico gentamicina (100 µg/ml) para destruir, fuera de los macrófagos, cualquier bacteria que no hubiera invadido con éxito la célula. Los macrófagos infectados con LF82 se trataron entonces con colicina E1 (10; 0,1; 0,001 µg/ml) durante 3 h a 37 °C. Los macrófagos se rasparon entonces de la superficie de la placa, se lisaron con Triton X y las bacterias intracelulares se sembraron en placas de agar LB que contenían 50 µg/ml de ampicina para la selección de LF82. Las placas se incubaron toda la noche a 37 °C y se realizó el recuento de las colonias. El tratamiento con colicina E1 (10 µg/ml) dio como resultado aproximadamente una reducción del 80 % en el número de bacterias recuperadas de los macrófagos, demostrando que esta colicina puede destruir las bacterias intracelulares.

También se analizó la capacidad de la colicina E9 y una variante de la colicina E9 catalíticamente inactiva (colicina E9 H575A) de destruir la LF82 de *E. coli* intracelular en los macrófagos infectados. Los experimentos se realizaron tal y como se describe con la colicina E1, exceptuando que los macrófagos infectados se trataron con colicina durante 4 y 24 horas. Como con la colicina E1, la colicina E9 de tipo salvaje fue capaz de destruir la LF82 intracelular, pero con los macrófagos infectados tratados con la colicina E9 H575A mutante catalíticamente inactiva no se observó destrucción de las bacterias intracelulares. Véase la figura 4. Estos datos indican que la destrucción es una consecuencia directa de la actividad citotóxica de la colicina y no de la activación de las rutas de destrucción de las células hospedadoras (macrófagos).

La microscopía de fluorescencia se utilizó para visualizar los macrófagos infectados tratados con colicina E9 marcados con proteína fluorescente roja. Estos estudios muestran claramente la internalización de la colicina E9 en los macrófagos, reforzando además el hallazgo de que las colicinas son capaces de entrar en los macrófagos y actuar sobre las bacterias intracelulares. (No se muestran los datos).

EQUIVALENTES

La memoria descriptiva anteriormente redactada se considera suficiente para posibilitar que un experto en la materia lleve a la práctica la invención. La presente invención no limita su alcance a los ejemplos proporcionados, pues los ejemplos están destinados a ser únicamente ilustraciones de un aspecto de la invención. Así, otras realizaciones funcionalmente equivalentes se encuentran dentro del alcance de la invención. Gracias a la descripción anterior, para los expertos en la materia serán evidentes varias modificaciones de la invención, más allá de las mostradas y descritas en el presente documento, y que se encontrarán dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas. Las ventajas y objetivos de la invención no están comprendidos necesariamente en cada realización de la invención.

Referencias

1. Loftus SR, Walker D, Mate MJ, Bonsor DA, James R, Moore GR, Kleanthous C. *Competitive recruitment of the periplasmic translocation portal TolB by a natively disordered domain of colicin E9*. Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 103(33): 12353-82006 (2006)
2. Walker D, Mosbahi K, Vankemmelbeke M, James R, Kleanthous C. *The role of electrostatics in colicin nuclease domain translocation into bacterial cells*. J. Biol. Chem., 282(43):31389-97 (2007).
3. Housden NG, Loftus SR, Moore GR, James R, Kleanthous C. *Cell entry mechanism of enzymatic bacterial colicins: porin recruitment and the thermodynamics of receptor binding*. Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 27;102(39):13849-54 (2005).
4. Boudeau J, Glasser AL, Masseret E, Joly B, Darfeuille-Michaud A. *Invasive ability of an Escherichia coli strain*

isolated from the ileal mucosa of a patient with Crohn's disease. Infect. Immun., 67(9):4499-509 (1999).

5. Carvalho FA, Barnich N, Sauvanet P, Darcha C, Gelot A, Darfeuille-Michaud A. *Crohn's disease-associated Escherichia coli LF82 aggravates colitis in injured mouse colon via signaling by flagellin.* Inflamm. Bowel. Dis., 14(8): 1051-60 (2008).

6. Carvalho FA, Barnich N, Sivignon A, Darcha C, Chan CH, Stanners CP, Darfeuille-Michaud A. *Crohn's disease adherent-invasive Escherichia coli colonize and induce strong gut inflammation in transgenic mice expressing human CEACAM.* J. Exp. Med., 206(10):2179-89 (2009).

