

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 740 124**

51 Int. Cl.:

A61K 35/76 (2015.01)

A61K 9/00 (2006.01)

A61P 1/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.04.2014 PCT/EP2014/058840**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.11.2014 WO14177622**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.04.2014 E 14724663 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.06.2019 EP 2991633**

54 Título: **Terapia de bacteriófagos**

30 Prioridad:

30.04.2013 EP 13305568

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

05.02.2020

73 Titular/es:

**FERRING BV (50.0%)
Polaris Avenue 144
2132 JX Hoofddorp, NL y
INSTITUT PASTEUR (50.0%)**

72 Inventor/es:

**DANGLAS, PASCAL y
DEBARBIEUX, LAURENT**

74 Agente/Representante:

MARTÍN BADAJOZ, Irene

ES 2 740 124 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

Terapia de bacteriófagos

5 **Campo de la invención**

La presente invención se encuentra en el campo de la terapia de bacteriófagos para su uso en el tratamiento de enfermedades inflamatorias intestinales.

10 **Antecedentes**

Los bacteriófagos son virus que infectan bacterias mediante interacción específica.

15 La enfermedad de Crohn (EC), también conocida como enteritis regional, es una enfermedad inflamatoria de los intestinos que puede afectar a cualquier parte del tubo digestivo desde la boca hasta el ano, provocando una amplia variedad de síntomas. Provoca principalmente dolor abdominal, diarrea, vómitos o pérdida de peso, pero también puede provocar complicaciones fuera del tubo digestivo tales como erupciones cutáneas, artritis, inflamación de los ojos, cansancio y falta de concentración.

20 Aunque todavía se desconoce la causa exacta de EC, una combinación de factores ambientales y predisposición genética parece provocar la enfermedad. Se cree que EC es una enfermedad autoinmunitaria, en la que el sistema inmunitario del organismo ataca al tubo digestivo, provocando inflamación; se clasifica como un tipo de enfermedad inflamatoria intestinal (EII).

25 En pacientes con EC, se observa expresión anómala de la molécula de adhesión celular relacionada con el antígeno carcinoembrionario 6 (CEACAM6) en la superficie apical del epitelio ileal y las lesiones ileales de EC se colonizan por *Escherichia coli* adherente-invasiva patógena (AIEC).

30 No existe cura farmacéutica o quirúrgica conocida para la enfermedad de Crohn. En particular, ni EII en general ni EC en particular pueden tratarse con antibióticos (que se dirigen a combatir *E. coli* patógena). Las opciones de tratamiento se limitan a controlar los síntomas, mantener la remisión y prevenir recaídas.

35 Dogan *et al.*, Inflammatory Bowel Diseases (enero de 2013), vol. 19, n.º 1, págs. 141-150 es un estudio científico que examina el tratamiento de la enfermedad de Crohn con antibióticos eficaces contra *E. coli*.

Sumario de la invención

40 La presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende: (i) al menos una cepa de bacteriófagos capaz de producir una infección lítica en una cepa de *Escherichia coli* adherente-invasiva; y (ii) un portador farmacéuticamente aceptable; para el tratamiento de enfermedad inflamatoria intestinal (EII).

45 La presente divulgación proporciona además un método de tratamiento de enfermedad inflamatoria intestinal que comprende administrar a un sujeto que lo necesita al menos una cepa de bacteriófagos capaz de producir una infección lítica en una cepa de *Escherichia coli* adherente-invasiva tratando de ese modo al sujeto.

50 La presente invención proporciona además una cepa de bacteriófagos P1 depositada en la Colección Nacional Francesa de Microorganismos en el Instituto Pasteur bajo el número de registro CNCM I-4694 o una variante de la misma, en la que la variante tiene la misma actividad lítica y las mismas características fenotípicas que dicha cepa de bacteriófagos.

55 La presente invención proporciona además una cepa de bacteriófagos P2 depositada en la Colección Nacional Francesa de Microorganismos en el Instituto Pasteur bajo el número de registro CNCM I-4695 o una variante de la misma, en la que la variante tiene la misma actividad lítica y las mismas características fenotípicas que dicha cepa de bacteriófagos.

60 La presente invención proporciona además una cepa de bacteriófagos P3 depositada en la Colección Nacional Francesa de Microorganismos en el Instituto Pasteur bajo el número de registro CNCM I-4696 o una variante de la misma, en la que la variante tiene la misma actividad lítica y las mismas características fenotípicas que dicha cepa de bacteriófagos.

65 La presente invención proporciona además una cepa de bacteriófagos P4 depositada en la Colección Nacional Francesa de Microorganismos en el Instituto Pasteur bajo el número de registro CNCM I-4697 o una variante de la misma, en la que la variante tiene la misma actividad lítica y las mismas características fenotípicas que dicha cepa de bacteriófagos.

La presente invención proporciona además una cepa de bacteriófagos P5 depositada en la Colección Nacional

Francesa de Microorganismos en el Instituto Pasteur bajo el número de registro CNCM I-4698 o una variante de la misma, en la que la variante tiene la misma actividad lítica y las mismas características fenotípicas que dicha cepa de bacteriófagos.

5 La presente invención proporciona además una cepa de bacteriófagos P6 depositada en la Colección Nacional Francesa de Microorganismos en el Instituto Pasteur bajo el número de registro CNCM I-4699 o una variante de la misma, en la que la variante tiene la misma actividad lítica y las mismas características fenotípicas que dicha cepa de bacteriófagos.

10 La presente invención proporciona además una cepa de bacteriófagos P8 depositada en la Colección Nacional Francesa de Microorganismos en el Instituto Pasteur bajo el número de registro CNCM I-4700 o una variante de la misma, en la que la variante tiene la misma actividad lítica y las mismas características fenotípicas que dicha cepa de bacteriófagos.

15 La presente invención también usa una cepa de bacteriófagos CLB_P2 depositada en la Colección Nacional Francesa de Microorganismos en el Instituto Pasteur bajo el número de registro CNCM I-4675 o una variante de la misma, en la que la variante tiene la misma actividad lítica y las mismas características fenotípicas que dicha cepa de bacteriófagos.

20 Para el propósito de la presente invención, una variante de una cepa de bacteriófagos se considera que tiene la misma actividad lítica que dicha cepa de bacteriófagos si actúa al menos “+” contra al menos una de las cepas de AIEC LF82, 07081, 07082, 07076 y 06075 en el “ensayo *in vitro* de la infectividad de bacteriófagos en cepas de AIEC” descrito en el ejemplo 3 a continuación. En una realización preferida, una variante se considera que tiene la misma actividad lítica si actúa al menos “+” contra las cinco cepas de AIEC LF 82, LF 06075, LF 07076, LF 07081 y LF 07082 (las cepas de AIEC LF 06075, LF 07076, LF 07081 y LF 07082 también se abrevian en el presente documento como 06075, 07076, 07081 y 07082, respectivamente). Estas cepas de AIEC las ha depositado la Université Lille 2 - Droit et Santé, 42 Rue Paul Duez, 59000 Lille (Francia) en la Colección Nacional Francesa en el Instituto Pasteur bajo los números de registro CNCM I-4712 (LF 82), CNCM I-4713 (LF 06075), CNCM I-4714 (LF 07076), CNCM I-4715 (LF 07081) y CNCM I-4716 (LF 07082).

30 Para el propósito de la presente invención, una variante de una de las cepas de bacteriófagos P1 a P6, P8 y CLB_P2 se considera que tiene las mismas características fenotípicas que dicha cepa de bacteriófagos si tiene al menos una identidad de secuencia del 80% en al menos el 70% de la longitud, preferiblemente al menos una identidad de secuencia del 90% en al menos el 80% de la longitud y más preferiblemente identidad de secuencia completa en al menos el 90% de la longitud (tal como se determina mediante el algoritmo BLAST) con la proteína de cápside principal de bacteriófago wV8 (para las variantes de P1 a P6) o bacteriófago RB69 (para las variantes de P8) o bacteriófago JS98 (para las variantes de CLB_P2), tal como se describe a continuación en la sección “Identificación de proteínas de la cápside principales”.

40 En una realización adicional de la presente divulgación, una variante de un bacteriófago tiene la misma actividad lítica que el bacteriófago. En una realización de la presente invención, una variante de un bacteriófago tiene la misma actividad lítica y las mismas características fenotípicas que el bacteriófago.

Descripción detallada de la invención

45 La presente invención es tal como se define en las reivindicaciones adjuntas. La presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende: (i) al menos una cepa de bacteriófagos capaz de producir una infección lítica en una cepa de *Escherichia coli* adherente-invasiva; y (ii) un portador farmacéuticamente aceptable; para el tratamiento de una enfermedad inflamatoria intestinal.

50 La presente divulgación proporciona además un método de tratamiento de enfermedad inflamatoria intestinal que comprende administrar a un sujeto que lo necesita al menos una cepa de bacteriófagos capaz de producir una infección lítica en una cepa de *Escherichia coli* adherente-invasiva tratando de ese modo al sujeto.

55 Una “cepa de *Escherichia coli* adherente-invasiva (AIEC)” tal como se usa en el presente documento debe entenderse que hace referencia a una cepa de *E. coli* que tiene un potencial de invasión medio igual a o mayor del 0,1% en un cultivo celular de la línea de células intestinales I-407. En otras palabras, una cepa de AIEC tiene la capacidad de invadir un cultivo de células intestinales de I-407 con un índice de invasión igual o superior al 0,1% del inóculo original (tomado como el 100%), cuando se somete a prueba según el ensayo de invasión descrito a continuación en la sección “Ensayo de invasión” (véase también Darfeuille-Michaud *et al.* (2004), *Gastroenterology* 127:412-421).

60 Ejemplos no limitativos de cepas de AIEC son LF82, LF82SK (depositadas por la Université d’Auvergne, 49 Boulevard François Mitterand, 63001 Clermont-Ferrand (Francia) en la Colección Nacional Francesa en el Instituto Pasteur bajo el número de registro CNCM I-4723), aquellos indicados en la tabla 1 a continuación en el presente documento y aquellos indicados en la siguiente lista de elementos (véase Darfeuille-Michaud *et al.* (2004),

ES 2 740 124 T3

Gastroenterology 127:412-421, especialmente la página 417, tabla 2): LF31, LF71, LF123, LF138, LF9, LF15, LF28, LF50, LF65, LF119, LF128, LF130, LF73, LF100, LF110, LF134, LF105, LF49-2, LB11 y LF45-2, En una realización, la cepa de *Escherichia coli* adherente-invasiva es LF82, 07081, 07082, 07076 ó 06075, en particular LF82,

- 5 En una realización, la cepa de *Escherichia coli* adherente-invasiva está presente en el colon del sujeto. En otra realización, la cepa de *Escherichia coli* adherente-invasiva está presente en el íleo del sujeto. En aún otra realización, la cepa de *Escherichia coli* adherente-invasiva está presente en una o más partes del intestino (delgado y/o grueso) del sujeto.
- 10 En una realización, la al menos una cepa de bacteriófagos es P1 depositada en la Colección Nacional Francesa de Microorganismos en el Instituto Pasteur bajo el número de registro CNCM I-4694 o una variante de la misma, en la que la variante tiene la misma actividad lítica y las mismas características fenotípicas que dicha cepa de bacteriófagos.
- 15 En una realización, la al menos una cepa de bacteriófagos es P2 depositada en la Colección Nacional Francesa de Microorganismos en el Instituto Pasteur bajo el número de registro CNCM I-4695 o una variante de la misma, en la que la variante tiene la misma actividad lítica y las mismas características fenotípicas que dicha cepa de bacteriófagos.
- 20 En una realización, la al menos una cepa de bacteriófagos es P3 depositada en la Colección Nacional Francesa de Microorganismos en el Instituto Pasteur bajo el número de registro CNCM I-4696 o una variante de la misma, en la que la variante tiene la misma actividad lítica y las mismas características fenotípicas que dicha cepa de bacteriófagos.
- 25 En una realización, la al menos una cepa de bacteriófagos es P4 depositada en la Colección Nacional Francesa de Microorganismos en el Instituto Pasteur bajo el número de registro CNCM I-4697 o una variante de la misma, en la que la variante tiene la misma actividad lítica y las mismas características fenotípicas que dicha cepa de bacteriófagos.
- 30 En una realización, la al menos una cepa de bacteriófagos es P5 depositada en la Colección Nacional Francesa de Microorganismos en el Instituto Pasteur bajo el número de registro CNCM I-4698 o una variante de la misma, en la que la variante tiene la misma actividad lítica y las mismas características fenotípicas que dicha cepa de bacteriófagos.
- 35 En una realización, la al menos una cepa de bacteriófagos es P6 depositada en la Colección Nacional Francesa de Microorganismos en el Instituto Pasteur bajo el número de registro CNCM I-4699 o una variante de la misma, en la que la variante tiene la misma actividad lítica y las mismas características fenotípicas que dicha cepa de bacteriófagos.
- 40 En una realización, la al menos una cepa de bacteriófagos es P8 depositada en la Colección Nacional Francesa de Microorganismos en el Instituto Pasteur bajo el número de registro CNCM I-4700 o una variante de la misma, en la que la variante tiene la misma actividad lítica y las mismas características fenotípicas que dicha cepa de bacteriófagos.
- 45 En una realización, la al menos una cepa de bacteriófagos es CLB_P2 depositada en la Colección Nacional Francesa de Microorganismos en el Instituto Pasteur bajo el número de registro CNCM I-4675 o una variante de la misma, en la que la variante tiene la misma actividad lítica y las mismas características fenotípicas que dicha cepa de bacteriófagos.
- 50 En un aspecto, se prevé que la composición farmacéutica comprenda más de una cepa de bacteriófagos, también denominado "un cóctel de bacteriófagos". El cóctel de bacteriófagos de la presente invención comprende cualquier combinación de dos o más de P1, P2, P3, P4, P5, P6, P8 y CLB_P2 y variantes de las mismas que tienen la misma actividad lítica y las mismas características fenotípicas. Preferiblemente, los bacteriófagos en un cóctel de bacteriófagos destinado para el tratamiento de un sujeto específico o grupo de sujetos se seleccionarán basándose en la cepa de AIEC o cepas de AIEC identificadas y seleccionadas para el combate.
- 55

Ejemplos no limitativos de enfermedades inflamatorias intestinales son enfermedad de Crohn (EC), colitis ulcerosa (CU), enfermedad inflamatoria intestinal crónica (EII crónica) tal como pero sin limitarse a colitis microscópica, enfermedad celíaca y vasculitis. En una realización, la EII es EC o CU. En otra realización, la enfermedad inflamatoria intestinal es la recidiva de lesiones ileales después de la cirugía (tal como cirugía para la extirpación de al menos una parte del intestino delgado en un paciente con EC). La recidiva puede medirse mediante el índice de Rutgeerts.

- 60
- 65 En una realización, la EII no está provocada por una infección bacteriana. Esta realización se basa en la observación de que EII es una enfermedad autoinmunitaria que no se considera generalmente una enfermedad bacteriana. En cambio, una infección bacteriana puede ser concomitante con la EII, pero no es necesariamente el agente causal.

Esta observación se suma al sorprendente hallazgo de la presente invención, concretamente el aplicar la terapia de bacteriófagos para el tratamiento de una enfermedad que no está provocada por bacterias.

