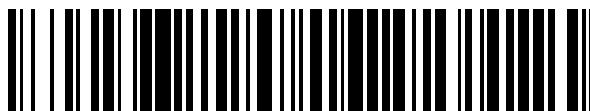


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 788 175**

51 Int. Cl.:

<b>C12N 7/00</b>	(2006.01)
<b>C12N 7/01</b>	(2006.01)
<b>C12N 7/02</b>	(2006.01)
<b>A61P 31/04</b>	(2006.01)
<b>A61K 35/76</b>	(2015.01)
<b>A23K 20/195</b>	(2006.01)
<b>A23K 20/153</b>	(2006.01)
<b>A23K 50/70</b>	(2006.01)
<b>A23K 50/75</b>	(2006.01)
<b>A23K 10/18</b>	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.04.2015 PCT/KR2015/003705**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **22.10.2015 WO15160165**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.04.2015 E 15779395 (1)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.03.2020 EP 3133151**

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

30 Prioridad:

**15.04.2014 KR 20140044997**

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

**20.10.2020**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**SHIN, EUN MI;  
BAE, GI DUK y  
KIM, JAE WON**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

ES 2 788 175 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Nuevo bacteriófago y composición que comprende el mismo

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un bacteriófago nuevo que tiene una capacidad específica para matar *Escherichia coli* patógena aviar (APEC; del inglés, Avian Pathogenic *Escherichia coli*) de los serotipos O-1, O-78 u O-125, a una composición que incluye el mismo y al bacteriófago para utilizar en la prevención de colibacilosis aviar causada por *Escherichia coli* patógena aviar de los serotipos O-1, O-78 u O-125.

**Antecedentes de la técnica**

*Escherichia coli* (en adelante, referida también como *E. coli*) es un bacilo corto Gram negativo del género *Escherichia*, familia *Enterobacteriaceae* y uno de los de la flora normal encontrada en los intestinos de varios animales, incluyendo mamíferos. La mayoría de las cepas de *Escherichia coli* no son patógenas y pueden causar una infección oportunista, pero algunas cepas altamente patógenas causan diversas enfermedades intestinales y sepsis en animales, incluyendo los seres humanos.

Entre estas cepas de *Escherichia coli*, *E. coli* patógena aviar causa infección a través del tracto respiratorio de aves tales como pollos, gansos, pavos y similares y se sabe que pasa al cuerpo del ave a través de la membrana mucosa respiratoria. Con respecto a las enfermedades respiratorias en aves *E. coli* patógena aviar causa enfermedades principalmente en aves de corral, lo que conlleva daños económicos enormes en la industria de aves de corral.

Por otra parte, un bacteriófago se refiere a un virus específico de bacterias que evita e inhibe el crecimiento de una bacteria infectada con un bacteriófago específico. Como los bacteriófagos tienen una especificidad por el hospedador más fuerte que los antibióticos y son problemas crecientes la emergencia reciente de bacterias resistentes a antibióticos y los antibióticos residuales en animales, la aplicación de bacteriófagos ha atraído gran interés.

Se han realizado activamente en muchos países estudios sobre bacteriófagos y ha habido una tendencia creciente para obtener aprobación de la Food and Drug Administration (FDA) para composiciones que utilizan bacteriófagos, además de aplicaciones de patente para bacteriófagos. Por ejemplo, el documento KR101381793 divulga el bacteriófago ΦCJ23 activo contra *E. coli* patógena, serotipo O-78. El ΦCJ23 es resistente al ácido, resistente al calor y tiene una resistencia a la sequía excelente.

Sin embargo, las tecnologías relacionadas con bacteriófagos para la prevención y/o tratamiento de enfermedades infecciosas, que son cuestiones importantes en la industria de la avicultura incluyendo la cría de aves de corral, debidas a *Escherichia coli* patógena aviar son insuficientes todavía y por tanto, hay necesidad de tales bacteriófagos y del desarrollo de tecnologías relevantes.

**Problema técnico**

Como resultado de una investigación seria encaminada a superar la emergencia de bacterias resistentes a antibióticos y los antibióticos residuales en animales y a prevenir eficazmente y tratar enfermedades infecciosas de aves, los presentes inventores aislaron de fuentes naturales un bacteriófago nuevo Φ CJ25 (KCCM11463P), que tiene una capacidad específica para matar *Escherichia coli* patógena aviar de los serotipos O-1, O-78 u O-125 que causan enfermedades respiratorias de aves de corral.