7. Miquel S, Peyretailade E, Claret L, de Vallee A, Dossat C, Vacherie B, Zineb el H, Segurens B, Barbe V, Sauvanet P, Neut C, Colombel JF, Medigue C, Mojica FJ, Peyret P, Bonnet R, Darfeuille-Michaud A. *Complete genome sequence of Crohn's disease-associated adherent-invasive E. coli strain LF82.* PLoS One., 5(9). pii: e12714 (2010).

8. Martínez-Medina M, Naves P, Blanco J, Aldeguer X, Blanco JE, Blanco M, Ponte C, Soriano F, Darfeuille-Michaud A, García-Gil LJ. *Biofilm formation as a novel phenotypic feature of adherent-invasive Escherichia coli (AIEC).* BMC Microbiol., 9:202 (2009).

9. Glasser AL, Boudeau J, Barnich N, Perruchot MH, Colombel JF, Darfeuille-Michaud A. *Adherent invasive Escherichia coli strains from patients with Crohn's disease survive and replicate within macrophages without inducing host cell death.* Infect. Immun., 69 (9):5529-37 (2001).

10. Prantera C, Scribano ML. *Antibiotics and probiotics in inflammatory bowel disease: why, when, and how.* Curr. Opin. Gastroenterol., 25(4): 329-33 (2009).

11. Rolfe VE, Fortun PJ, Hawkey CJ, Bath-Hextall F. *Probiotics for maintenance of remission in Crohn's disease.* Cochrane Database Syst. Rev., (4):CD004826 (2006).

12. Martínez-Medina M, Mora A, Blanco M, López C, Alonso MP, Bonacorsi S, Nicolas-Chanoine MH, Darfeuille-Michaud A, García-Gil J, Blanco J. *Similarity and divergence among adherent-invasive Escherichia coli and extraintestinal pathogenic E. coli strains.* J. Clin. Microbiol., 47(12):3968-79 (2009).

13. Barrett JC, Hansoul S, Nicolae DL, Cho JH, Duerr RH, Rioux JD, Brant SR, Silverberg MS, Taylor KD, Barmada MM, Bitton A, Dassopoulos T, Datta LW, Green T, Griffiths AM, Kistner EO, Murtha MT, Regueiro MD, Rotter JI, Schumm LP, Steinhardt AH, Targan SR, Xavier RJ; NIDDK IBD Genetics Consortium, Libioulle C, Sandor C, Lathrop M, Belaiche J, Dewit O, Gut I, Heath S, Laukens D, Mni M, Rutgeerts P, Van Gossum A, Zelenika D, Franchimont D, Hugot JP, de Vos M, Vermeire S, Louis E; Belgian-French IBD Consortium; Wellcome Trust Case Control Consortium, Cardon LR, Anderson CA, Drummond H, Nimmo E, Ahmad T, Prescott NJ, Onnie CM, Fisher SA, Marchini J, Ghorri J, Bumpstead S, Gwilliam R, Tremelling M, Deloukas P, Mansfield J, Jewell D, Satsangi J, Mathew CG, Parkes M, Georges M, Daly MJ. *Genome-wide association defines more than 30 distinct susceptibility loci for Crohn's disease.* Nat. Genet. 40(8):955-62 (2008).

14. Cascales E, Buchanan SK, Duche D, Kleanthous C, Lloubes R, Postle K, Riley M, Slatin S, Cavard D. *Colicin biology.* Microbiol. Mol. Biol. Rev., 71(1):158-229 (2007).

15. Papadakos G, Wojdyla JA, Kleanthous C. *Nuclease colicins and their immunity proteins.* Q. Rev. Biophys., 45(1):57-103 (2012).

16. Esseku F, Adeyeye MC. *Bacteria and pH-sensitive polysaccharide-polymer films for colon targeted delivery.* Crit. Rev. Ther. Drug. Carrier Syst., 28(5):395-445 (2011).

17. Van den Mooter G. *Colon drug delivery.* Expert. Opin. Drug Deliv., 3(1):111-25 (2006).

REIVINDICACIONES

1. Un agente terapéutico para su uso en un método para tratar la enfermedad de Crohn, en donde el agente terapéutico es:

- i) una colicina;
- ii) una bacteria que produce y libera una colicina;
- iii) un producto alimenticio que comprende una bacteria que produce y libera una colicina; o
- iv) un polinucleótido que codifica una colicina.

2. Una composición farmacéutica para su uso en un método para tratar la enfermedad de Crohn, que comprende una cantidad farmacéuticamente eficaz de un agente terapéutico que es:

- i) una colicina;
- ii) una bacteria que produce y libera una colicina; o
- iii) un polinucleótido que codifica una colicina;

y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

3. El agente terapéutico o la composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde el método comprende el tratamiento de una infección por *Escherichia coli* adherente-invasiva (AIEC).