5 Por ese motivo, puede haber, como ejemplo, cepas de AIEC en familiares de sujetos que padecen una EII, aunque estos familiares no padecen esta enfermedad. Asimismo, también pueden encontrarse cepas de AIEC en sujetos que no padecen EII ni están emparentados con sujetos que padecen EII, tal como también puede observarse a partir de la tabla 1 a continuación.

10 “Tratar” tal como se usa en el presente documento debe entenderse que abarca una disminución en uno o más síntomas característicos de la enfermedad; una disminución en la tasa de progresión de la enfermedad; recuperación de la enfermedad, cura de la enfermedad, mantenimiento de la remisión y profilaxis tales como prevención de recaídas.

15 Un “sujeto” tal como se usa en el presente documento puede ser un sujeto macho o hembra. Un sujeto puede ser un ser humano o cualquier otro mamífero.

20 La dosis y la pauta de administración de una composición farmacéutica de la invención dependerá necesariamente del efecto terapéutico que ha de lograrse (por ejemplo tratamiento de EII) y puede variar con las cepas de bacteriófagos particulares en la composición, la vía de administración, y la edad y el estado del sujeto individual al que va a administrársele el medicamento.

25 Es probable que una dosificación para humanos contenga una dosis de bacteriófago entre 10^4 y 10^{11} unidades formadoras de placa (ufp). La dosis deseada puede presentarse como una dosis al día o como múltiples subdosis administradas en intervalos apropiados.

En el contexto de la presente invención el término “portador farmacéuticamente aceptable” se refiere a portadores, cargas o diluyentes no tóxicos farmacéuticamente aceptables, que se definen como vehículos comúnmente usados para formular composiciones farmacéuticas para administración a animales o humanos.

30 Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden comprender además agentes auxiliares farmacéuticamente aceptables, y opcionalmente otros agentes terapéuticos. Los agentes auxiliares, también denominados componentes accesorio, abarcan aquellos convencionales en la técnica tales como, pero sin limitarse a agentes formadores de matriz, espesantes, aglutinantes, lubricantes, agentes de ajuste del pH, agentes protectores, potenciadores de la viscosidad, agentes de absorción capilar, disgregantes, incluyendo disgregantes no efervescentes y efervescentes, tensioactivos, antioxidantes, agentes humectantes, colorantes, agentes aromatizantes, agentes enmascaradores del sabor, edulcorantes, conservantes y así sucesivamente. Además de ser farmacéuticamente aceptables, los agentes auxiliares deben ser “aceptables” en el sentido de que son compatibles con los demás componentes de la composición, incluyendo el bacteriófago.

40 Las composiciones farmacéuticas y vías de administración incluyen aquellas adecuadas para o por medio de administración oral (incluyendo bucal, sublingual e intraorbital), rectal, nasal, tópica (incluyendo transdérmica), ocular, ótica, vaginal, bronquial, pulmonar o parenteral (incluyendo subcutánea, intramuscular, intravenosa, intradérmica, intraperitoneal, intrapleural, intravesicular e intratecal) o administración por medio de un implante. La composición farmacéutica o vía de administración puede adaptarse para proporcionar un efecto seleccionado como objetivo de cepa de bacteriófagos de la invención. En una realización específica, una composición farmacéutica de la invención se administra por vía oral. Las composiciones pueden prepararse mediante cualquier método bien conocido en la técnica de farmacia. Tales métodos incluyen la etapa de asociar una cepa de bacteriófagos de la invención con un portador farmacéuticamente aceptable y opcionalmente uno o más agentes auxiliares.

50 Las composiciones farmacéuticas adecuadas para administración oral pueden presentarse como unidades de dosificación separadas (formas de dosificación) tales como pastillas, comprimidos, grageas o cápsulas, o como polvo o gránulos, o como disolución o suspensión. La composición farmacéutica también puede presentarse como bolo o pasta. Las composiciones pueden procesarse adicionalmente para dar un supositorio o enema para administración rectal.

55 Para administración parenteral, las composiciones adecuadas incluyen inyecciones estériles acuosas y no acuosas. Las composiciones pueden presentarse en envases de dosis unitaria o dosis múltiples, por ejemplo ampollas y viales sellados, y pueden almacenarse en un estado secado por congelación (liofilizado) que sólo requiere la adición de portador líquido estéril, por ejemplo agua, antes de su uso.

60 Para administración transdérmica, por ejemplo, pueden contemplarse geles, parches o aerosoles.

65 Las composiciones o formulaciones adecuadas para administración pulmonar, por ejemplo, por inhalación nasal, incluyen brumas o polvos finos que pueden generarse por medio de insufladores, nebulizadores o aerosoles presurizados dosificadores.

La presente divulgación incluye además un kit que comprende una composición farmacéutica de la invención e instrucciones para el uso de la composición para un uso tal como se describió anteriormente en el presente documento, opcionalmente junto con material de acondicionamiento.

- 5 La presente invención proporciona además una cepa de bacteriófagos P1 depositada en la Colección Nacional Francesa de Microorganismos en el Instituto Pasteur bajo el número de registro CNCM I-4694 o una variante de la misma, en la que la variante tiene la misma actividad lítica y las mismas características fenotípicas que dicha cepa de bacteriófagos.
- 10 La presente invención proporciona además una cepa de bacteriófagos P2 depositada en la Colección Nacional Francesa de Microorganismos en el Instituto Pasteur bajo el número de registro CNCM I-4695 o una variante de la misma, en la que la variante tiene la misma actividad lítica y las mismas características fenotípicas que dicha cepa de bacteriófagos.
- 15 La presente invención proporciona además una cepa de bacteriófagos P3 depositada en la Colección Nacional Francesa de Microorganismos en el Instituto Pasteur bajo el número de registro CNCM I-4696 o una variante de la misma, en la que la variante tiene la misma actividad lítica y las mismas características fenotípicas que dicha cepa de bacteriófagos.
- 20 La presente invención proporciona además una cepa de bacteriófagos P4 depositada en la Colección Nacional Francesa de Microorganismos en el Instituto Pasteur bajo el número de registro CNCM I-4697 o una variante de la misma, en la que la variante tiene la misma actividad lítica y las mismas características fenotípicas que dicha cepa de bacteriófagos.
- 25 La presente invención proporciona además una cepa de bacteriófagos P5 depositada en la Colección Nacional Francesa de Microorganismos en el Instituto Pasteur bajo el número de registro CNCM I-4698 o una variante de la misma, en la que la variante tiene la misma actividad lítica y las mismas características fenotípicas que dicha cepa de bacteriófagos.
- 30 La presente invención proporciona además una cepa de bacteriófagos P6 depositada en la Colección Nacional Francesa de Microorganismos en el Instituto Pasteur bajo el número de registro CNCM I-4699 o una variante de la misma, en la que la variante tiene la misma actividad lítica y las mismas características fenotípicas que dicha cepa de bacteriófagos.
- 35 La presente invención proporciona además una cepa de bacteriófagos P8 depositada en la Colección Nacional Francesa de Microorganismos en el Instituto Pasteur bajo el número de registro CNCM I-4700 o una variante de la misma, en la que la variante tiene la misma actividad lítica y las mismas características fenotípicas que dicha cepa de bacteriófagos.

40 **Ejemplos**

La invención se describe adicionalmente en los siguientes ejemplos, que no pretenden en modo alguno limitar el alcance de la invención tal como se reivindica.

45 Métodos

Ensayo de invasión

- 50 Se usó la línea celular Intestine-407 (I-407) derivada de íleo y yeyuno embrionario humano como modelo de células epiteliales intestinales no diferenciadas. Se adquirió de Flow Laboratories (Flow Laboratories Inc., Mc Lean, VA).

- 55 Se sembraron células Intestine-407 en placas de cultivo tisular de 24 pocillos (Polylabo, Estrasburgo, Francia) a una densidad de 4.105 células/pocillo y se incubaron durante 20 horas. Se lavaron las monocapas celulares dos veces con PBS (pH 7,2). Se midió la invasión bacteriana de células epiteliales usando el ensayo de protección con gentamicina (Falcow *et al.* (1987), Rev. Infect. Dis. 9 (supl. 5):S450-455). Se inoculó cada monocapa en 1 ml del medio de cultivo celular que carece de antibióticos con una multiplicidad de infección de 10 bacterias por célula epitelial. Después de un período de incubación de 3 horas a 37°C con el 5% de CO₂, se lavaron las monocapas 3 veces con PBS. Se añadió medio de cultivo celular nuevo que contenía 100 µg/ml de gentamicina (Sigma, St. Louis, MO) durante 1 hora para destruir bacterias extracelulares antes de la lisis de las monocapas con Triton X-100 al 1% (Sigma) en agua desionizada. Esta concentración de Triton X-100 no tuvo efecto sobre la viabilidad bacteriana durante al menos 30 minutos. Se diluyeron las muestras y se sembraron en placas de agar Mueller-Hinton para determinar el número de unidades formadoras de colonias. Se expresaron todos los resultados de la capacidad invasiva de *E. coli* con la línea celular Intestine-407 como porcentaje de bacterias intracelulares en comparación con el inóculo inicial, tomado como el 100%. Se realizaron todos los ensayos al menos 3 veces en experimentos diferenciados.
- 65

Identificación de proteínas de la cápside principales

5 Se obtuvieron proteínas de viriones hirviendo 60 µl de una suspensión de 10¹¹ ufp/ml de cada bacteriófago durante 10 min. Se ejecutaron 20 µl de la suspensión sobre un gel de poliacrilamida al 4-12% prefabricado. Se tiñó el gel con azul de Coomassie y se extrajeron las bandas principales, se sometieron a digestión con tripsina y se analizaron mediante espectrometría de masas en la planta de microsecuenciamiento del Instituto Pasteur.

10 Se compararon las masas peptídicas obtenidas con la información en bases de datos de proteínas, permitiendo la identificación de la proteína conocida más próxima, es decir wV8 para P1 a P6 y RB69 para P8 y JS98 para CLB_P2 (véase A. Villegas *et al*, Virology Journal 2009, 6:41 para la caracterización de wV8 y S. Zuber *et al.*, Journal of Bacteriology 2007, 189:22, 8206 para la caracterización de RB69 y JS 98).

15 Alineación de la proteína de cápside principal de bacteriófago wV8 con péptidos obtenidos a partir de espectrometría de masas de las proteínas de la cápside principales de bacteriófagos P1 a P6:

```
wV8 : MLTNSEKSRFFLADLTGEVQSIPTNTYGYISNLGLFRSAPITQTTFLMDLTDWDVSLLDVAVDRDSRKAE
P1 :      FFLADLTGEVQSIPTNTYGYISNLGLFR
P2 :      SRFFLADLTGEVQSIPTNTYGYISNLGLFRSAPITQTTFLMDLTDWDVSLLDVAVDR
P3 :
P4 :
P5 :
P6 :
```

```
wV8 : TSAPERVRQISFPMMYFKEVESITPDEIQGVRQPGTANELTTEAVVRAKMKIRTKFDITREFLFMQ
P1 :      QISFPMMYFKEVESITPDEIQGVRQPGTANELTTEAVVR      TKFDITREFLFMQ
P2 :      QISFPMMYFKEVESITPDEIQGVRQPGTANELTTEAVVR      TKFDITREFLFMQ
P3 :      QISFPMMYFKEVESITPDEIQGVRQPGTANELTTEAVVR      TKFDITREFLFMQ
P4 :      QISFPMMYFKEVESITPDEIQGVRQPGTANELTTEAVVR      TKFDITREFLFMQ
P5 :      QISFPMMYFKEVESITPDEIQGVRQPGTANELTTEAVVR      TKFDITREFLFMQ
P6 :      QISFPMMYFKEVESITPDEIQGVRQPGTANELTTEAVVR      TKFDITREFLFMQ
```

```
wV8 : ALKGVVDARGTLYADLYKQFDVEKKTVYFDLDNPNADIDAAIEELRMHMEDEAKTGTVINGEEIHVV
P1 : ALK      GTLYADLYK      KTVYFDLDNPNADIDASIEELR      TGTVINGEEIHVV
P2 : ALK      GTLYADLYK      TGTVINGEEIHVV
P3 : ALK      GTLYADLYK      TVYFDLDNPNADIDASIEELR      TGTVINGEEIHVV
P4 : ALK      GTLYADLYK      TGTVINGEEIHVV
P5 : ALK      GTLYADLYK      TIYFDLDNPNADIDASIEELR      TGTVINGEEIHVV
P6 : ALK      GTLYADLYKQFDVEK  TIYFDLDNPNADIDASIEELR      TGTVINGEEIHVV
```

```
wV8 : VDRLFFSKLVKHPKIRDAYLAQQTPLAWQQITGSLRTGGTDGVQAHMNTFYGGVKFVQYNGKFKDKR
P1 : VDR      IRDAYLAQQTPLAWQQITGSLR      FVQYNGK
P2 : VDRLFFSK  IRDAYLAQQTPLAWQQITGSLRTGGTDGVQAHMNTFYGGVKFVQYNGK
P3 : VDR      DAYLAQQTPLAWQQITGSLR      FVQYNGK
P4 : VDR      DAYLAQQTPLAWQQITGSLR      FVQYNGK
P5 : VDR      DAYLAQQTPLAWQQITGSLRTGGADGVQAHMNTFYGGVKFVQYNGK
P6 :      DAYLAQQTPLAWQQITGSLRTGGADGVQAHMNTFYGGVK
```

```
wV8 : GKVHTLVSIDSVAATVGVGHAFPNVSMLEANNIFEVAYGPCPKMGYANTLGQELYVFYEKDRDEGI
P1 :      MGYANTLGQELYVFYEKDR
P2 :      MGYANTLGQELYVFYEKDR
P3 :
P4 :
P5 :
P6 :
```

ES 2 740 124 T3

wV8 : DFEAHSYMLPYCTRPQLLDVDRSDAKPD
P1 : PQLLDVDR
P2 : PQLLDVDR
P3 : PQLLDVDR
P4 : PQLLDVDR
P5 : PQLLDVDR
P6 : PQLLDVDR

Alineación de la proteína de cápside principal de bacteriófago RB69 con péptidos obtenidos a partir de espectrometría de masas de la proteína de cápside principal de bacteriófago P8:

5

RB69 : MTTIKTKAQLVDKWKELLEGEGLPEIANSKQAI IAKIFENQEKDFEVSPPEYKDEKIAQAFGSFLTEAE
P8 :

RB69 : IGGDHGYNAQNIAAGQTSQAVTQIGPAVMGMVRRRAIPNLIAFDICGVQPMNSPTGQVFALRAVYGKDP
P8 :

RB69 : IAAGAKEAFHPMYAPDAMFSGQGAACKFPALAASTQTKVGDYTHFFQETGTVYLQASAQVTISSAD
P8 : EAFHPMYAPDAMFSGQGAAK

RB69 : DAAKLDAEI I KQMEAGALVEIAEGMATSIAELQEGFNGSTDNPNWEMGFRIDKQVIEAKSRQLKAAYS
P8 : AAYS

RB69 : IELAQDLRAVHGMDADAELSGILATEIMLEINREVVWYINYSQVKGSGMTNIVGSKAGVDFQDPID
P8 : IELAQDLR EVVDWYINYSQVKG AGVDFQDPID

RB69 : IRGARWAGESFKALLFQIDKEAVEIARQTGRGEGNFIIASRNVVNVLASVDTGISYAAQGLASGFNTD
P8 : IR WAGESFK QTGRGEGNFIIASR

RB69 : TTKSVFAGVLGGKYRVYIDQYAKQDYFTVGYKGANEMDAGIYYAPYVALTPLRGSDDPKNFQPMGFKT
P8 : SVFAGVLGGKYRVYIDQYAKQDYFTVGYKGANEMDAGIYYAPYVALTPLR NFQPMGFKT