Además, los presentes inventores identificaron propiedades morfológicas, bioquímicas y genéticas del bacteriófago nuevo, confirmaron que el bacteriófago tiene una resistencia al ácido excelente, resistencia al calor y resistencia al secado y desarrollaron antibióticos, desinfectantes, aditivos para piensos y otras composiciones utilizando el bacteriófago, una composición para prevenir enfermedades infecciosas en aves y proporcionan un bacteriófago nuevo para utilizar en la prevención de colibacilosis aviar causada por *Escherichia coli* patógena aviar de los serotipos O-1, O-78 u O-125.

Un objetivo de la presente invención consiste en proporcionar un bacteriófago nuevo Φ CJ25 (KCCM11463P) que tiene una capacidad específica para matar *Escherichia coli* patógena aviar de los serotipos O-1, O-78 u O-125.

Otro objetivo de la presente invención consiste en proporcionar una composición para prevenir enfermedades infecciosas causadas por *Escherichia coli* patógena aviar de los serotipos O-1, O-78 u O-125, incluyendo el bacteriófago ΦCJ25 (KCCM11463P) como un ingrediente activo.

Un objetivo adicional de la presente invención consiste en proporcionar antibióticos, aditivos para piensos, aditivos para agua de bebida, piensos, agua de bebida, desinfectantes o detergentes, incluyendo el bacteriófago ΦCJ25 (KCCM11463P) como un ingrediente activo.

Un objetivo todavía adicional de la presente invención consiste en proporcionar el bacteriófago ΦCJ25 (KCCM11463P) o la composición que incluye el bacteriófago ΦCJ25 (KCCM11463P) como un ingrediente activo para usar en la prevención de colibacilosis aviar causada por *Escherichia coli* patógena aviar de los serotipos O-1, O-78 u O-125.

#### Solución técnica

Un aspecto de la presente invención proporciona un bacteriófago nuevo ΦCJ25 (KCCM11463P) que tiene una capacidad específica para matar *Escherichia coli* patógena aviar de los serotipos O-1, O-78 u O-125.

Otro aspecto de la presente invención proporciona una composición para prevenir enfermedades infecciosas causadas por *Escherichia coli* patógena aviar de los serotipos O-1, O-78 u O-125, incluyendo el bacteriófago ΦCJ25 (KCCM11463P) como un ingrediente activo.

Un objetivo adicional de la presente invención proporciona antibióticos, aditivos para piensos, aditivos para agua de bebida, piensos, agua de bebida, desinfectantes o detergentes, incluyendo el bacteriófago ΦCJ25 (KCCM11463P) como un ingrediente activo.

Un objetivo todavía adicional de la presente invención consiste en proporcionar el bacteriófago Φ CJ25 (KCCM11463P) o la composición que incluye el bacteriófago Φ CJ25 (KCCM11463P) como un ingrediente activo para usar en la prevención de colibacilosis aviar causada por *Escherichia coli* patógena aviar de los serotipos O-1, O-78 u O-125.

#### Efectos ventajosos

De acuerdo con la presente invención, el bacteriófago ΦCJ25 (KCCM11463P) tiene un efecto de tener una capacidad específica para matar *Escherichia coli* patógena aviar de los serotipos O-1, O-78 u O-125.

Adicionalmente, el bacteriófago ΦCJ25 (KCCM11463P) según la presente invención tiene una resistencia al ácido excelente, resistencia al calor y resistencia al secado y por tanto puede utilizarse no solo como un agente para prevenir enfermedades infecciosas provocadas por *Escherichia coli* patógena aviar de los serotipos O-1, O-78 u O-125 a diferentes intervalos de temperatura, pH y condiciones de sequedad, sino también como antibióticos, aditivos para piensos, aditivos para agua de bebida, piensos, agua de bebida, desinfectantes, detergentes y similares, que incluyen el bacteriófago ΦCJ25 (KCCM11463P) como un componente activo.

Adicionalmente, la presente invención proporciona el bacteriófago ΦCJ25 (KCCM11463P) o antibióticos que incluyen el mismo como un ingrediente activo y los antibióticos tienen efectos en los que los antibióticos tienen especificidad por *Escherichia coli* patógena aviar de los serotipos O-1, O-78 u O-125 en comparación con antibióticos anteriores y por tanto, matan selectivamente bacterias patógenas sin matar bacterias beneficiosas; y que los antibióticos no inducen resistencia a fármacos, dando lugar a una extensión de la vida de los productos en comparación con antibióticos previos.