4. El agente terapéutico o la composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el método comprende el tratamiento de una infección por AIEC asociada a una biopelícula.

5. El agente terapéutico o la composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 3 o la reivindicación 4, en donde que el método comprende el tratamiento de una infección intracelular por AIEC.

6. El agente terapéutico o la composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el método para tratar la enfermedad de Crohn es un método profiláctico para prevenir la enfermedad de Crohn en un sujeto del que se ha determinado que presenta predisposición genética a la enfermedad de Crohn.

7. Un agente terapéutico para su uso en un método para tratar una infección por AIEC, en donde el agente terapéutico es:

- i) una colicina;
- ii) una bacteria que produce y libera una colicina;
- iii) un producto alimenticio que comprende una bacteria que produce y libera colicina; o
- iv) un polinucleótido que codifica una colicina.

8. Una composición farmacéutica para su uso en un método para tratar una infección por AIEC, que comprende una cantidad farmacéuticamente eficaz de un agente terapéutico que es:

- i) una colicina;
- ii) una bacteria que produce y libera una colicina; o
- iii) un polinucleótido que codifica una colicina;

y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

9. El agente terapéutico o la composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 7 o la reivindicación 8, en donde que la AIEC de la infección está asociada a una biopelícula.

10. El agente terapéutico o la composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, en donde la AIEC de la infección es intracelular.

11. El agente terapéutico o la composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 10, en donde la AIEC intracelular está en macrófagos.

12. El agente terapéutico o la composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el método es un método para tratar a un humano.

13. El agente terapéutico o la composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el agente terapéutico es una bacteria que produce y libera una colicina y que es una bacteria *E. coli* o *Lactococcus lactis*.

14. El agente terapéutico o la composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 en donde el agente terapéutico es un plásmido, que opcionalmente codifica además una proteína de inmunidad y/o una proteína liberadora de colicina.
- 5 15. El agente terapéutico o la composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la colicina es una colicina del grupo A.
16. El agente terapéutico o la composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la colicina:
- 10 i) se une a un receptor de superficie de *E. coli* seleccionado de BtuB, FepA y Cir;
ii) es una colicina despolarizante de membrana o formadora de poros, tal como colicina E1 o colicina IA; o
iii) es una nucleasa, tal como
- 15 a) una DNasa, por ejemplo, colicina E9.
b) una RNasa, por ejemplo, colicina E3.
c) una RNasa de transferencia, por ejemplo, colicina D.
17. Un método *in vitro* para destruir la AIEC, comprendiendo el método que la AIEC haga contacto con una cantidad eficaz de una colicina o de una bacteria que produce una colicina.
- 20