RB69 : RYGIGVNPFAESSLQAPGARIQSGMPSILNSLGNAYFRRVYVVKGI
P8 : RYGIGVNPFAESSLQAPGARIQSGMPSILNSLGN

Alineación de la proteína de cápside principal de bacteriófago JS98 con péptidos obtenidos a partir de espectrometría de masas de la proteína de cápside principal de bacteriófago CLB_P2,

10

JS98: MKKNALVQKWSALLENEALPEIVGASKQAIIAKIFENQEQDILTAPEYRDEKISEAFSGSFLTEAEI
 CLB_P2:

JS98: GGDHGYDATNIAAGQTS GAVTQIGPAVMGMVRRRAIPHLIAFDICGVQPLNNPTGQVFALRAVYGKD
 CLB_P2: AVYGKD

JS98: PIAAGAKEAFHPMYAPNAMFSGQGAETFEALAASKVLEVGKIYSHFFEATGSAHFQAVEAVTVDA
 CLB_P2: PIAAGAK

JS98: GATDAAKLDAAVTALVEAGQLAEIAEGMATSIAELQEGFNGSTDNPNWEMGFRIDKQVIEAKSRQL
 CLB_P2:

JS98: KASYSIELAQDLRAVHGMDADAELSGILATEIMLEINREVIDWINYSAQVGKSGMTNTVGAKAGVF
 CLB_P2: ASYSIELAQDLR EVIDWINYSAQVGK AGVF

JS98: DFQDPIDIRGARWAGESFKALLFQIDKEAAEIARQTGRGAGNFIIASRNVVNLAAVDTSVSYAAQ
 CLB_P2: DFQDPIDIR WAGESFKALLFQIDKEAAEIAR GAGNFIIASR

JS98: GLGQGFNVDTTKAVFAGVLGGKYRVYIDQYARSDYFTIGYKGSNEMDAGIYYAPYVALTPLRGSDP
 CLB_P2: AVFAGVLGGKYRVYIDQYAR GSNEMDAGIYYAPYVALTPLR

JS98: KNFQPVMGFKTRYGIGINPFADPAAQAPT KRIQNGMPDIVNSLGLNGYFRRVYVKGI
 CLB_P2: NFQPVMGFKTRYGIGINPFADPAAQAPT KRIQNGMPDIVNSLGLNGYFR

Ejemplo de referencia 1

5 **Aislamiento de cepas de AIEC**

Se aislaron ciento sesenta y seis (166) cepas de *Escherichia coli* (*E. coli*) adherente-invasiva, incluyendo la cepa de *E. coli* LF82 (tabla 1), tal como sigue: se aislaron las cepas de AIEC de heces recientes de pacientes con EC, sus familiares y sujetos de control. Se diluyeron las heces en diluciones de diez veces hasta -9. Cada dilución se sembró en diferentes medios. Tras la incubación, se subcultivaron las colonias, se identificaron y se sometieron a prueba las cepas para determinar la capacidad de invasión.

En detalle, inmediatamente después de la emisión, se introdujeron heces recientes en un envase estéril. Se hizo anaerobia la atmósfera mediante la adición de un Anaerocult® hidratado. Se trataron las muestras el día del muestreo. Se introdujo aproximadamente 1 g de heces en 9 ml de disolución de Ringer de ¼ de concentración cisteinada en tubos tarados; se volvieron a tarar después de la introducción de la muestra para determinar su peso exacto (primera dilución de diez veces). Se realizaron ocho diluciones adicionales de diez veces y se sembró 0,1 ml de cada dilución en diferentes medios no selectivos y selectivos incubados en condiciones apropiadas: agar sangre Columbia (CS) y agar CSH incubados durante una semana en condiciones anaerobias, medio MRS incubado durante 48 h en una atmósfera enriquecida en CO₂, agar McConkey y Cetrimide incubados durante 48 h en aire. Se realizaron todas las incubaciones a 37°C. Después de la incubación, se contaron las colonias, se subcultivaron y se identificaron mediante criterios fenotípicos establecidos.

Se seleccionó un sujeto de control en relación con un paciente con EC de modo que el sujeto de control era del mismo sexo y edad que el paciente con EC y tenía un tamaño de familia similar que el paciente con EC (para tener en cuenta la variación de microflora dentro de una familia).

El protocolo lo aprobó el comité ético local en 2000, Se siguió a los pacientes con el registro EPIMAD, que se organiza bajo un acuerdo entre el Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) y el Institut National de Veille Sanitaire (InVS) y también está respaldado por la François Aupetit Association, Lion's Club of Northwestern France, Ferring Laboratories, la Société Nationale Française de Gastroentérologie y Lille University Hospital.

Tabla 1 - Cepas de AIEC

Número	Referencia	Invasión I-407 Media (%)	Invasión I-407 EEM (%)	Medio de cultivo ¹	Dilución	Nivel de <i>E. coli</i> (log UFC/g) ²	Recuento total (logUFC/g) ³
	LF82	1,29	0,8	McC	-4	5,7	5,9
<i>AIEC aislada de paciente con EC</i>							

ES 2 740 124 T3

06259	C4-1	2,050	0,500	McC	-5	5,87	10,52
06254	C34-12	2,163	0,738	Cet	-2	2,91	10,14
06256	C34-2	0,550	0,170	McC	-7	7,91	10,14
06072	C39-1	0,2075	0,147	McC	-6	7,02	9,93
06073	C39-2	0,1374	0,097	McC	-6	7,02	9,93
06075	C39-4	0,2334	0,165	McC	-5	6,02	9,93
06076	C39-7	0,5900	0,417	Cet	-2	3,02	9,93
06087	C42-1	0,1095	0,055	McC	-5	5,82	9,58
06088	C42-2	0,1954	0,098	McC	-5	5,82	9,58
06089	C42-3	0,1930	0,097	Cet	-3	3,82	9,58
06398	C76-10	0,131	0,036	CS ana	-5	6,09	9,99
06011	C84-2	0,2580	0,129	McC	-6	6,96	9,23
06023	C97-1	0,1173	0,068	McC	-7	8,14	10,03
06024	C97-2	0,1303	0,075	McC	-6	7,14	10,03
06026	C98-1	0,1439	0,072	McC	-6	7,2	9,34
06027	C98-2	0,1122	0,065	McC	-6	7,2	9,34
06028	C98-4	0,2310	0,133	Cet	-2	3,20	9,34
06029	C99-1	1,0657	0,615	McC	-6	6,99	10,17
06030	C99-2	0,1613	0,081	McC	-6	6,99	10,17
06031	C99-3	0,2330	0,135	McC	-5	5,99	10,17
06033	C99-9	0,4667	0,269	Cet	-2	2,99	10,17
06150	C187-13	0,6675	0,472	CS ana	-7	7,93	9,97
06151	C187-14	1,0350	0,732	CS ana	-7	7,93	9,97
06152	C187-15	0,4375	0,253	CS ana	-7	7,93	9,97
06166	C190-1	0,2251	0,130	McC	-8	9,28	10,98
06167	C190-2	0,1247	0,072	McC	-8	9,28	10,98
06168	C190-3	0,1688	0,097	McC	-7	8,28	10,98
06169	C190-4	0,1373	0,079	McC	-6	7,28	10,98
06170	C190-6	0,7065	0,408	Cet	-3	4,28	10,98
06171	C190-8	0,5827	0,336	Cet	-2	3,28	10,98
06172	C190-7	0,5385	0,311	Cet	-2	3,28	10,98
06173	C190-12	0,5182	0,299	CS ana	-9	10,28	10,98
06280	C203-7	0,185	0,087	Cet	-3	3,96	9,94
06281	C203-9	0,393	0,023	Cet	-2	2,96	9,94
06283	C204-4	0,253	0,092	McC	-6	7,00	9,78
06271	C205-2	0,153	0,052	McC	-6	6,93	9,97
06278	C205-9	0,160	0,005	Cet	-2	2,93	9,97
06351	C215-8	0,548	0,397	Cet	-5	5,93	9,91
06352	C215-9	0,262	0,143	Cet	-5	5,93	9,91
06353	C215-12	1,960	1,340	Cet	-3	3,93	9,91
06354	C215-13	1,339	1,281	Cet	-3	3,93	9,91
06356	C215-10	2,260	1,540	Cet	-3	3,93	9,91
06357	C215-11	2,195	1,355	Cet	-3	3,93	9,91
06358	C215-1	1,110	0,590	McC	-6	7,93	9,91

ES 2 740 124 T3

06359	C215-2	1,523	0,928	McC	-6	7,93	9,91
06360	C215-3	0,165	0,064	McC	-4	4,93	9,91
06361	C215-4	0,315	0,135	McC	-3	3,93	9,91
06362	C215-5	0,980	0,720	McC	-3	3,93	9,91
07074	C43-1	1,5825	1,3675	McC	-6	7,26	9,66
07075	C44-1	0,1822	0,0755	McC	-5	6,01	9,91
07076	C44-2	0,5950	0,3350	McC	-5	6,01	9,91
07077	C44-3	0,1432	0,0486	McC	-4	5,01	9,91
07078	C44-4	0,3086	0,1764	McC	-4	5,01	9,91
07081	C44-9	0,5525	0,2675	Cet	-2	3,01	9,91
07082	C45-1	0,4675	0,0925	McC	-5	5,94	9,46
07086	C45-9	0,2110	0,0842	Cet	-2	2,94	9,46
07093	C50-2	1,3125	0,9375	McC	-5	5,99	7,69
07035	C66-2	0,6475	0,3125	McC	-7	8,01	9,53
07045	C71-1	0,2079	0,1226	McC	-5	5,95	10,58
07046	C71-2	0,2030	0,0719	McC	-4	4,95	10,58
07048	C71-5	0,2388	0,1382	Cet	-2	2,95	10,58
07051	C100-11A	0,6325	0,3425	MRS	-4	5,07	10,47
07003	C112-4	0,2513	0,0861	McC	-5	6,14	10,88
07006	C112-10	0,8913	0,1863	Cet	-2	3,14	10,88
07022	C121-8	0,1903	0,0448	Cet	-5	6,14	10,88
07101	C55-1	0,678	0,022	McC	-6	6,95	10,38
07103	C55-3	9,175	2,775	McC	-5	5,95	10,38
07107	C55-8A	4,425	0,075	Cet	-2	2,95	10,38
07111	C60-1	0,232	0,028	McC	-6	6,84	8,20
07113	C60-3	0,340	0,105	McC	-4	4,84	8,20
07126	C231-1	0,323	0,097	McC	-7	7,94	10,62
07127	C231-2	0,141	0,030	McC	-6	6,94	10,62
07128	C231-5	0,365	0,095	Cet	-3	3,94	10,62
07134	C233-1	0,645	0,090	McC	-3	3,98	6,18
07135	C233-3	1,510	0,390	McC	-2	2,98	6,18
07136	C233-2	2,090	0,260	McC	-3	3,98	6,18
07137	C233-11	1,108	0,168	CSH	-3	3,98	6,18
<i>AIEC aislada de familiares de pacientes con EC</i>							
06066	C22-9	0,2710	0,192	CS ana	-7	7,94	10,12
06381	C33-5	0,465	0,185	Cet	-2	2,90	9,46
06258	C35-5	0,873	0,428	McC	-6	7,64	10,14
06086	C41-7	0,1242	0,072	Cet	-2	2,91	10,14
06384	C47-2	0,180	0,010	McC	-6	7,07	9,62
06386	C47-4	0,121	0,047	McC	-5	6,07	9,62
06097	C64-2	1,4550	1,029	McC	-5	6,03	9,80
06099	C64-5	0,1175	0,068	Cet	-2	3,03	9,80
06100	C64-6	1,1225	0,794	Cet	-2	3,03	9,8
06006	C81-1	0,2850	0,202	McC	-5	5,96	9,64

ES 2 740 124 T3

06007	C81-2	0,3200	0,226	McC	-5	5,96	9,64
06016	C85-1	0,7540	0,435	McC	-7	8,01	10,16
06019	C85-5	1,4775	1,045	Cet	-2	3,01	10,16
06394	C87-7	0,130	0,030	MRS	-2	3,03	9,42
06020	C92-1	0,1253	0,072	McC	-5	6,09	9,64
06021	C92-2	0,1678	0,097	McC	-4	5,09	9,64
06022	C92-4	0,1229	0,071	McC	-2	3,09	9,64
06396	C95-1	4,975	2,575	McC	-6	7,1	9,75
06037	C102-1	0,6767	0,391	McC	-6	6,90	8,55
06040	C102-7	0,2342	0,135	CS ana	-6	6,9	8,55
06080	C107-2	0,5050	0,357	McC	-6	7,1	9,55
06042	C107-3	0,1900	0,110	McC	-6	7,1	9,55
06043	C107-5	1,7600	1,245	McC	-6	7,1	9,55
06045	C107-10	0,1975	0,140	Cet	-2	3,1	9,55
06046	C108-2	0,3925	0,278	McC	-6	7,12	10,54
06049	C108-10	0,2425	0,171	CS ana	-7	8,12	10,54
06057	C133-1	0,2475	0,175	McC	-6	6,98	10,49
06101	C133-4	0,1809	0,090	Cet	-2	2,98	10,49
06160	C189-2	1,3483	0,778	McC	-6	7,07	10,19
06164	C189-16B	0,3295	0,190	CSH	-8	8,07	10,19
06176	C191-4	0,3975	0,281	McC	-5	5,96	10,34
06177	C191-5	0,3185	0,225	McC	-5	5,96	10,34
06293	C207-6	0,175	0,111	Cet	-2	2,93	10,13
06295	C208-6	0,116	0,047	Cet	-2	2,91	10,57
06301	C211-1	0,285	0,242	McC	-2	2,87	10,07
06329	C218-2	0,649	0,439	McC	-6	6,88	10,06
06338	C218-13	0,208	0,047	Cet	-5	5,88	10,06
06341	C218-16	0,304	0,218	Cet	-4	4,88	10,06
07064	C225-1	0,1280	0,0058	McC	-4	4,90	10,10
07065	C225-2	0,8354	0,7146	McC	-4	4,90	10,10
07066	C225-5	0,9200	0,4150	McC	-6	6,87	9,49
07067	C225-6	1,0792	0,5977	McC	-5	5,87	9,49
07068	C226-1	0,1193	0,0334	McC	-5	6,06	10,58
07073	C227-4	0,2164	0,1568	Cet	-2	2,88	10,06
07120	C228-2	0,228	0,013	McC	-2	3,17	9,72
07121	C229-1	0,126	0,012	McC	-5	6,06	9,50
07122	C229-2	0,117	0,034	McC	-4	5,06	9,50
07123	C229-7	0,190	0,045	Cet	-5	6,06	9,50
07131	C232-5	0,190	0,122	Cet	-2	2,98	9,60
07138	C235-1	0,658	0,193	McC	-5	6,02	9,42
<i>AIEC aislada de sujetos de control</i>							
06235	C174-6	2,833	2,468	Cet	-2	3,05	10,59
06242	C177-1	0,251	0,175	McC	-6	6,99	9,95
06103	C177-13	0,1461	0,073	CS ana	-7	7,99	9,95