Adicionalmente, la presente invención proporciona el bacteriófago Φ CJ25 (KCCM11463P) o la composición que incluye el bacteriófago Φ CJ25 (KCCM11463P) como un ingrediente activo para usar en la prevención de colibacilosis aviar causada por *Escherichia coli* patógena aviar de los serotipos O-1, O-78 u O-125.

#### Descripción de los dibujos

La Fig. 1 es una imagen de microscopía electrónica de un bacteriófago nuevo ΦCJ25 (KCCM11463P) (en adelante, referido como ΦCJ25).

La Fig. 2 muestra los resultados de electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) de un bacteriófago nuevo ΦCJ25.

La Fig. 3 muestra los resultados de electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato (SDS-PAGE) de un bacteriófago nuevo ΦCJ25.

La Fig. 4 es un gráfico que muestra los resultados de un experimento de resistencia al ácido de un bacteriófago nuevo ΦCJ25.

La Fig. 5 es un gráfico que muestra los resultados de un experimento de resistencia al calor de un bacteriófago nuevo ΦCJ25.

La Fig. 6 es un gráfico que muestra los resultados de un experimento de resistencia al secado de un bacteriófago nuevo ΦCJ25.

#### Mejor forma de realización

En adelante, se describirán en mayor detalle realizaciones de la presente invención. Se omitirá la descripción de detalles evidentes para una persona experta en la técnica en el presente documento.

Una realización de la presente invención proporciona un bacteriófago nuevo ΦCJ25 (KCCM11463P) (en adelante, referido como ΦCJ25) que tiene una capacidad específica para matar *Escherichia coli* patógena aviar (APEC) de los serotipos O-1, O-78 u O-125.

5 *Escherichia coli* patógena aviar se refiere a *Escherichia coli* que se transmite a través del tracto respiratorio de aves tales como pollos, gansos, pavos y similares y que puede causar enfermedades infecciosas de aves, específicamente colibacilosis aviar. Específicamente, *Escherichia coli* patógena aviar penetra en el cuerpo de aves a través de la membrana mucosa del tracto respiratorio y causa diversas enfermedades, tales como sepsis,  
10 granuloma, aerosaculitis, salpingitis, artritis y similares. *Escherichia coli* patógena aviar es un bacilo Gram negativo igual que la *Escherichia coli* general, tiene flagelos peritricosos para la motilidad y es una bacteria aeróbica o anaeróbica facultativa que descompone lactosa y fructosa para generar ácidos y gases.

15 *Escherichia coli* patógena aviar crece bien en medios comunes y es capaz de crecer a una temperatura de aproximadamente 7 °C a aproximadamente 48 °C, con temperatura de crecimiento ideal que varía de aproximadamente 35 °C a aproximadamente 37 °C. Específicamente, a aproximadamente 42 °C, que está cerca de la temperatura corporal de las aves, se realiza eficazmente la expresión de factores patógenos. Adicionalmente, *Escherichia coli* patógena aviar puede crecer a pH que varía de 4,5 a 9,0.

20 Un bacteriófago es un virus específico de bacterias capaz de infectar una bacteria específica e inhibir el crecimiento de la bacteria y es un virus que incluye ácido desoxirribonucleico mono o bicatenario (ADN) o ácido ribonucleico (ARN) como un material genético.

25 Específicamente, el bacteriófago ΦCJ25 según la realización de la presente invención es un bacteriófago que tiene especificidad de especie, que infecta selectivamente *Escherichia coli* patógena aviar de los serotipos O-1, O-78 u O-125 y que pertenece morfológicamente a *Myoviridae*, que tiene una cápside icosaédrica y una cola contráctil (véase la Fig. 1). Se compara la homología entre una secuencia de nucleótidos del bacteriófago ΦCJ25 y secuencias de nucleótidos descodificadas de otros bacteriófagos y los resultados se muestran en la Tabla 1. El bacteriófago ΦCJ25 muestra resistencia al ácido estable a pH 3,5 hasta pH 11,0 sin perder actividad (Fig. 4) y en términos de resistencia al calor, el bacteriófago ΦCJ25 no muestra disminución de actividad, incluso cuando se expone a 50 °C o más (por ejemplo, 53 °C) durante dos horas (Fig. 5). En términos de resistencia al secado, el bacteriófago ΦCJ25 muestra disminución de actividad de aproximadamente 2 log tras el secado (Fig. 6). La secuencia de nucleótidos del bacteriófago ΦCJ25 se expone en la SEQ ID NO: 1 de la lista de secuencias.