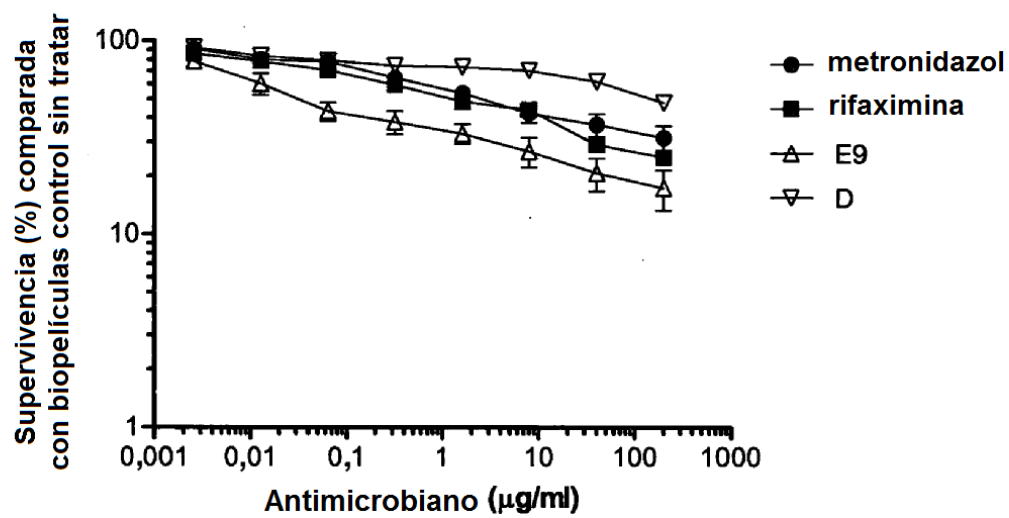
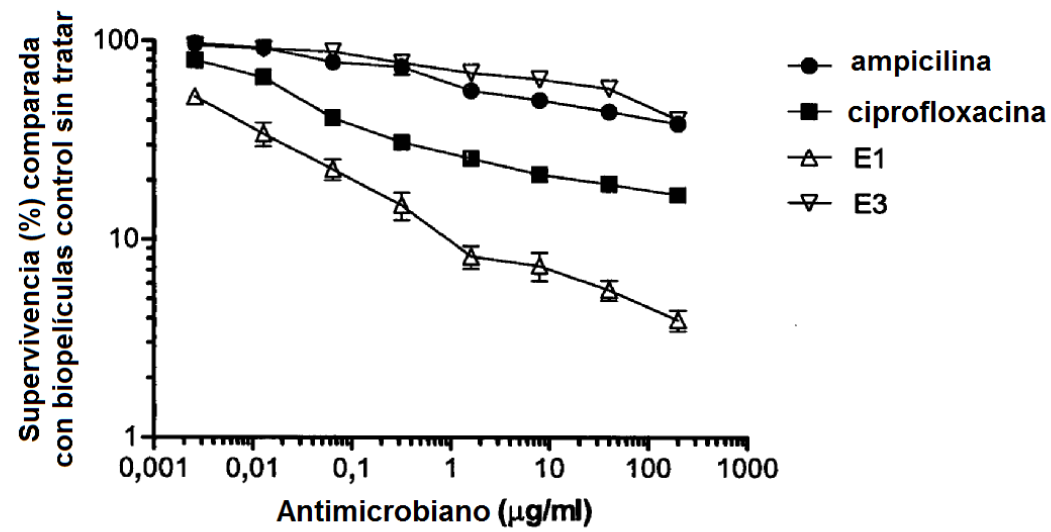