ES 2 740 124 T3

06105	C177-2	0,1571	0,079	McC	-5	5,99	9,95
06106	C178-23	0,4527	0,261	CSH	-5	6,03	10,24
06108	C179-7	0,1103	0,064	Cet	-2	3,07	10,53
06142	C181-5	1,1525	0,815	Cet	-3	4,01	9,96
06143	C183-12	0,2117	0,122	CSH	-7	8,2	9,95
06121	C183-2	0,1867	0,108	McC	-4	5,2	9,95
06122	C183-5	1,1025	0,780	Cet	-2	3,20	9,95
06145	C184-17	0,1095	0,077	CSH	-5	6,09	9,64
06146	C185-22	0,3933	0,227	CSH	-5	5,88	9,88
06126	C185-1	0,6050	0,428	McC	-4	4,88	9,88
06135	C185-2	0,4500	0,318	McC	-5	5,88	9,88
06136	C185-3	0,4875	0,345	McC	-2	2,88	9,88
06137	C185-6	0,3125	0,221	Cet	-2	2,88	9,88
06127	C186-1	0,1063	0,053	McC	-6	6,86	10,04
06129	C186-4	0,4700	0,332	Cet	-3	3,86	10,04
06158	C188-15	0,1052	0,061	CS ana	-6	6,94	9,60
06196	C192-11	0,508	0,279	Cet	-2	2,92	9,44
06197	C195-1	0,206	0,157	McC	-5	5,95	9,72
06198	C195-2	1,806	1,363	McC	-4	4,95	9,72
06200	C195-6	2,498	1,482	Cet	-2	2,95	9,72
06201	C196-1	0,218	0,105	McC	-7	7,87	9,61
06204	C196-4	0,307	0,163	McC	-5	5,87	9,61
06212	C197-1	3,133	1,438	McC	-6	6,86	10,32
06213	C197-2	0,445	0,042	McC	-6	6,86	10,32
06216	C197-6	0,886	0,782	Cet	-2	2,86	10,32
06217	C198-1	0,143	0,112	McC	-6	7,07	10,03
06218	C198-2	0,113	0,096	McC	-6	7,07	10,03
06221	C199-3	5,367	3,132	McC	-4	5,06	9,79
06222	C199-4	1,353	0,942	McC	-3	4,06	9,79
06223	C199-5	2,980	2,122	McC	-3	4,06	9,79
06224	C199-6	5,398	2,837	McC	-3	4,06	9,79
06225	C200-1	0,538	0,277	McC	-3	4,06	9,79
07032	C222-1	0,1038	0,0783	McC	-6	7,14	10,88
07033	C222-2	1,2425	0,6575	McC	-6	7,14	10,88
07125	C230-1	0,300	0,055	McC	-5	6,0	10,2

¹ McC = agar McConkey (bioMérieux)

Cet = agar Cetrímide (bioMérieux)

5

CS ana = agar sangre Columbia anaerobia

MRS = agar de Man, Rogosa y Sharp (Oxoid)

10

CSH = agar Columbia SH

² El "nivel de *E. coli*" se refiere a la cantidad de la cepa AIEC en las heces.

³ "Recuento total" se refiere a todas las especies bacterianas en las heces.

ES 2 740 124 T3

El medio de cultivo CS ana tiene la siguiente composición (por litro de medio):

- 5 – 39 g de base de agar sangre Columbia (Oxoid)
- 5 g de glucosa
- 0,3 g de clorhidrato de cisteína
- 10 – 5 g de agar
- pH 7,0 ± 0,2

Se esterilizó la mezcla durante 15 minutos a 121°C. Justo antes de la siembra, se añade el 5% de sangre de caballo.

15 El medio de cultivo CSH tiene la siguiente composición (por litro de medio):

- 39 g de base de agar sangre Columbia (Oxoid)
- 20 – 3 g de clorhidrato de cisteína
- pH 6,8 ± 0,2

25 Se esterilizó la mezcla durante 15 minutos a 121°C. Justo antes de la siembra, se añaden 2 ml de disolución de citrato de amonio estéril (0,25 g/10 ml agua). Después de la incubación, las bacterias que usan cisteína (y liberan sulfuro) dan como resultado colonias negras en este medio.

Ejemplo 2

30 *Aislamiento de fagos*

Se aislaron fagos de aguas residuales tal como sigue: se filtraron las aguas residuales a 0,2 µm y se mezclaron con un volumen igual de medio Luria-Bertani (LB) 2X. Se inoculó esta mezcla con un cultivo nuevo de cepa LF82 y se incubó en un agitador a 37°C durante la noche. Se añadió cloroformo (volumen 1/10) al matraz y se colocó en un agitador durante una hora. Se centrifugó el medio a 10.000 g durante 10 min. Se recogió 1 ml del sobrenadante y se añadió 1/10 vol. de cloroformo. Después de un breve mezclado por vórtex, se centrifugó el tubo Eppendorf a 7.500 g durante 5 min. Para determinar si estaban presentes fagos en este extracto, se aplicó una gota (10 µl) del sobrenadante en una placa de agar LB y se dejó secar. Al usar un alambre de platino, se sembró la placa en líneas desde la gota a través del resto de la placa para aislar fagos individuales. Se aplicó 1 ml de un cultivo en crecimiento de cepa LF82 para cubrir toda la placa; se retiró el exceso y se incubó la placa a 37°C durante la noche. Se eligieron una o dos placas y se resuspendieron en 200 µl de tampón SM (TrisHCl 10 mM pH7, NaCl 200 mM, gelatina 0,03%). Se añadieron 20 µl de cloroformo en cada tubo y se mezclaron los tubos brevemente por vórtex y se centrifugaron a 7.500 g durante 5 min. Se aplicaron 10 µl del sobrenadante en una placa LB y se dejaron secar y se repitió el procedimiento previo al menos tres veces. Una vez que la mayoría de placas aisladas fue homogénea, se añadieron 10 µl de la última placa resuspendida a 1 ml de cultivo en crecimiento de cepa LF82 a DO 0,1 a 600 nm. Se incubó este tubo de cultivo a 37°C durante de 2 a 4 horas hasta que se produjo la lisis. Después de la adición de 1/10 vol. de cloroformo, se transfirió el cultivo a un tubo Eppendorf, se centrifugó a 7.500 g durante 5 min y se enfrió hasta 4°C, obteniendo de ese modo la reserva primaria. Se mantuvieron varias diluciones de esta reserva a 4°C y se usaron para infectar un volumen mayor de cultivo con el fin de preparar mayores cantidades de fagos. Se obtuvieron siete (7) fagos tal como sigue:

- vB_EcoM_LF82_P1 (antes y después en el presente documento P1) depositada en la Colección Nacional Francesa de Microorganismos en el Instituto Pasteur bajo el número de registro CNCM I-4694;
- 55 • vB_EcoM_LF82_P2 (antes y después en el presente documento P2) depositada en la Colección Nacional Francesa de Microorganismos en el Instituto Pasteur bajo el número de registro CNCM I-4695;
- vB_EcoM_LF82_P3 (antes y después en el presente documento P3) depositada en la Colección Nacional Francesa de Microorganismos en el Instituto Pasteur bajo el número de registro CNCM I-4696;
- 60 • vB_EcoM_LF82_P4 (antes y después en el presente documento P4) depositada en la Colección Nacional Francesa de Microorganismos en el Instituto Pasteur bajo el número de registro CNCM I-4697;
- vB_EcoM_LF82_P5 (antes y después en el presente documento P5) depositada en la Colección Nacional

Francesa de Microorganismos en el Instituto Pasteur bajo el número de registro CNCM I-4698;

• vB_EcoM_LF82_P6 (antes y después en el presente documento P6) depositada en la Colección Nacional Francesa de Microorganismos en el Instituto Pasteur bajo el número de registro CNCM I-4699; y

• vB_EcoM_LF82_P8 (antes y después en el presente documento P8) depositada en la Colección Nacional Francesa de Microorganismos en el Instituto Pasteur bajo el número de registro CNCM I-4700,

CLB_P2, depositada en la Colección Nacional Francesa de Microorganismos en el Instituto Pasteur bajo el número de registro CNCM I-4675, y su aislamiento se describe en detalle en Maura *et al.* Environmental Microbiology (2012) 14(8), 1844-1854,

Los fagos P1 a P6 pertenecen a la familia de bacteriófagos wV8.

P8 pertenece a la familia de bacteriófagos RB69.

CLB_P2 pertenece a la familia de bacteriófagos JS98.

La clasificación en las familias de bacteriófagos wV8, RB69 y JS98 se realizó basándose en la secuencia de la proteína de cápside principal.

Ejemplo 3

Ensayos *in vitro* de la infectividad de bacteriófagos en cepas de AIEC

Se llevó a cabo el ensayo de placa al poner en contacto diluciones en serie de disoluciones de bacteriófagos (desde no diluidas hasta una dilución 10^{-8}) con una placa de Petri cuya superficie se recubrió por una bacteria. Después de la incubación durante la noche a 37°C, se contaron las placas. Cuando la bacteria sometida a prueba era el huésped bacteriano (huésped de referencia) usado para aislar bacteriófagos se consideró que el ensayo de placa dio una eficiencia del 100%. Cuando la bacteria sometida a prueba no era el huésped original, entonces los resultados se expresaron por comparación con el huésped de referencia. Un resultado mayor del 80% (+++) significa que la bacteria es un huésped muy eficiente en comparación con el huésped de referencia, mientras que un resultado entre el 0,1 y el 80% (++) significa que la bacteria es un huésped eficiente, y un resultado por debajo del 0,1% (+) pero por encima de 0 significa que la bacteria es un huésped moderadamente eficiente, y finalmente 0 (-) significa que la bacteria es totalmente resistente.

Resultados

La tabla 2 muestra el resultado del espectro del huésped de los 8 fagos (tal como se aislaron/identificaron en el ejemplo 2) en 38 cepas (de las 166 cepas aisladas en el ejemplo 1, tabla 1).

Tabla 2 Cepas sometidas a prueba y eficiencia efectiva de la siembra (EOP) obtenida para cada bacteriófago

Cepa bacteriana	Bacteriófago							
	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P8	CLB_P2
LF82	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
06023	-	-	-	-	-	-	-	++
06030	-	-	-	-	-	-	+	+++
06033	++	++	++	++	++	++	+	+++
06066	-	-	-	-	-	-	+++	-
06072	-	-	-	-	-	-	+	++
06073	-	-	-	-	-	-	+	+++
06075	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	++
06088	++	++	++	++	++	++	-	-
06089	++	++	++	++	++	++	-	-
06122	++	++	++	++	++	++	-	-
06150	-	-	-	-	-	-	+	-
06351	++	++	++	++	++	++	-	++

ES 2 740 124 T3

06353	+	+	+	+	+	+	-	-
06354	-	-	-	-	-	-	-	-
06356	++	+	+	+	+	+	-	-
06357	+	+	+	+	+	+	-	-
06358	++	+	+	+	+	+	-	-
06359	++	+	+	+	+	+	-	-
06361	+	++	+	+	+	+	+	-
06362	-	-	-	-	-	-	-	-
07045	-	-	-	-	-	-	-	-
07046	-	-	-	-	-	-	-	++
07048	-	-	-	-	-	-	-	-
07051	-	-	-	-	-	-	-	-
07075	-	-	-	-	-	-	-	-
07076	++	+++	++	+	+	+	+++	++
07077	-	-	-	-	-	-	-	-
07078	++	+++	+	+	+	+	+	++
07081	++	+++	++	+	+	++	+++	++
07082	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++
07107	+++	++	+++	++	+++	+++	-	+++
07126	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	++
07127	+++	++	+++	+++	++	++	-	++
07128	-	-	-	-	-	-	-	++
07134	-	-	-	-	-	-	-	-
07135	-	-	-	-	-	-	-	++
07136	-	-	-	-	-	-	-	-
07137	-	-	-	-	-	-	++	-

Tabla 3 Número de cepas infectadas por fagos:

Eficacia	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P8	CLB_P2
+	3	5	6	9	9	8	8	0
++	10	8	8	6	6	7	1	13
+++	5	6	5	4	4	4	4	5
Total/38	18	19	19	19	19	19	13	18

5 Los números indican el número de cepas infectadas por un bacteriófago

Ejemplo 4

Replicación in vivo de bacteriófagos en el intestino de ratones

10 Se evaluó la replicación *in vivo* de bacteriófagos en el intestino de ratones tal como sigue:

En primer lugar, se modificó por ingeniería genética la cepa LF82 para que portara dos genes de resistencia a antibióticos que confieren respectivamente resistencia a estreptomycin y kanamicina. Esta nueva cepa bacteriana se denominó LF82SK y se verificó que sus propiedades invasivas eran similares a la cepa LF82 original.

15 Tres (3) grupos de dos (2) ratones cada uno:

Grupo 1: ratones no colonizados + fagos

20 Grupo 2: ratones colonizados por LF82SK

Grupo 3: ratones colonizados por LF82SK + fagos

5 Se añadió estreptomicina (5 g/l) a agua para beber de todos los animales 3 días antes del día 0 y se mantuvo a lo largo del experimento.

En el día 0, se administró LF82SK a los grupos 2 y 3 con el fin de permitir que la cepa colonice el intestino de los ratones.

10 En el día 4, se administraron 200 µl de un cóctel de bacteriófagos P2 + P6 a los grupos 1 y 3 (disolución por sonda nasogástrica 10^8 ufp/ml) una vez por la mañana y una vez por la tarde. También se añadieron bacteriófagos P2+P6 al agua para beber (10^8 ufp/ml). En el día 5 por la mañana, se sacrificaron los ratones para evaluar el número de bacterias y bacteriófagos en el íleo y en las heces.

15 Resultados:

Bacterias (E. coli):

Grupo 1: sin bacterias;

20 Grupo 2: en el íleo - 10^6 ufc/g de órgano; en heces - 10^8 ufc/órgano;

Grupo 3: en el íleo y las heces: todas las bacterias lisadas por fagos.

25 *Fagos:*

Grupo 1: en el íleo - 10^6 ufc/g de órgano; en heces - 10^7 ufc/órgano;

Grupo 2: sin fagos

30 Grupo 3: en el íleo - 10^6 ufc/g de órgano; en heces - 10^{10} ufc/órgano;

En las heces, hubo 100 veces más fagos en el grupo 3 que en el grupo 1 lo que muestra la multiplicación de los fagos *in vivo*.

35 Ejemplo 5

Replicación in vivo de bacteriófagos en el intestino de ratones

40 Se evaluó la replicación *in vivo* de bacteriófagos en el intestino de ratones tal como sigue:

se despacharon 12 ratones en tres (3) grupos de cuatro (4) ratones cada uno:

45 Grupo 1: ratones no colonizados por fagos + fagos

Grupo 2: ratones colonizados por LF82SK

Grupo 3: ratones colonizados por LF82SK + fagos

50 Se añadió estreptomicina (5 g/l) a agua para beber de todos los animales 3 días antes del día 0 y se mantuvo a lo largo del experimento.

En el día 0, se administró LF82SK a ratones de los grupos 2 y 3 con el fin de permitir que la cepa colonice el intestino de los ratones.