35 El bacteriófago ΦCJ25 es un bacteriófago nuevo aislado por el presente inventor y se depositó en el Korean Culture Center of Microorganisms (KCCM) (361-221, Hongje 1-dong, Seodaemun-gu, Seoul, Corea) el 25 de octubre de 2013, con el número de entrada KCCM 11462P.

40 Otra realización de la presente invención proporciona una composición para evitar enfermedades infecciosas causadas por *Escherichia coli* patógena aviar de los serotipos O-1, O-78 u O-125, incluyendo el bacteriófago ΦCJ25 como un ingrediente activo.

45 Dado que el bacteriófago ΦCJ25 muestra actividad antibacteriana capaz de matar específicamente *Escherichia coli* patógena aviar de los serotipos O-1, O-78 u O-125, se puede utilizar el bacteriófago ΦCJ25 en la prevención de enfermedades causadas por infección con *Escherichia coli* patógena aviar. Entre los ejemplos de enfermedades infecciosas causadas por *Escherichia coli* patógena aviar se incluye la colibacilosis aviar, sin limitarse a la misma.

50 En el presente documento, el término "colibacilosis aviar" se refiere a una enfermedad que se produce en el tracto respiratorio de aves debido a la infección con *Escherichia coli* y los síntomas de la misma incluyen aerosaculitis, perihepatitis, peritonitis, pericarditis, salpingitis, onfalitis, osteomielitis o septicemia, causando de este modo retraso en el crecimiento y mortalidad de aves infectadas.

55 En el presente documento, el término "que previene" o "prevención" se refiere a todas las acciones para inhibir o retrasar las correspondientes enfermedades o retrasar la existencia de las enfermedades correspondientes, mediante la administración a un animal del bacteriófago ΦCJ25 y/o la composición que incluye el bacteriófago ΦCJ25 como un ingrediente activo.

60 La composición para prevenir enfermedades infecciosas causadas por *Escherichia coli* patógena aviar de los serotipos O-1, O-78 u O-125 según a esta realización puede incluir el bacteriófago ΦCJ25 en cantidades de  $5 \times 10^2$  ufp/ml a  $5 \times 10^{12}$  ufp/ml, específicamente,  $1 \times 10^6$  ufp/ml a  $1 \times 10^{10}$  ufp/ml.

65 La composición para prevenir enfermedades infecciosas causadas por *Escherichia coli* patógena aviar de los serotipos O-1, O-78 u O-125 según a esta realización puede incluir adicionalmente vehículos farmacéuticamente aceptables y se pueden formular con los vehículos para proporcionar piensos, medicinas, aditivos para piensos o aditivos para agua de bebida y similares.

En el presente documento, la expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a vehículos o diluyentes que no estimulan un organismo y que no inhiben la actividad biológica y las propiedades de los compuestos administrados.

5 Los tipos de vehículos aplicables a esta realización no se circunscriben particularmente y pueden utilizarse vehículos farmacéuticamente aceptables utilizados habitualmente en la técnica. Entre los ejemplos de vehículos pueden incluirse suero salino, agua destilada, solución de Ringer, solución salina tamponada, una solución de inyección de albúmina, una solución de dextrosa, una solución de maltodextrina, glicerol y etanol, sin limitarse a los mismos. Estos pueden utilizarse solos o en combinación de los mismos.

10 Es más, según sea necesario, se pueden añadir otros aditivos comunes tales como antioxidantes, soluciones tamponadas y/o citostáticas a la composición de acuerdo con la presente invención y se pueden añadir adicionalmente diluyentes, dispersantes, tensioactivos, aglutinantes y/o lubricantes a la composición de acuerdo con la presente invención para elaborar formulaciones inyectables tales como soluciones acuosas, suspensiones y emulsiones, píldoras, cápsulas, gránulos y comprimidos.