Fig. 1

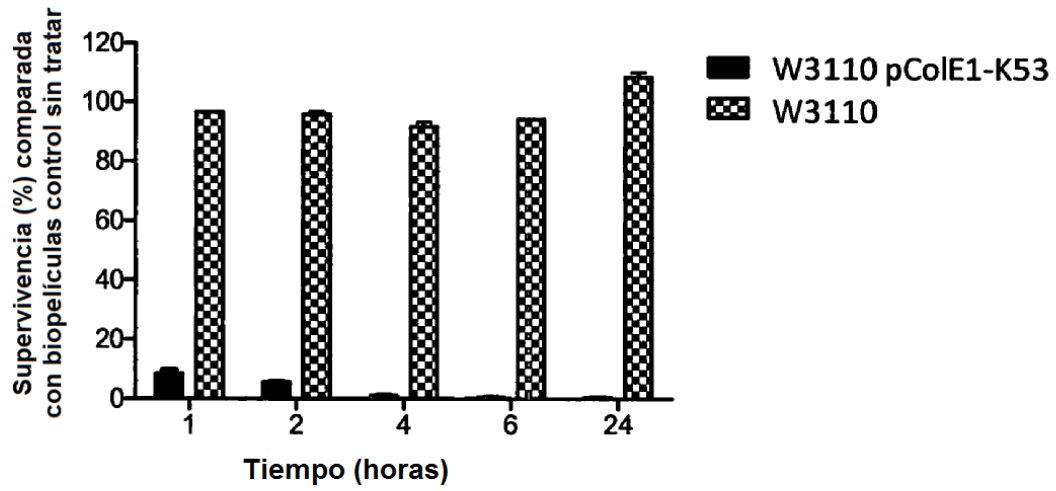


Fig. 2

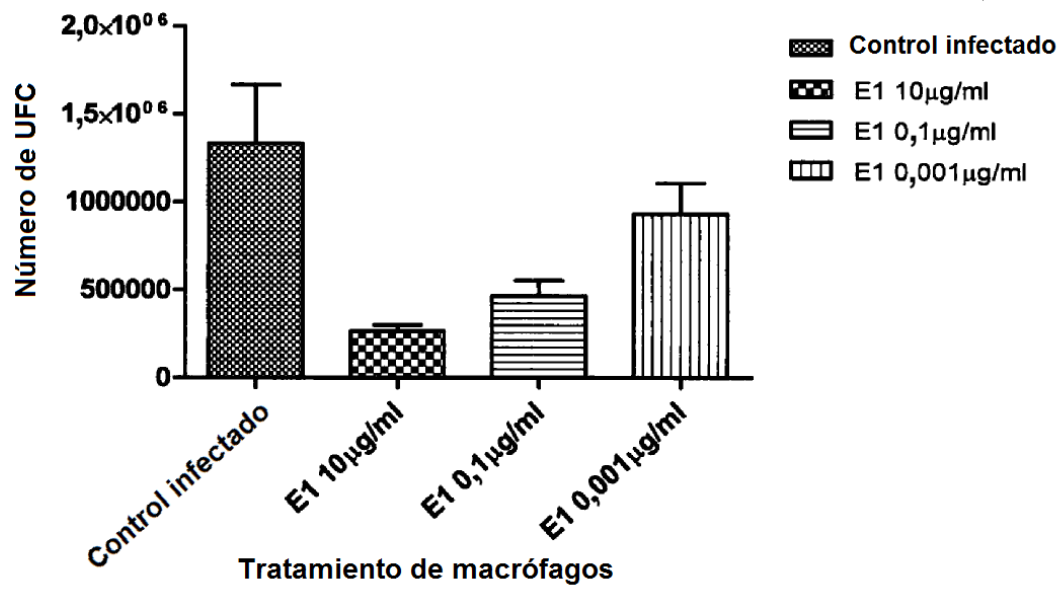


Fig. 3

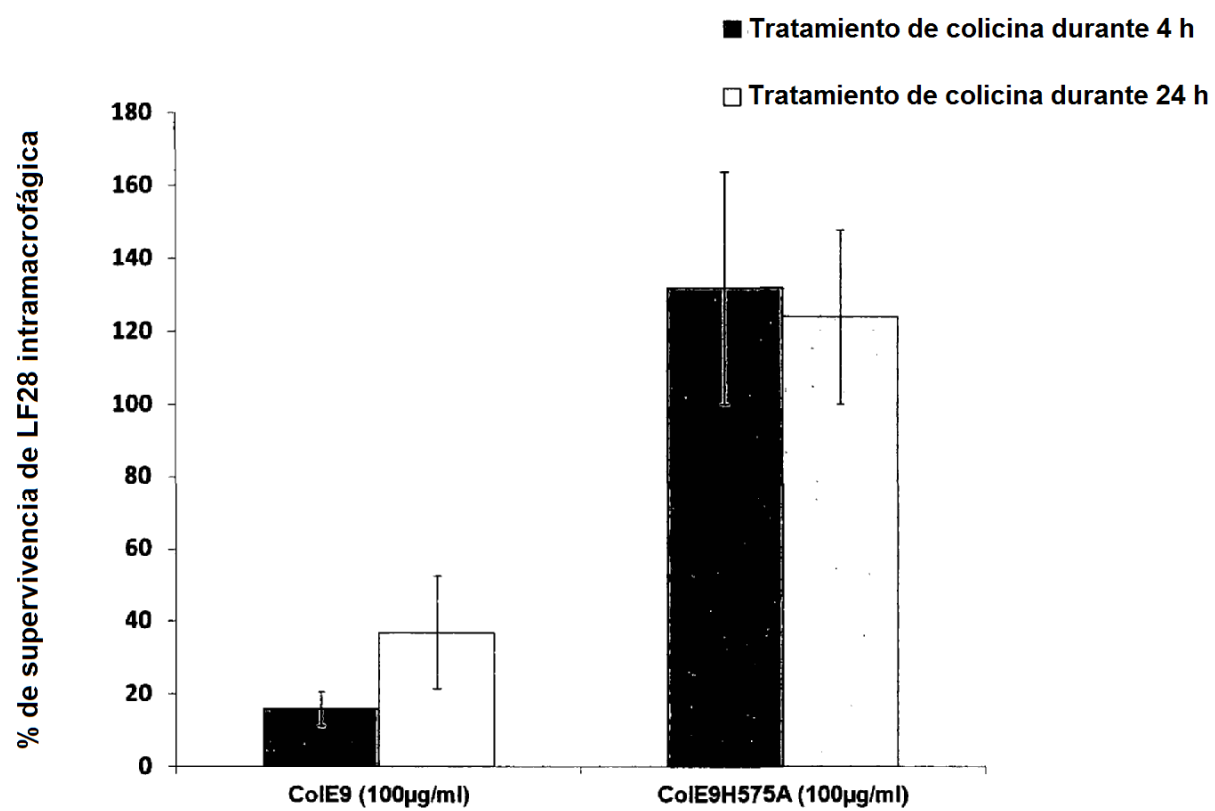


Fig. 4