55 En el día 4, se añadieron bacteriófagos (cóctel de P2+P6+P8 a 10^8 ufp/ml cada uno) en el agua para beber de los grupos 1 y 3,

60 En el día 5, se sacrificaron los ratones para evaluar el número de bacterias y bacteriófagos en el íleo y en las heces. Se tomaron 100 µl de homogeneizados ileales de los tres grupos para extraer ADN completo usando el kit de purificación de ADN tisular Maxwell® 16 de Promega.

Resultados:

65 *Bacterias (E. coli):*

Grupo 1: sin bacterias;

Grupo 2: en el íleo - $3,2 \cdot 10^6$ ufc/g de órgano; en heces - $1,2 \cdot 10^9$ ufc/g de heces;

5 Grupo 3: en el íleo y las heces: todas las bacterias lisadas por fagos.

Fagos:

Grupo 1: en el íleo - $1,4 \cdot 10^6$ ufp/g de órgano; en las heces - $5,2 \cdot 10^6$ ufp/g de heces;

10 Grupo 2: sin fagos

Grupo 3: en el íleo - $2,6 \cdot 10^6$ ufp/g de órgano; en las heces - $1,0 \cdot 10^9$ ufp/g de heces;

15 En las heces, hubo 200 veces más fagos en el grupo 3 que en el grupo 1 lo que muestra la multiplicación de los fagos *in vivo*.

20 Se usó ADN extraído de secciones ileales para ejecutar PCR cuantitativa usando dos conjuntos de cebadores. Un conjunto de cebadores (SEQ ID NO: 30-31) sirvió para amplificar ADN de "todas las bacterias" presentes en la muestra mientras que el segundo conjunto (SEQ ID NO: 32-33) se usó para amplificar ADN específicamente de bacterias "*E. coli*". Después de la normalización, los resultados se expresaron como la razón de *E. coli* frente a todas las bacterias.

25 Grupo 1: las amplificaciones de qPCR fueron satisfactorias con todos los cebadores de bacterias pero no con los cebadores de *E. coli*. La razón no pudo calcularse.

Grupo 2: las amplificaciones de qPCR fueron satisfactorias con ambos conjuntos de cebadores. La razón promedio fue de 0,6 (el 60% de las bacterias totales eran bacterias *E. coli*)

30 Grupo 3: las amplificaciones de qPCR fueron satisfactorias con ambos conjuntos de cebadores. La razón promedio fue de 0,1 (el 10% de las bacterias totales eran bacterias *E. coli*). Obsérvese que un ratón presentó una razón de 0,4 mientras que los otros tres presentaron valores mucho más bajos (0,06; 0,0002; 0,002).

35 En consecuencia, los bacteriófagos fueron capaces de reducir el nivel de colonización ileal de bacterias LF82 en al menos un orden de magnitud en tres ratones de cuatro.

Ejemplo 6

Ensayo in vivo de la infectividad de bacteriófagos

40 Se seleccionan dos cócteles de fagos para someter a prueba en ratones de tipo natural (WT) y en ratones CEACAM6 infectados con la cepa de *E. coli* LF82 aislada de los pacientes con EC.

45 Tanto en ratones WT como en ratones CEACAM6 infectados con la cepa de *E. coli* LF82 aislada del paciente con EC, se administran bacteriófagos a los ratones mediante sonda nasogástrica oral en CMC. Este tipo de administración tiene muchas ventajas: cantidad conocida de administración de bacteriófagos y neutralización de la acidez gástrica inmediata. Los fagos se administran diariamente a los ratones durante todo el estudio.

50 - Se sacrifican los ratones a los 5 días después de la administración de LF82.

- Criterios principales: cuantificación de LF82 en flora adherente ileal y colónica de los ratones.

- Criterios secundarios:

55 + Evaluación del peso

+ Consistencia de las deposiciones.

+ Presencia de sangre fecal (macro y bio)

60 - Flora luminal (flora convencional + LF82 + fagos)

+ En el sacrificio: exámenes macroscópicos e histológicos, floral ileal y colónica adherente + LF82 + fagos,

65 + En el sacrificio: exámenes macroscópicos e histológicos, floral ileal y colónica adherente + LF82 + fagos,

Se monitorizan los parámetros biológicos de inflamación, y se investiga la translocación de bacteriófagos en los ganglios linfáticos mesentéricos (MLN), hígado y bazo.

5 Se monitorizan los marcadores de inflamación (MPO, citocinas proinflamatorias IL-6, IL-12 y citocinas antiinflamatorias IL-10). Se investiga la translocación de bacteriófagos y AIEC en MLN, hígado y bazo.

El seguimiento de la eliminación de bacteriófagos tiene lugar en las deposiciones de ratones que reciben el cóctel de bacteriófagos sin la cepa LF82.

10 Ejemplo 7

Ensayo in vivo de un cóctel de fagos en la cepa LF82.

15 Se evaluó la replicación de bacteriófagos *in vivo* (cóctel de P2+P6+P8+CLB_P2) en el intestino de ratones tal como sigue:

se despacharon 20 ratones en dos (2) grupos de diez (10) ratones cada uno:

20 Grupo 1: ratones colonizados por LF82SK

Grupo 2: ratones colonizados por LF82SK + fagos

Se añadió estreptomycin (5 g/l) a agua para beber de todos los animales 3 días antes del día 0 y se mantuvo a lo largo del experimento.

25 En el día 0, se administró LF82SK a ratones de ambos grupos con el fin de permitir que la cepa colonice el intestino de los ratones.

30 En el día 3, se administraron bacteriófagos (cóctel de P2+P6+P8+CLB_P2 a 10^8 ufp/ml cada uno) a ratones del grupo 2 mediante sonda nasogástrica.

35 En el día 4 y 7, se sacrificaron 5 ratones de cada grupo para evaluar el número de bacterias y bacteriófagos en el íleo, en el colon y en las heces. Se tomaron 100 μ l de homogeneizados ileales y colónicos de los dos grupos para extraer ADN completo usando el kit de purificación de ADN tisular Maxwell® 16 de Promega.

Resultados:

Nivel de LF82 en las deposiciones:

40 En el día 4 y 7 los niveles de LF82 fueron:

en el grupo 1: $7 \cdot 10^9$; $1 \cdot 10^9$ ufc/g

45 en el grupo 2: $8 \cdot 10^7$; $5 \cdot 10^8$ ufc/g

Nivel de fagos en las deposiciones:

En el día 4 y 7 los niveles de fagos fueron:

50 en el grupo 1: ninguno

en el grupo 2: $5 \cdot 10^9$; $6 \cdot 10^9$ ufp/g

55 En presencia del cóctel de fagos, el nivel de LF82 en las deposiciones fue significativamente menor que en su ausencia lo que muestra que el cóctel de fagos era capaz de infectar LF82 dentro del intestino de los ratones.

Nivel de LF82 en órganos:

en el día 4 los niveles de LF82 fueron:

60 en el íleo del grupo 1: el 100% de las bacterias eran *E. coli* (LF82)

en el íleo del grupo 2: el 20% de las bacterias eran *E. coli* (LF82)

65 en el colon del grupo 1: el 40% de las bacterias eran *E. coli* (LF82)

en el colon del grupo 2: el 2% de las bacterias eran *E. coli* (LF82)

en el día 7 los niveles de LF82 fueron:

5 en el íleo del grupo 1: el 100% de las bacterias eran *E. coli* (LF82)

en el íleo del grupo 2: el 50% de las bacterias eran *E. coli* (LF82)

10 en el colon del grupo 1: el 25% de las bacterias eran *E. coli* (LF82)

en el colon del grupo 2: el 10% de las bacterias eran *E. coli* (LF82)

Nivel de fagos en órganos:

15 en el día 4 los niveles de fagos fueron:

en el íleo del grupo 1: ninguno

20 en el íleo del grupo 2: $7 \cdot 10^8$ ufp/g

en el colon del grupo 1: ninguno

en el colon del grupo 2: $5 \cdot 10^{10}$ ufp/g

25 en el día 7 los niveles de LF82 fueron:

en el íleo del grupo 1: ninguno

30 en el íleo del grupo 2: $7 \cdot 10^8$ ufp/g

en el colon del grupo 1: ninguno

en el colon del grupo 4: $2 \cdot 10^8$ ufp/g

35 En el día 2 y 5 el nivel de LF82 se redujo tanto en el íleo como en el colon en el grupo tratado por fagos. Esto muestra que los fagos infectan LF82 en secciones del intestino y no sólo en las deposiciones. De manera concomitante, el nivel de fagos en el día 7 permanece tan alto como en el día 2 lo que muestra que el fago puede durar varios días en el intestino después de una administración inicial única.

40 Ejemplo 8

Ensayo in vivo de la infectividad de bacteriófagos

45 Se evaluó el ensayo *in vivo* de la infectividad de bacteriófagos (cóctel de P2+P6+P8) en ratones CEACAM6 infectados con LF82SK tal como sigue:

se despacharon 48 ratones en tres (4) grupos tal como sigue:

50 Grupo 1: ratones no colonizados (8 ratones)

Grupo 2: ratones no colonizados + fagos (12 ratones)

Grupo 3: ratones colonizados por LF82SK (16 ratones)

55 Grupo 4: ratones colonizados por LF82SK + fagos (12 ratones)

Se introdujo DSS (sulfato de dextrano) al 0,25% en el agua para beber 3 días antes del día 0 y se mantuvo a lo largo del experimento.

60 Se administró estreptomycinina (5 mg) por sonda nasogástrica oral a todos los animales 1 día antes del día 0.

En el día 0, se administró LF82SK a ratones de los grupos 3 y 4 con el fin de permitir que la cepa colonice el intestino de los ratones.

65 En el día 1, se administraron fagos (cóctel de P2+P6+P8 a 10^7 ufp/ml cada uno) una vez a cada ratón de los grupos 2 y 4 mediante sonda nasogástrica oral en CMC. Este tipo de administración tiene muchas ventajas: cantidad

ES 2 740 124 T3

conocida de administración de bacteriófagos y neutralización de la acidez gástrica inmediata.

En el día 1, se sacrificaron 4 ratones del grupo 3 para evaluar el número de bacterias en el íleo, en el colon y en las heces antes de la administración de fagos.

En el día 2, respectivamente se sacrificaron 4, 6, 6 y 6 ratones de los grupos 1, 2, 3 y 4 para evaluar el número de bacterias y bacteriófagos en el íleo, en el colon y en las heces.

En el día 5, respectivamente se sacrificaron 4, 6, 6 y 6 ratones de los grupos 1, 2, 3 y 4 para evaluar el número de bacterias y bacteriófagos en el íleo, en el colon y en las heces.

Se tomaron 100 μ l de homogeneizados del íleo, el colon y las heces de los cuatro grupos para extraer ADN completo usando el kit de purificación de ADN tisular Maxwell® 16 de Promega. Se monitorizaron diariamente el peso, la consistencia de las deposiciones y la presencia de sangre fecal. Se usó ADN extraído de secciones ileales para ejecutar PCR cuantitativa usando un conjunto de cebadores (SEQ ID NO: 44-45) para amplificar un gen específico (pMT1) de LF82. Los resultados se expresaron como el número de copias de este gen por gramo de tejidos.

LF82 pMT1 F (SEQ ID NO: 44) CCATTCATGCAGCAGCTCTTT

LF82 pMT1 R (SEQ ID NO: 45) ATCGGACAACATTAGCGGTGT

Resultados:

Los valores representan la mediana de valores obtenidos para cada grupo de ratones.

En el grupo 1, no se detectaron ni LF82 ni fagos a lo largo del experimento.

Nivel de LF82 en las deposiciones:

En el día 1: el nivel de LF82 en los grupos 3 y 4 fue de $5 \cdot 10^9$ y $6 \cdot 10^9$ ufc/g resp.

En el día 2, 3 y 5 los niveles de LF82 fueron:

en el grupo 3: $3 \cdot 10^9$; $5 \cdot 10^8$; $5 \cdot 10^7$ ufc/g

en el grupo 4: $5 \cdot 10^5$; $5 \cdot 10^5$; $5 \cdot 10^3$ ufc/g

Nivel de fagos en las deposiciones:

En el día 2, 3 y 5 los niveles de fagos fueron:

en el grupo 2: $5 \cdot 10^5$ ufp/g; no detectado; no detectado

en el grupo 4: $1 \cdot 10^9$; $1 \cdot 10^7$; $5 \cdot 10^6$ ufp/g

En presencia de fagos el nivel de LF82 en las deposiciones fue significativamente menor que en su ausencia. De manera concomitante, el nivel de fagos fue significativamente mayor en ratones colonizados por LF82 que en ratones libres de LF82. Ambos datos confirmaron que los fagos pueden infectar LF82 en el intestino.

Nivel de LF82 en órganos:

en el día 2 los niveles de LF82 fueron:

en el íleo del grupo 3: $2 \cdot 10^6$ copias de pMT1/g

en el íleo del grupo 4: $8 \cdot 10^4$ copias de pMT1/g

en el colon del grupo 3: $2 \cdot 10^7$ copias de pMT1/g

en el colon del grupo 4: $1 \cdot 10^5$ copias de pMT1/g

en el día 5 los niveles de LF82 fueron:

en el íleo del grupo 3: $5 \cdot 10^4$ copias de pMT1/g

en el íleo del grupo 4: $8 \cdot 10^4$ copias de pMT1/g

en el colon del grupo 3: $6 \cdot 10^6$ copias de pMT1/g

5 en el colon del grupo 4: $2 \cdot 10^5$ copias de pMT1/g

Nivel de fagos en los órganos:

en el día 2 los niveles de fagos fueron:

10

en el íleo del grupo 2: no detectado

en el íleo del grupo 4: $8 \cdot 10^5$ ufp/g

15

en el colon del grupo 2: $5 \cdot 10^4$ ufp/g

en el colon del grupo 4: $5 \cdot 10^6$ ufp/g

en el día 5 los niveles de LF82 fueron:

20

en el íleo del grupo 2: no detectado

en el íleo del grupo 4: no detectado

25

en el colon del grupo 2: no detectado

en el colon del grupo 4: $2 \cdot 10^4$ ufp/g

30

En el día 2, el nivel de LF82 se redujo tanto en el íleo como en el colon en el grupo tratado por fagos. Esto muestra que los fagos infectaron LF82 en secciones del intestino y no sólo en las deposiciones. De manera concomitante, el nivel de fagos fue significativamente mayor en ratones colonizados por LF82 que en ratones libres de LF82.

35

En el día 5, el nivel de LF82 en el íleo era demasiado débil como para observar una diferencia entre los dos grupos mientras que en muestras de colon el nivel de LF82 estaba todavía reducido en el grupo que recibió fagos en comparación con los grupos que no. De manera concomitante, sólo pudieron detectarse fagos en colon de ratones colonizados por LF82. Esto muestra que el efecto de los de fagos en la reducción de LF82 puede durar varios días después de la administración inicial.

40

A pesar del alto nivel de colonización de LF82 observado en este experimento, no se observaron signos de colitis en ninguno de los grupos.

Realizaciones

45

La presente divulgación se refiere, entre otros, a las siguientes realizaciones:

1. Una composición farmacéutica que comprende:

50

(i) al menos una cepa de bacteriófagos capaz de producir una infección lítica en una cepa de *Escherichia coli* adherente-invasiva; y

50

(ii) un portador farmacéuticamente aceptable;

para su uso en el tratamiento de enfermedad inflamatoria intestinal.