15 Los métodos para administrar la composición para prevenir enfermedades infecciosas causadas por *Escherichia coli* patógena aviar de los serotipos O-1, O-78 u O-125 no se circunscriben particularmente y pueden utilizarse métodos cualesquiera utilizados habitualmente en la técnica. Un ejemplo del método de administración puede incluir administración oral o administración parenteral.

20 Entre los ejemplos de formas de administración para administración oral se pueden incluir trociscos, pastillas para chupar, comprimidos, suspensiones solubles en agua, suspensiones de base oleosa, polvo de formulación, granulados, emulsiones, cápsulas duras, cápsulas blandas, jarabes y elixires.

25 Para formular la composición según esta realización en formas de administración tales como comprimidos o cápsulas, se pueden añadir adicionalmente aglutinantes, tales como lactosa, sacarosa, sorbitol, manitol, almidones, amilopectina, celulosa y gelatina; excipientes, tales como fosfato dicálcico; disgregadores, tales como almidón de maíz y almidón de batata; lubricantes, tales como estearato de magnesio, estearato de calcio, estearil fumarato sódico y cera de polietilenglicol y para la formulación de cápsulas, se pueden incluir adicionalmente vehículos líquidos, tales como aceites grasos, además de las sustancias mencionados anteriormente.

30 Entre los métodos para administrar parenteralmente la composición de esta realización se pueden incluir, por ejemplo, la inyección intravenosa, administración intraperitoneal, administración intramuscular, administración subcutánea y administración tópica y un método de aplicación o pulverización de la composición según la presente invención a una región afectada, sin limitarse a los mismos.

35 Con el fin de formular formas de administración parenteral, por ejemplo, la composición de esta realización puede formularse en formas de administración para inyección tales como inyección subcutánea, inyección intravenosa e inyección intramuscular; supositorios; o formas de administración para pulverización tales como aerosoles a fin de mantener la inhalación mediante inhaladores, sin limitarse a los mismos. Con el fin de formular formas de administración para inyección, la composición de esta realización se puede mezclar en agua con estabilizadores o agentes tamponadores para preparar soluciones o suspensiones, que se formulan en formas de administración por unidad de administración, tales como ampollas o viales. Cuando la composición se formula en formas de administración para pulverización tales como aerosoles, la composición se puede formular con propelentes y similares junto con aditivos, de manera que se dispersa en la misma un concentrado dispersado en agua o un polvo humedecido.

40 Las cantidades adecuadas de aplicación, pulverización o administración de la composición para prevenir enfermedades infecciosas causadas por *Escherichia coli* patógena aviar de los serotipos O-1, O-78 u O-125 según esta realización pueden diferir según factores tales como edad, peso corporal y sexo de los animales, grado de los síntomas de la enfermedad, piensos ingeridos, tasa de excreción y similares, además de un método para formular la composición, un método de administración, tiempo de administración y/o rutas de administración y un veterinario experto puede determinar y prescribir fácilmente cantidades de dosis eficaces para el tratamiento previsto.

55 Una realización adicional de la presente invención proporciona antibióticos que incluyen el bacteriófago ΦCJ25 como un ingrediente activo.

60 En el presente documento, el término "antibióticos" se refiere a una preparación que se administra a animales, incluyendo los seres humanos, en una forma medicinal y exhibe eficacia para esterilizar bacterias y se usa como un término general para antisépticos, germicidas y agentes antibacterianos.

65 Los antibióticos de esta realización que incluyen el bacteriófago ΦCJ25 como un ingrediente activo tienen efectos en los que los antibióticos tienen especificidad para *Escherichia coli* patógena aviar de los serotipos O-1, O-78 u O-125 en comparación con antibióticos típicos y así matan bacterias patógenas específicas, pero no bacterias beneficiosas; y en los que los antibióticos no inducen resistencia a antibiótico, dando lugar a una extensión de la vida de los

productos en comparación con antibióticos típicos.

En todavía otra realización de la presente invención se proporciona un aditivo para piensos avícolas o agua de bebida avícola, que incluye el bacteriófago ΦCJ25 como un ingrediente activo.

5 No se circunscriben aves en particular como sujetos para los que se aplican los aditivos para piensos avícolas o los aditivos para agua de bebida avícola, pero las aves en esta realización son aves de corral en particular.

10 En el presente documento, aves de corral es un nombre genérico para animales que pertenecen a aves dentro de la ganadería. No se circunscriben particularmente las aves de corral y pueden comprender al menos uno del grupo que consiste en pollos, gansos, pavos y similares.