55

2. Una composición según la realización 1, en la que la cepa de *Escherichia coli* adherente-invasiva está presente en una o más de las partes del intestino (delgado y grueso) del sujeto.

60

3. Una composición según la realización 1, en la que la cepa de *Escherichia coli* adherente-invasiva es LF82, 07081, 07082, 07076 ó 06075.

60

4. Una composición según una cualquiera de las realizaciones 1 a 3, en la que la enfermedad inflamatoria intestinal es enfermedad de Crohn.

65

5. Una composición según una cualquiera de las realizaciones 1 a 3, en la que la enfermedad inflamatoria intestinal es colitis ulcerosa.

6. Una composición según una cualquiera de las realizaciones 1 a 3, en la que la enfermedad inflamatoria intestinal es recidiva de lesiones ileales después de la cirugía, por ejemplo cirugía para extirpar al menos una parte del intestino delgado en un paciente con EC.
- 5 7. Una composición según una cualquiera de las realizaciones 1 a 6, en la que la composición comprende la cepa de bacteriófagos P1 depositada en la Colección Nacional Francesa de Microorganismos en el Instituto Pasteur bajo el número de registro CNCM I-4694 o una variante de la misma, en la que la variante tiene la misma actividad lítica, preferiblemente la misma actividad lítica y las mismas características fenotípicas que dicha cepa de bacteriófagos P1.
- 10 8. Una composición según una cualquiera de las realizaciones 1 a 7, en la que la composición comprende la cepa de bacteriófagos P2 depositada en la Colección Nacional Francesa de Microorganismos en el Instituto Pasteur bajo el número de registro CNCM I-4695 o una variante de la misma, en la que la variante tiene la misma actividad lítica, preferiblemente la misma actividad lítica y las mismas características fenotípicas que dicha cepa de bacteriófagos P2.
- 15 9. Una composición según una cualquiera de las realizaciones 1 a 8, en la que la composición comprende la cepa de bacteriófagos P3 depositada en la Colección Nacional Francesa de Microorganismos en el Instituto Pasteur bajo el número de registro CNCM I-4696 o una variante de la misma, en la que la variante tiene la misma actividad lítica, preferiblemente la misma actividad lítica y las mismas características fenotípicas que dicha cepa de bacteriófagos P3.
- 20 10. Una composición según una cualquiera de las realizaciones 1 a 9, en la que la composición comprende la cepa de bacteriófagos P4 depositada en la Colección Nacional Francesa de Microorganismos en el Instituto Pasteur bajo el número de registro CNCM I-4697 o una variante de la misma, en la que la variante tiene la misma actividad lítica, preferiblemente la misma actividad lítica y las mismas características fenotípicas que dicha cepa de bacteriófagos P4.
- 25 11. Una composición según una cualquiera de las realizaciones 1 a 10, en la que la composición comprende la cepa de bacteriófagos P5 depositada en la Colección Nacional Francesa de Microorganismos en el Instituto Pasteur bajo el número de registro CNCM I-4698 o una variante de la misma, en la que la variante tiene la misma actividad lítica, preferiblemente la misma actividad lítica y las mismas características fenotípicas que dicha cepa de bacteriófagos P5.
- 30 12. Una composición según una cualquiera de las realizaciones 1 a 11, en la que la composición comprende la cepa de bacteriófagos P6 depositada en la Colección Nacional Francesa de Microorganismos en el Instituto Pasteur bajo el número de registro CNCM I-4699 o una variante de la misma, en la que la variante tiene la misma actividad lítica, preferiblemente la misma actividad lítica y las mismas características fenotípicas que dicha cepa de bacteriófagos P6.
- 35 40 13. Una composición según una cualquiera de las realizaciones 1 a 12, en la que la composición comprende la cepa de bacteriófagos P8 depositada en la Colección Nacional Francesa de Microorganismos en el Instituto Pasteur bajo el número de registro CNCM I-4700 o una variante de la misma, en la que la variante tiene la misma actividad lítica, preferiblemente la misma actividad lítica y las mismas características fenotípicas que dicha cepa de bacteriófagos P8.
- 45 14. Una composición según una cualquiera de las realizaciones 1 a 13 en la que la composición comprende cepa de bacteriófagos CLB_P2 depositada en la Colección Nacional Francesa de Microorganismos en el Instituto Pasteur bajo el número de registro CNCM I-4675 o una variante de la misma, en la que la variante tiene la misma actividad lítica, preferiblemente la misma actividad lítica y las mismas características fenotípicas que dicha cepa de bacteriófagos CLB_P2.
- 50 15. Un método de tratamiento de enfermedad inflamatoria intestinal que comprende administrar a un sujeto que lo necesita al menos una cepa de bacteriófagos capaz de producir una infección lítica en una cepa de *Escherichia coli* adherente-invasiva tratando de ese modo al sujeto.
- 55 16. Un método según la realización 15 en el que la cepa de *Escherichia coli* adherente-invasiva está presente en una o más de las partes del intestino (delgado y grueso) del sujeto.
- 60 17. Un método según la realización 15 en el que la cepa de *Escherichia coli* adherente-invasiva es LF82, una cepa representada en la tabla 1 en el presente documento o una cepa representada en la tabla 2 de Darfeuille-Michaud *et al.* (2004), *Gastroenterology* 127:412-421.
- 65 18. Un método según una cualquiera de las realizaciones 15 a 17, en el que la enfermedad inflamatoria intestinal es enfermedad de Crohn.

19. Un método según una cualquiera de las realizaciones 15 a 18, en el que la enfermedad inflamatoria intestinal es colitis ulcerosa.
- 5 20. Un método según una cualquiera de las realizaciones 15 a 19, en el que la al menos una cepa de bacteriófagos comprende la cepa de bacteriófagos P1 depositada en la Colección Nacional Francesa de Microorganismos en el Instituto Pasteur bajo el número de registro CNCM I-4694 o una variante de la misma, en la que la variante tiene la misma actividad lítica, preferiblemente la misma actividad lítica y las mismas características fenotípicas que dicha cepa de bacteriófagos P1.
- 10 21. Un método según una cualquiera de las realizaciones 15 a 20, en el que la al menos una cepa de bacteriófagos comprende la cepa de bacteriófagos P2 depositada en la Colección Nacional Francesa de Microorganismos en el Instituto Pasteur bajo el número de registro CNCM I-4695 o una variante de la misma, en la que la variante tiene la misma actividad lítica, preferiblemente la misma actividad lítica y las mismas características fenotípicas que dicha cepa de bacteriófagos P2.
- 15 22. Un método según una cualquiera de las realizaciones 15 a 21, en el que la al menos una cepa de bacteriófagos comprende la cepa de bacteriófagos P3 depositada en la Colección Nacional Francesa de Microorganismos en el Instituto Pasteur bajo el número de registro CNCM I-4696 o una variante de la misma, en la que la variante tiene la misma actividad lítica, preferiblemente la misma actividad lítica y las mismas características fenotípicas que dicha cepa de bacteriófagos P3.
- 20 23. Un método según una cualquiera de las realizaciones 15 a 22, en el que la al menos una cepa de bacteriófagos comprende la cepa de bacteriófagos P4 depositada en la Colección Nacional Francesa de Microorganismos en el Instituto Pasteur bajo el número de registro CNCM I-4697 o una variante de la misma, en la que la variante tiene la misma actividad lítica, preferiblemente la misma actividad lítica y las mismas características fenotípicas que dicha cepa de bacteriófagos P4.
- 25 24. Un método según una cualquiera de las realizaciones 15 a 23, en el que la al menos una cepa de bacteriófagos comprende la cepa de bacteriófagos P5 depositada en la Colección Nacional Francesa de Microorganismos en el Instituto Pasteur bajo el número de registro CNCM I-4698 o una variante de la misma, en la que la variante tiene la misma actividad lítica, preferiblemente la misma actividad lítica y las mismas características fenotípicas que dicha cepa de bacteriófagos P5.
- 30 25. Un método según una cualquiera de las realizaciones 15 a 24, en el que la al menos una cepa de bacteriófagos comprende la cepa de bacteriófagos P6 depositada en la Colección Nacional Francesa de Microorganismos en el Instituto Pasteur bajo el número de registro CNCM I-4699 o una variante de la misma, en la que la variante tiene la misma actividad lítica, preferiblemente la misma actividad lítica y las mismas características fenotípicas que dicha cepa de bacteriófagos P6.
- 35 26. Un método según una cualquiera de las realizaciones 15 a 25, en el que la al menos una cepa de bacteriófagos comprende la cepa de bacteriófagos P8 depositada en la Colección Nacional Francesa de Microorganismos en el Instituto Pasteur bajo el número de registro CNCM I-4700 o una variante de la misma, en la que la variante tiene la misma actividad lítica, preferiblemente la misma actividad lítica y las mismas características fenotípicas que dicha cepa de bacteriófagos P8.
- 40 27. Un método según una cualquiera de las realizaciones 15 a 26, en el que la al menos una cepa de bacteriófagos comprende la cepa de bacteriófagos CLB_P2 depositada en la Colección Nacional Francesa de Microorganismos en el Instituto Pasteur bajo el número de registro CNCM I-4675 o una variante de la misma, en la que la variante tiene la misma actividad lítica, preferiblemente la misma actividad lítica y las mismas características fenotípicas que dicha cepa de bacteriófagos CLB_P2,
- 45 50 28. Un método según una cualquiera de las realizaciones 15 a 27, en el que la administración es administración oral.
- 55 29. Cepa de bacteriófagos P1 depositada en la Colección Nacional Francesa de Microorganismos en el Instituto Pasteur bajo el número de registro CNCM I-4694 o una variante de la misma, en la que la variante tiene la misma actividad lítica, preferiblemente la misma actividad lítica y las mismas características fenotípicas que dicha cepa de bacteriófagos.
- 60 30. Cepa de bacteriófagos P2 depositada en la Colección Nacional Francesa de Microorganismos en el Instituto Pasteur bajo el número de registro CNCM I-4695 o una variante de la misma, en la que la variante tiene la misma actividad lítica, preferiblemente la misma actividad lítica y las mismas características fenotípicas que dicha cepa de bacteriófagos.
- 65 31. Cepa de bacteriófagos P3 depositada en la Colección Nacional Francesa de Microorganismos en el Instituto Pasteur bajo el número de registro CNCM I-4696 o una variante de la misma, en la que la variante tiene la misma actividad lítica, preferiblemente la misma actividad lítica y las mismas características fenotípicas que dicha cepa de

bacteriófagos.

5 32. Cepa de bacteriófagos P4 depositada en la Colección Nacional Francesa de Microorganismos en el Instituto Pasteur bajo el número de registro CNCM I-4697 o una variante de la misma, en la que la variante tiene la misma actividad lítica, preferiblemente la misma actividad lítica y las mismas características fenotípicas que dicha cepa de bacteriófagos.

10 33. Cepa de bacteriófagos P5 depositada en la Colección Nacional Francesa de Microorganismos en el Instituto Pasteur bajo el número de registro CNCM I-4698 o una variante de la misma, en la que la variante tiene la misma actividad lítica, preferiblemente la misma actividad lítica y las mismas características fenotípicas que dicha cepa de bacteriófagos.

15 34. Cepa de bacteriófagos P6 depositada en la Colección Nacional Francesa de Microorganismos en el Instituto Pasteur bajo el número de registro CNCM I-4699 o una variante de la misma, en la que la variante tiene la misma actividad lítica, preferiblemente la misma actividad lítica y las mismas características fenotípicas que dicha cepa de bacteriófagos.

20 35. Cepa de bacteriófagos P8 depositada en la Colección Nacional Francesa de Microorganismos en el Instituto Pasteur bajo el número de registro CNCM I-4700 o una variante de la misma, en la que la variante tiene la misma actividad lítica, preferiblemente la misma actividad lítica y las mismas características fenotípicas que dicha cepa de bacteriófagos.

Lista de secuencias

25 <110> Ferring B.V.
Instituto Pasteur

<120> TERAPIA DE BACTERIÓFAGOS

30 <130> HE 171 371

<150> Documento EP 13305568.1
<151> 30-04-2013

35 <160> 45

<170> BiSSAP 1.3

40 <210> 1
<211> 368
<212> PRT
<213> Bacteriófago wV8

45 <400> 1

ES 2 740 124 T3

Met Leu Thr Asn Ser Glu Lys Ser Arg Phe Phe Leu Ala Asp Leu Thr
 1 5 10 15
 Gly Glu Val Gln Ser Ile Pro Asn Thr Tyr Gly Tyr Ile Ser Asn Leu
 20 25 30
 Gly Leu Phe Arg Ser Ala Pro Ile Thr Gln Thr Thr Phe Leu Met Asp
 35 40 45
 Leu Thr Asp Trp Asp Val Ser Leu Leu Asp Ala Val Asp Arg Asp Ser
 50 55 60
 Arg Lys Ala Glu Thr Ser Ala Pro Glu Arg Val Arg Gln Ile Ser Phe
 65 70 75 80
 Pro Met Met Tyr Phe Lys Glu Val Glu Ser Ile Thr Pro Asp Glu Ile
 85 90 95
 Gln Gly Val Arg Gln Pro Gly Thr Ala Asn Glu Leu Thr Thr Glu Ala
 100 105 110
 Val Val Arg Ala Lys Lys Leu Met Lys Ile Arg Thr Lys Phe Asp Ile
 115 120 125
 Thr Arg Glu Phe Leu Phe Met Gln Ala Leu Lys Gly Lys Val Val Asp
 130 135 140
 Ala Arg Gly Thr Leu Tyr Ala Asp Leu Tyr Lys Gln Phe Asp Val Glu
 145 150 155 160
 Lys Lys Thr Val Tyr Phe Asp Leu Asp Asn Pro Asn Ala Asp Ile Asp
 165 170 175
 Ala Ala Ile Glu Glu Leu Arg Met His Met Glu Asp Glu Ala Lys Thr
 180 185 190
 Gly Thr Val Ile Asn Gly Glu Glu Ile His Val Val Val Asp Arg Leu
 195 200 205
 Phe Phe Ser Lys Leu Val Lys His Pro Lys Ile Arg Asp Ala Tyr Leu
 210 215 220
 Ala Gln Gln Thr Pro Leu Ala Trp Gln Gln Ile Thr Gly Ser Leu Arg
 225 230 235 240
 Thr Gly Gly Thr Asp Gly Val Gln Ala His Met Asn Thr Phe Tyr Tyr
 245 250 255
 Gly Gly Val Lys Phe Val Gln Tyr Asn Gly Lys Phe Lys Asp Lys Arg
 260 265 270
 Gly Lys Val His Thr Leu Val Ser Ile Asp Ser Val Ala Ala Thr Val
 275 280 285
 Gly Val Gly His Ala Phe Pro Asn Val Ser Met Leu Gly Glu Ala Asn
 290 295 300
 Asn Ile Phe Glu Val Ala Tyr Gly Pro Cys Pro Lys Met Gly Tyr Ala
 305 310 315 320
 Asn Thr Leu Gly Gln Glu Leu Tyr Val Phe Glu Tyr Glu Lys Asp Arg
 325 330 335
 Asp Glu Gly Ile Asp Phe Glu Ala His Ser Tyr Met Leu Pro Tyr Cys
 340 345 350
 Thr Arg Pro Gln Leu Leu Val Asp Val Arg Ser Asp Ala Lys Pro Asp
 355 360 365

<210> 2
 5 <211> 27
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 10 <223> Péptido de la cepa de bacteriófagos P1 que se alinea con la posición 10-36 de la proteína de cápside principal de bacteriófago wV8 (SEQ ID NO: 1)

<400> 2

Phe Phe Leu Ala Asp Leu Thr Gly Glu Val Gln Ser Ile Pro Asn Thr
 1 5 10 15
 Tyr Gly Tyr Ile Ser Asn Leu Gly Leu Phe Arg
 20 25

15

ES 2 740 124 T3

<210> 3
 <211> 55
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Péptido de la cepa de bacteriófagos P2 que se alinea con la posición 8-62 de la proteína de cápside principal de bacteriófago wV8 (SEQ ID NO: 1)
 10
 <400> 3

 Ser Arg Phe Phe Leu Ala Asp Leu Thr Gly Glu Val Gln Ser Ile Pro
 1 5 10 15
 Asn Thr Tyr Gly Tyr Ile Ser Asn Leu Gly Leu Phe Arg Ser Ala Pro
 20 25 30
 Ile Thr Gln Thr Thr Phe Leu Met Asp Leu Thr Asp Trp Asp Val Ser
 35 40 45
 Leu Leu Asp Ala Val Asp Arg
 50 55

 15 <210> 4
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 20 <220>
 <223> Péptido de la cepa de bacteriófagos P1-P6 que se alinea con la posición 77-115 de la proteína de cápside principal de bacteriófago wV8 (SEQ ID NO: 1)

 <400> 4
 25
 Gln Ile Ser Phe Pro Met Met Tyr Phe Lys Glu Val Glu Ser Ile Thr
 1 5 10 15
 Pro Asp Glu Ile Gln Gly Val Arg Gln Pro Gly Thr Ala Asn Glu Leu
 20 25 30
 Thr Thr Glu Ala Val Val Arg
 35

 <210> 5
 <211> 16
 30 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Péptido de la cepa de bacteriófagos P1-P6 que se alinea con la posición 124-139 de la proteína de cápside principal de bacteriófago wV8 (SEQ ID NO: 1)
 35
 <400> 5

 Thr Lys Phe Asp Ile Thr Arg Glu Phe Leu Phe Met Gln Ala Leu Lys
 1 5 10 15

 40 <210> 6
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 45 <220>
 <223> Péptido de la cepa de bacteriófagos P1-P5 que se alinea con la posición 147-155 de la proteína de cápside principal de bacteriófago wV8 (SEQ ID NO: 1)

 50 <400> 6

ES 2 740 124 T3

<210> 11
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Péptido de la cepa de bacteriófagos P1 y P3-P6 que se alinea con la posición 192-207 de la proteína de cápside principal de bacteriófago wV8 (SEQ ID NO: 1)
 10 <400> 11
 Thr Gly Thr Val Ile Asn Gly Glu Glu Ile His Val Val Val Asp Arg
 1 5 10 15
 <210> 12
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> Péptido de la cepa de bacteriófagos P2 que se alinea con la posición 192-212 de la proteína de cápside principal de bacteriófago wV8 (SEQ ID NO: 1)
 20 <400> 12
 Thr Gly Thr Val Ile Asn Gly Glu Glu Ile His Val Val Val Asp Arg
 1 5 10 15
 Leu Phe Phe Ser Lys
 20
 25
 <210> 13
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 30
 <220>
 <223> Péptido de la cepa de bacteriófagos P1 que se alinea con la posición 219-240 de la proteína de cápside principal de bacteriófago wV8 (SEQ ID NO: 1)
 35 <400> 13
 Ile Arg Asp Ala Tyr Leu Ala Gln Gln Thr Pro Leu Ala Trp Gln Gln
 1 5 10 15
 Ile Thr Gly Ser Leu Arg
 20
 40
 <210> 14
 <211> 49
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 45
 <220>
 <223> Péptido de la cepa de bacteriófagos P2 que se alinea con la posición 219-267 de la proteína de cápside principal de bacteriófago wV8 (SEQ ID NO: 1)
 50 <400> 14
 Ile Arg Asp Ala Tyr Leu Ala Gln Gln Thr Pro Leu Ala Trp Gln Gln
 1 5 10 15
 Ile Thr Gly Ser Leu Arg Thr Gly Gly Thr Asp Gly Val Gln Ala His
 20 25 30
 Met Asn Thr Phe Tyr Tyr Gly Gly Val Lys Phe Val Gln Tyr Asn Gly
 35 40 45
 Lys

ES 2 740 124 T3

<210> 15
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Péptido de la cepa de bacteriófagos P3-P4 que se alinea con la posición 221-240 de la proteína de cápside principal de bacteriófago wV8 (SEQ ID NO: 1)
 10 <400> 15
 Asp Ala Tyr Leu Ala Gln Gln Thr Pro Leu Ala Trp Gln Gln Ile Thr
 1 5 10 15
 Gly Ser Leu Arg
 20
 <210> 16
 15 <211> 47
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido de la cepa de bacteriófagos P5 que se alinea con la posición 221-267 de la proteína de cápside principal de bacteriófago wV8 (SEQ ID NO: 1)
 20 <400> 16
 Asp Ala Tyr Leu Ala Gln Gln Thr Pro Leu Ala Trp Gln Gln Ile Thr
 1 5 10 15
 Gly Ser Leu Arg Thr Gly Gly Ala Asp Gly Val Gln Ala His Met Asn
 20 25 30
 Thr Phe Tyr Tyr Gly Gly Val Lys Phe Val Gln Tyr Asn Gly Lys
 25 35 40 45
 <210> 17
 <211> 40
 <212> PRT
 30 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido de la cepa de bacteriófagos P6 que se alinea con la posición 221-260 de la proteína de cápside principal de bacteriófago wV8 (SEQ ID NO: 1)
 35 <400> 17
 Asp Ala Tyr Leu Ala Gln Gln Thr Pro Leu Ala Trp Gln Gln Ile Thr
 1 5 10 15
 Gly Ser Leu Arg Thr Gly Gly Ala Asp Gly Val Gln Ala His Met Asn
 20 25 30
 Thr Phe Tyr Tyr Gly Gly Val Lys
 35 40
 <210> 18
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> Péptido de la cepa de bacteriófagos P1, P3 y P4 que se alinea con la posición 261-267 de la proteína de cápside principal de bacteriófago wV8 (SEQ ID NO: 1)
 <400> 18
 50 Phe Val Gln Tyr Asn Gly Lys
 1 5

ES 2 740 124 T3

<210> 19
<211> 20
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5

<220>
<223> Péptido de la cepa de bacteriófagos P1-P2 que se alinea con la posición 317-336 de la proteína de cápside principal de bacteriófago wV8 (SEQ ID NO: 1)

10

<400> 19

Met	Gly	Tyr	Ala	Asn	Thr	Leu	Gly	Gln	Glu	Leu	Tyr	Val	Phe	Glu	Tyr
1				5				10					15		
Glu	Lys	Asp	Arg												
			20												

15

<210> 20
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20

<220>
<223> Péptido de la cepa de bacteriófagos P1-P6 que se alinea con la posición 355-362 de la proteína de cápside principal de bacteriófago wV8 (SEQ ID NO: 1)

<400> 20

Pro	Gln	Leu	Leu	Val	Asp	Val	Arg
1				5			

25

<210> 21
<211> 522
<212> PRT
<213> Bacteriófago RB69

30

<400> 21

ES 2 740 124 T3

Met Thr Thr Ile Lys Thr Lys Ala Gln Leu Val Asp Lys Trp Lys Glu
1 5 10 15
Leu Leu Glu Gly Glu Gly Leu Pro Glu Ile Ala Asn Ser Lys Gln Ala
20 25 30
Ile Ile Ala Lys Ile Phe Glu Asn Gln Glu Lys Asp Phe Glu Val Ser
35 40 45
Pro Glu Tyr Lys Asp Glu Lys Ile Ala Gln Ala Phe Gly Ser Phe Leu
50 55 60
Thr Glu Ala Glu Ile Gly Gly Asp His Gly Tyr Asn Ala Gln Asn Ile
65 70 75 80
Ala Ala Gly Gln Thr Ser Gly Ala Val Thr Gln Ile Gly Pro Ala Val
85 90 95
Met Gly Met Val Arg Arg Ala Ile Pro Asn Leu Ile Ala Phe Asp Ile
100 105 110
Cys Gly Val Gln Pro Met Asn Ser Pro Thr Gly Gln Val Phe Ala Leu
115 120 125
Arg Ala Val Tyr Gly Lys Asp Pro Ile Ala Ala Gly Ala Lys Glu Ala
130 135 140
Phe His Pro Met Tyr Ala Pro Asp Ala Met Phe Ser Gly Gln Gly Ala
145 150 155 160
Ala Lys Lys Phe Pro Ala Leu Ala Ala Ser Thr Gln Thr Lys Val Gly
165 170 175
Asp Ile Tyr Thr His Phe Phe Gln Glu Thr Gly Thr Val Tyr Leu Gln
180 185 190
Ala Ser Ala Gln Val Thr Ile Ser Ser Ser Ala Asp Asp Ala Ala Lys
195 200 205
Leu Asp Ala Glu Ile Ile Lys Gln Met Glu Ala Gly Ala Leu Val Glu
210 215 220
Ile Ala Glu Gly Met Ala Thr Ser Ile Ala Glu Leu Gln Glu Gly Phe
225 230 235 240
Asn Gly Ser Thr Asp Asn Pro Trp Asn Glu Met Gly Phe Arg Ile Asp
245 250 255
Lys Gln Val Ile Glu Ala Lys Ser Arg Gln Leu Lys Ala Ala Tyr Ser
260 265 270
Ile Glu Leu Ala Gln Asp Leu Arg Ala Val His Gly Met Asp Ala Asp
275 280 285
Ala Glu Leu Ser Gly Ile Leu Ala Thr Glu Ile Met Leu Glu Ile Asn
290 295 300
Arg Glu Val Val Asp Trp Ile Asn Tyr Ser Ala Gln Val Gly Lys Ser
305 310 315 320
Gly Met Thr Asn Ile Val Gly Ser Lys Ala Gly Val Phe Asp Phe Gln
325 330 335
Asp Pro Ile Asp Ile Arg Gly Ala Arg Trp Ala Gly Glu Ser Phe Lys
340 345 350
Ala Leu Leu Phe Gln Ile Asp Lys Glu Ala Val Glu Ile Ala Arg Gln
355 360 365
Thr Gly Arg Gly Glu Gly Asn Phe Ile Ile Ala Ser Arg Asn Val Val
370 375 380
Asn Val Leu Ala Ser Val Asp Thr Gly Ile Ser Tyr Ala Ala Gln Gly
385 390 395 400
Leu Ala Ser Gly Phe Asn Thr Asp Thr Thr Lys Ser Val Phe Ala Gly
405 410 415
Val Leu Gly Gly Lys Tyr Arg Val Tyr Ile Asp Gln Tyr Ala Lys Gln
420 425 430
Asp Tyr Phe Thr Val Gly Tyr Lys Gly Ala Asn Glu Met Asp Ala Gly
435 440 445

ES 2 740 124 T3

Ile Tyr Tyr Ala Pro Tyr Val Ala Leu Thr Pro Leu Arg Gly Ser Asp
 450 455 460
 Pro Lys Asn Phe Gln Pro Val Met Gly Phe Lys Thr Arg Tyr Gly Ile
 465 470 475 480
 Gly Val Asn Pro Phe Ala Glu Ser Ser Leu Gln Ala Pro Gly Ala Arg
 485 490 495
 Ile Gln Ser Gly Met Pro Ser Ile Leu Asn Ser Leu Gly Lys Asn Ala
 500 505 510
 Tyr Phe Arg Arg Val Tyr Val Lys Gly Ile
 515 520

<210> 22
 <211> 20
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Péptido de la cepa de bacteriófagos P8 que se alinea con la posición 143-162 de la proteína de cápside principal de bacteriófago RB69 (SEQ ID NO: 21)

<400> 22

Glu Ala Phe His Pro Met Tyr Ala Pro Asp Ala Met Phe Ser Gly Gln
 1 5 10 15
 Gly Ala Ala Lys
 20

15 <210> 23
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Péptido de la cepa de bacteriófagos P8 que se alinea con la posición 269-280 de la proteína de cápside principal de bacteriófago RB69 (SEQ ID NO: 21)

<400> 23

Ala Ala Tyr Ser Ile Glu Leu Ala Gln Asp Leu Arg
 1 5 10

30 <210> 24
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Péptido de la cepa de bacteriófagos P8 que se alinea con la posición 306-319 de la proteína de cápside principal de bacteriófago RB69 (SEQ ID NO: 21)

<400> 24

Glu Val Val Asp Trp Ile Asn Tyr Ser Ala Gln Val Gly Lys
 1 5 10

45 <210> 25
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Péptido de la cepa de bacteriófagos P8 que se alinea con la posición 330-342 de la proteína de cápside principal de bacteriófago RB69 (SEQ ID NO: 21)

<400> 25

ES 2 740 124 T3

Ala Gly Val Phe Asp Phe Gln Asp Pro Ile Asp Ile Arg
 1 5 10

5 <210> 26
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 10 <223> Péptido de la cepa de bacteriófagos P8 que se alinea con la posición 346-352 de la proteína de cápside principal de bacteriófago RB69 (SEQ ID NO: 21)

<400> 26

Trp Ala Gly Glu Ser Phe Lys
 15 1 5

<210> 27
 <211> 14
 <212> PRT
 20 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Péptido de la cepa de bacteriófagos P8 que se alinea con la posición 368-381 de la proteína de cápside principal de bacteriófago RB69 (SEQ ID NO: 21)

25 <400> 27

Gln Thr Gly Arg Gly Glu Gly Asn Phe Ile Ile Ala Ser Arg
 1 5 10

30 <210> 28
 <211> 50
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Péptido de la cepa de bacteriófagos P8 que se alinea con la posición 412-461 de la proteína de cápside principal de bacteriófago RB69 (SEQ ID NO: 21)

<400> 28

40 Ser Val Phe Ala Gly Val Leu Gly Gly Lys Tyr Arg Val Tyr Ile Asp
 1 5 10 15
 Gln Tyr Ala Lys Gln Asp Tyr Phe Thr Val Gly Tyr Lys Gly Ala Asn
 20 25 30
 Glu Met Asp Ala Gly Ile Tyr Tyr Ala Pro Tyr Val Ala Leu Thr Pro
 35 40 45
 Leu Arg
 50

<210> 29
 <211> 44
 45 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Péptido de la cepa de bacteriófagos P8 que se alinea con la posición 467-510 de la proteína de cápside principal de bacteriófago RB69 (SEQ ID NO: 21)

50 <400> 29

ES 2 740 124 T3

Asn	Phe	Gln	Pro	Val	Met	Gly	Phe	Lys	Thr	Arg	Tyr	Gly	Ile	Gly	Val
1				5					10					15	
Asn	Pro	Phe	Ala	Glu	Ser	Ser	Leu	Gln	Ala	Pro	Gly	Ala	Arg	Ile	Gln
			20					25					30		
Ser	Gly	Met	Pro	Ser	Ile	Leu	Asn	Ser	Leu	Gly	Lys				
		35					40								