15 Los aditivos para piensos avícolas o los aditivos para agua de bebida avícola pueden utilizarse para preparar separadamente aditivos para piensos o aditivos para agua de bebida avícola utilizando el bacteriófago ΦCJ25 o la composición que incluye el mismo y mezclado aditivos o agua de bebida con los aditivos o añadiendo directamente el bacteriófago ΦCJ25 o la composición que incluye el mismo en un proceso de preparación de piensos o agua de bebida.

20 El bacteriófago ΦCJ25 o la composición que incluye el bacteriófago ΦCJ25 como un ingrediente activo utilizado en forma de aditivos para piensos o aditivos para agua de bebida según esta realización, puede ser una forma líquida o una forma seca, por ejemplo, una forma de polvo seco.

25 Por ejemplo, el bacteriófago ΦCJ25 según la presente invención se mezcla con una forma de polvo en cantidades de 0,05 % en peso (%p) a 10 %p, específicamente 0,1 %p a 2%p, según el peso de los aditivos para piensos.

30 No se circunscriben métodos de secado en particular de los aditivos para piensos o de los aditivos para agua de bebida según esta realización para producir polvo seco y puede utilizarse cualquier método utilizado habitualmente en la técnica. Entre los ejemplos del método de secado se pueden incluir el secado por aire, secado natural, secado por pulverización y liofilización, sin limitarse a los mismos. Estos métodos pueden utilizarse solos o en combinación de los mismos.

35 Los aditivos para piensos o los aditivos para agua de bebida según esta realización pueden incluir adicionalmente otros microorganismos no patógenos. Los microorganismos pueden seleccionarse del grupo que consiste en *Bacillus* sp., tal como *Bacillus subtilis* capaz de producir proteasas, lipasas y/o glicosiltransferasas; bacterias de ácido láctico tales como *Lactobacillus* sp. que tienen actividad fisiológica y capacidad de descomponer materia orgánica en condiciones anaerobias como el estómago del ganado; bacterias filamentosas tales como *Aspergillus oryzae* que tiene efectos de ganancia de peso en animales, aumento de producción de leche e incremento de la tasa de digestión-absorción de los piensos; y levaduras tales como *Saccharomyces cerevisiae* y similares. Estos microorganismos pueden utilizarse solos o en combinación de los mismos.

40 Los aditivos para piensos o los aditivos para agua de bebida según esta realización que incluyen el bacteriófago ΦCJ25 como un ingrediente activo pueden comprender adicionalmente otros aditivos si es necesario. Entre los ejemplos de aditivos utilizables se pueden incluir los aglutinantes, emulsionantes y conservantes añadidos para la prevención del deterioro de la calidad de piensos o agua de bebida; agentes de aminoácidos, de vitaminas, de enzimas, probióticos, aromatizantes, compuestos nitrogenados no proteicos, agentes de silicatos, tamponadores, agentes colorantes, agentes que extraen u oligosacáridos que se añaden para incrementar la utilidad de piensos o agua de bebida; y otros suplementos para piensos y similares. Estos aditivos pueden utilizarse solos o en combinación de los mismos.

50 Los aditivos para piensos según la presente invención pueden estar presentes en cantidades de 0,05 partes en peso a 10 partes en peso, específicamente 0,1 partes en peso a 2 partes en peso, basados en 100 partes en peso de piensos. Los aditivos para agua de bebida según la presente invención pueden estar presentes en cantidades de 0,0001 en peso a 0,01 partes en peso, específicamente 0,001 partes en peso a 0,005 partes en peso, basados en 100 partes en peso de agua de bebida. Dentro de estos intervalos, los aditivos permiten la actividad del bacteriófago ΦCJ25 contra *Escherichia coli* patógena aviar de los serotipos O-1, O-78 y O-125 para que se despliegue suficientemente.

60 Todavía otra realización de la presente invención proporciona piensos o agua de bebida preparada añadiendo aditivos para piensos o los aditivos para agua de bebida que incluyen el bacteriófago ΦCJ25 como un ingrediente activo para piensos o agua de bebida o directamente añadiendo el bacteriófago ΦCJ25 a los mismos.