5 <210> 30
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Todos los cebadores directos de genes 16S de bacterias

<400> 30
 cgtgaatac gttccgg 18

15 <210> 31
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Todos los cebadores inversos de genes 16S de bacterias

<400> 31
 tacggctacc ttgttacgac tt 22

25 <210> 32
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Cebador directo de genes 16 de *E. coli*

<400> 32
 catgccgct gtatgaagaa 20

35 <210> 33
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Cebador inverso de genes 16S de *E. coli*

<400> 33
 cgggtaacgt caatgagcaa a 21

45 <210> 34
 <211> 519
 <212> PRT

50 <213> Bacteriófago JS98

<400> 34

ES 2 740 124 T3

Met Lys Lys Asn Ala Leu Val Gln Lys Trp Ser Ala Leu Leu Glu Asn
1 5 10 15
Glu Ala Leu Pro Glu Ile Val Gly Ala Ser Lys Gln Ala Ile Ile Ala
20 25 30
Lys Ile Phe Glu Asn Gln Glu Gln Asp Ile Leu Thr Ala Pro Glu Tyr
35 40 45
Arg Asp Glu Lys Ile Ser Glu Ala Phe Gly Ser Phe Leu Thr Glu Ala
50 55 60
Glu Ile Gly Gly Asp His Gly Tyr Asp Ala Thr Asn Ile Ala Ala Gly
65 70 75 80
Gln Thr Ser Gly Ala Val Thr Gln Ile Gly Pro Ala Val Met Gly Met
85 90 95
Val Arg Arg Ala Ile Pro His Leu Ile Ala Phe Asp Ile Cys Gly Val
100 105 110
Gln Pro Leu Asn Asn Pro Thr Gly Gln Val Phe Ala Leu Arg Ala Val
115 120 125
Tyr Gly Lys Asp Pro Ile Ala Ala Gly Ala Lys Glu Ala Phe His Pro
130 135 140
Met Tyr Ala Pro Asn Ala Met Phe Ser Gly Gln Gly Ala Ala Glu Thr
145 150 155 160
Phe Glu Ala Leu Ala Ala Ser Lys Val Leu Glu Val Gly Lys Ile Tyr
165 170 175
Ser His Phe Phe Glu Ala Thr Gly Ser Ala His Phe Gln Ala Val Glu
180 185 190
Ala Val Thr Val Asp Ala Gly Ala Thr Asp Ala Ala Lys Leu Asp Ala
195 200 205
Ala Val Thr Ala Leu Val Glu Ala Gly Gln Leu Ala Glu Ile Ala Glu
210 215 220
Gly Met Ala Thr Ser Ile Ala Glu Leu Gln Glu Gly Phe Asn Gly Ser
225 230 235 240
Thr Asp Asn Pro Trp Asn Glu Met Gly Phe Arg Ile Asp Lys Gln Val
245 250 255
Ile Glu Ala Lys Ser Arg Gln Leu Lys Ala Ser Tyr Ser Ile Glu Leu
260 265 270
Ala Gln Asp Leu Arg Ala Val His Gly Met Asp Ala Asp Ala Glu Leu
275 280 285
Ser Gly Ile Leu Ala Thr Glu Ile Met Leu Glu Ile Asn Arg Glu Val
290 295 300
Ile Asp Trp Ile Asn Tyr Ser Ala Gln Val Gly Lys Ser Gly Met Thr
305 310 315 320
Asn Thr Val Gly Ala Lys Ala Gly Val Phe Asp Phe Gln Asp Pro Ile
325 330 335
Asp Ile Arg Gly Ala Arg Trp Ala Gly Glu Ser Phe Lys Ala Leu Leu
340 345 350
Phe Gln Ile Asp Lys Glu Ala Ala Glu Ile Ala Arg Gln Thr Gly Arg
355 360 365
Gly Ala Gly Asn Phe Ile Ile Ala Ser Arg Asn Val Val Asn Val Leu
370 375 380
Ala Ala Val Asp Thr Ser Val Ser Tyr Ala Ala Gln Gly Leu Gly Gln
385 390 395 400
Gly Phe Asn Val Asp Thr Thr Lys Ala Val Phe Ala Gly Val Leu Gly
405 410 415
Gly Lys Tyr Arg Val Tyr Ile Asp Gln Tyr Ala Arg Ser Asp Tyr Phe
420 425 430
Thr Ile Gly Tyr Lys Gly Ser Asn Glu Met Asp Ala Gly Ile Tyr Tyr
435 440 445
Ala Pro Tyr Val Ala Leu Thr Pro Leu Arg Gly Ser Asp Pro Lys Asn
450 455 460
Phe Gln Pro Val Met Gly Phe Lys Thr Arg Tyr Gly Ile Gly Ile Asn
465 470 475 480
Pro Phe Ala Asp Pro Ala Ala Gln Ala Pro Thr Lys Arg Ile Gln Asn
485 490 495
Gly Met Pro Asp Ile Val Asn Ser Leu Gly Leu Asn Gly Tyr Phe Arg

ES 2 740 124 T3

		500		505		510
	Arg Val Tyr	Val Lys Gly Ile				
		515				
	<210> 35					
	<211> 13					
5	<212> PRT					
	<213> Secuencia artificial					
	<220>					
10	<223> Péptido de la cepa de bacteriófagos CLB_P2 que se alinea con la posición 127-139 de la proteína de cápside principal de bacteriófago JS98 (SEQ ID NO: 34)					
	<400> 35					
	Ala Val Tyr Gly Lys Asp Pro Ile Ala Ala Gly Ala Lys					
	1	5		10		
15	<210> 36					
	<211> 12					
	<212> PRT					
	<213> Secuencia artificial					
20	<220>					
	<223> Péptido de la cepa de bacteriófagos CLB_P2 que se alinea con la posición 266-277 de la proteína de cápside principal de bacteriófago JS98 (SEQ ID NO: 34)					
	<400> 36					
25	Ala Ser Tyr Ser Ile Glu Leu Ala Gln Asp Leu Arg					
	1	5		10		
	<210> 37					
30	<211> 14					
	<212> PRT					
	<213> Secuencia artificial					
	<220>					
35	<223> Péptido de la cepa de bacteriófagos CLB_P2 que se alinea con la posición 303-316 de la proteína de cápside principal de bacteriófago JS98 (SEQ ID NO: 34)					
	<400> 37					
	Glu Val Ile Asp Trp Ile Asn Tyr Ser Ala Gln Val Gly Lys					
40	1	5		10		
	<210> 38					
	<211> 13					
	<212> PRT					
45	<213> Secuencia artificial					
	<220>					
	<223> Péptido de la cepa de bacteriófagos CLB_P2 que se alinea con la posición 327-339 de la proteína de cápside principal de bacteriófago JS98 (SEQ ID NO: 34)					
50	<400> 38					
	Ala Gly Val Phe Asp Phe Gln Asp Pro Ile Asp Ile Arg					
	1	5		10		
55	<210> 39					
	<211> 22					
	<212> PRT					
	<213> Secuencia artificial					

ES 2 740 124 T3

<220>

<223> Péptido de la cepa de bacteriófagos CLB_P2 que se alinea con la posición 343-364 de la proteína de cápside principal de bacteriófago JS98 (SEQ ID NO: 34)

5 <400> 39

Trp Ala Gly Glu Ser Phe Lys Ala Leu Leu Phe Gln Ile Asp Lys Glu
 1 5 10 15
 Ala Ala Glu Ile Ala Arg
 20

<210> 40

10 <211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Péptido de la cepa de bacteriófagos CLB_P2 que se alinea con la posición 369-378 de la proteína de cápside principal de bacteriófago JS98 (SEQ ID NO: 34)

<400> 40

Gly Ala Gly Asn Phe Ile Ile Ala Ser Arg
 20 1 5 10

<210> 41

<211> 20

<212> PRT

25 <213> Secuencia artificial

<220>

30 <223> Péptido de la cepa de bacteriófagos CLB_P2 que se alinea con la posición 409-428 de la proteína de cápside principal de bacteriófago JS98 (SEQ ID NO: 34)

<400> 41

Ala Val Phe Ala Gly Val Leu Gly Gly Lys Tyr Arg Val Tyr Ile Asp
 1 5 10 15
 Gln Tyr Ala Arg
 20

35 <210> 42

<211> 21

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

40 <220>

<223> Péptido de la cepa de bacteriófagos CLB_P2 que se alinea con la posición 438-458 de la proteína de cápside principal de bacteriófago JS98 (SEQ ID NO: 34)

<400> 42

45 Gly Ser Asn Glu Met Asp Ala Gly Ile Tyr Tyr Ala Pro Tyr Val Ala
 1 5 10 15
 Leu Thr Pro Leu Arg
 20

<210> 43

<211> 49

50 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

55 <223> Péptido de la cepa de bacteriófagos CLB_P2 que se alinea con la posición 464-512 de la proteína de cápside principal de bacteriófago JS98 (SEQ ID NO: 34)

ES 2 740 124 T3

<400> 43

Asn	Phe	Gln	Pro	Val	Met	Gly	Phe	Lys	Thr	Arg	Tyr	Gly	Ile	Gly	Ile
1				5					10					15	
Asn	Pro	Phe	Ala	Asp	Pro	Ala	Ala	Gln	Ala	Pro	Thr	Lys	Arg	Ile	Gln
			20					25					30		
Asn	Gly	Met	Pro	Asp	Ile	Val	Asn	Ser	Leu	Gly	Leu	Asn	Gly	Tyr	Phe
		35					40					45			

Arg

5

<210> 44

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> cebador directo para amplificar un gen específico (pMT1) de LF82

<400> 44

15 ccattcatgc agcagctctt t

21

<210> 45

<211> 21

<212> ADN

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador inverso para amplificar un gen específico (pMT1) de LF82

25 <400> 45

atcggacaac attagcggtg t

21

REIVINDICACIONES

1. Composición farmacéutica que comprende:
 - (i) al menos una cepa de bacteriófagos capaz de producir una infección lítica en una cepa de *Escherichia coli* adherente-invasiva; y
 - (ii) un portador farmacéuticamente aceptable;

para su uso en el tratamiento de enfermedad inflamatoria intestinal,

en la que la composición comprende al menos una de la cepa de bacteriófagos P1 depositada en la Colección Nacional Francesa de Microorganismos en el Instituto Pasteur bajo el número de registro CNCM I-4694 o una variante de la misma, en la que la variante tiene la misma actividad lítica y las mismas características fenotípicas que dicha cepa de bacteriófagos P1, la cepa de bacteriófagos P2 depositada en la Colección Nacional Francesa de Microorganismos en el Instituto Pasteur bajo el número de registro CNCM I-4695 o una variante de la misma, en la que la variante tiene la misma actividad lítica y las mismas características fenotípicas que dicha cepa de bacteriófagos P2, la cepa de bacteriófagos P3 depositada en la Colección Nacional Francesa de Microorganismos en el Instituto Pasteur bajo el número de registro CNCM I- 4696 o una variante de la misma, en la que la variante tiene la misma actividad lítica y las mismas características fenotípicas que dicha cepa de bacteriófagos P3, la cepa de bacteriófagos P4 depositada en la Colección Nacional Francesa de Microorganismos en el Instituto Pasteur bajo el número de registro CNCM I-4697 o una variante de la misma, en la que la variante tiene la misma actividad lítica y las mismas características fenotípicas que dicha cepa de bacteriófagos P4, la cepa de bacteriófagos P5 depositada en la Colección Nacional Francesa de Microorganismos en el Instituto Pasteur bajo el número de registro CNCM I-4698 o una variante de la misma, en la que la variante tiene la misma actividad lítica y las mismas características fenotípicas que dicha cepa de bacteriófagos P5, la cepa de bacteriófagos P6 depositada en la Colección Nacional Francesa de Microorganismos en el Instituto Pasteur bajo el número de registro CNCM I-4699 o una variante de la misma, en la que la variante tiene la misma actividad lítica y las mismas características fenotípicas que dicha cepa de bacteriófagos P6, la cepa de bacteriófagos P8 depositada en la Colección Nacional Francesa de Microorganismos en el Instituto Pasteur bajo el número de registro CNCM I-4700 o una variante de la misma, en la que la variante tiene la misma actividad lítica y las mismas características fenotípicas que dicha cepa de bacteriófagos P8 y la cepa de bacteriófagos CLB_P2 depositada en la Colección Nacional Francesa de Microorganismos en el Instituto Pasteur bajo el número de registro CNCM I-4675 o una variante de la misma, en la que la variante tiene la misma actividad lítica y las mismas características fenotípicas que dicha cepa de bacteriófagos CLB_P2,
2. Composición para su uso según la reivindicación 1, en la que la cepa de *Escherichia coli* adherente-invasiva está presente en una o más de las partes del intestino (delgado y grueso) del sujeto.
3. Composición para su uso según la reivindicación 1, en la que la cepa de *Escherichia coli* adherente-invasiva es LF82, 07081, 07082, 07076 ó 06075,
4. Composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que la enfermedad inflamatoria intestinal es enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa o recidiva de lesiones ileales después de la cirugía, por ejemplo cirugía para la extirpación de al menos una parte del intestino delgado en un paciente con EC.
5. Composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que la composición es para administración oral.
6. Cepa de bacteriófagos P1 depositada en la Colección Nacional Francesa de Microorganismos en el Instituto Pasteur bajo el número de registro CNCM I-4694 o una variante de la misma, en la que la variante tiene la misma actividad lítica y las mismas características fenotípicas que dicha cepa de bacteriófagos.
7. Cepa de bacteriófagos P2 depositada en la Colección Nacional Francesa de Microorganismos en el Instituto Pasteur bajo el número de registro CNCM I-4695 o una variante de la misma, en la que la variante tiene la misma actividad lítica y las mismas características fenotípicas que dicha cepa de bacteriófagos.
8. Cepa de bacteriófagos P3 depositada en la Colección Nacional Francesa de Microorganismos en el Instituto Pasteur bajo el número de registro CNCM I-4696 o una variante de la misma, en la que la variante tiene la misma actividad lítica y las mismas características fenotípicas que dicha cepa de bacteriófagos.
9. Cepa de bacteriófagos P4 depositada en la Colección Nacional Francesa de Microorganismos en el Instituto Pasteur bajo el número de registro CNCM I-4697 o una variante de la misma, en la que la variante tiene la misma actividad lítica y las mismas características fenotípicas que dicha cepa de bacteriófagos.

ES 2 740 124 T3

10. Cepa de bacteriófagos P5 depositada en la Colección Nacional Francesa de Microorganismos en el Instituto Pasteur bajo el número de registro CNCM I-4698 o una variante de la misma, en la que la variante tiene la misma actividad lítica y las mismas características fenotípicas que dicha cepa de bacteriófagos.
- 5 11. Cepa de bacteriófagos P6 depositada en la Colección Nacional Francesa de Microorganismos en el Instituto Pasteur bajo el número de registro CNCM I-4699 o una variante de la misma, en la que la variante tiene la misma actividad lítica y las mismas características fenotípicas que dicha cepa de bacteriófagos.
- 10 12. Cepa de bacteriófagos P8 depositada en la Colección Nacional Francesa de Microorganismos en el Instituto Pasteur bajo el número de registro CNCM I-4700 o una variante de la misma, en la que la variante tiene la misma actividad lítica y las mismas características fenotípicas que dicha cepa de bacteriófagos.