65 Los piensos utilizados en esta realización no se circunscriben en particular y puede utilizarse cualquiera de los piensos usados habitualmente en la técnica. Entre los ejemplos de piensos pueden utilizarse piensos vegetales tales como granos, tubérculos, subproductos de procesamiento de alimentos, algas, fibras, subproductos farmacéuticos, aceites y grasas, almidones, residuos o subproductos de granos y similares; y piensos animales tales como proteínas, sustancias inorgánicas, aceites y grasas, minerales, proteínas unicelulares y plancton animal o piensos

animales. Estos piensos se usan solos o en combinación de los mismos.

El agua de bebida utilizada en esta realización no se circunscribe en particular y puede utilizarse cualquier agua de bebida usada habitualmente en la técnica.

5 Todavía otra realización de la presente invención proporciona desinfectantes o detergentes que incluyen el bacteriófago ΦCJ25 como un ingrediente activo. Las formas de administración de los desinfectantes o detergentes no se circunscriben en particular y puede utilizarse cualquier forma de administración utilizada habitualmente en la técnica.

10 Para eliminar *Escherichia coli* patógena aviar de los serotipos O-1, O-78 u O-125, se pueden pulverizar los desinfectantes a hábitats o aves, mataderos, zonas muertas, cocinas y equipamiento de cocina, sin limitarse a los mismos.

15 Los detergentes pueden usarse para limpiar una superficie de la dermis o partes del cuerpo de aves que están expuestas o que pueden exponerse a *Escherichia coli* patógena aviar, sin limitarse a las mismas.

20 Todavía otra realización de la presente invención proporciona el bacteriófago ΦCJ25 o la composición que incluyen el bacteriófago ΦCJ25 como un ingrediente activo para utilizar en la prevención de colibacilosis aviar causada por *Escherichia coli* patógena aviar de los serotipos O-1, O-78 u O-125.

25 El bacteriófago ΦCJ25 o la composición que incluye el bacteriófago ΦCJ25 para utilizar según las reivindicaciones es para administración a aves que se exponen o que pueden exponerse a *Escherichia coli* patógena aviar. Las cantidades totales adecuadas del bacteriófago ΦCJ25 o la composición que incluye el mismo por día puede determinarse por un médico dentro del juicio médico apropiado, como es evidente para los expertos en la materia.

30 Una cantidad eficaz concreta farmacéuticamente del bacteriófago ΦCJ25 o la composición que incluye el bacteriófago ΦCJ25 como un ingrediente activo para ciertas aves puede determinarse teniendo en cuenta los tipos y grado de reacción a conseguir, la edad, el peso corporal, el estado de salud general, sexo o dieta de los individuos correspondientes, tiempo de administración y rutas de administración del bacteriófago ΦCJ25 o una composición que incluye el mismo y tasa de secreción de la composición, periodo de tratamiento y similares y puede diferir dependiendo de varios factores y factores similares bien conocidos en el campo de la medicina que incluyen componentes de medicinas que se utilizan simultáneamente o en diferentes momentos.

35 El bacteriófago ΦCJ25 o la composición que incluye el bacteriófago ΦCJ25 como un ingrediente activo es para administrar en forma de una preparación farmacéutica para aves, mediante pulverización intranasal o añadido directamente a piensos avícolas o a agua de bebida de modo que tiene que ser digerido y puede mezclarse en forma de aditivos para piensos o aditivos para agua de bebida con piensos o agua de bebida.

40 Las rutas y métodos de administración del bacteriófago ΦCJ25 o la composición que incluye el bacteriófago ΦCJ25 como un ingrediente activo no se circunscriben en particular y la administración puede alcanzarse mediante rutas y métodos en tanto que la administración permita al bacteriófago ΦCJ25 o la composición que incluye el mismo alcanzar los tejidos deseados. En concreto, el bacteriófago ΦCJ25 o la composición que incluyen el bacteriófago ΦCJ25 como un ingrediente activo es para administrar mediante diferentes rutas orales o parenterales y entre los ejemplos de administración se pueden incluir la oral, rectal, tópica, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, intraarterial, transdérmica, intranasal, inhalación y similares, sin limitarse a los mismos.

50 En adelante, la presente invención se describirá con más detalle con referencia a un ejemplo preferido. Debe entenderse que estos ejemplos no deben interpretarse de un modo limitativo de la invención.

**[Ejemplo 1] - Aislamiento del bacteriófago que infecta *Escherichia coli* patógena aviar de serotipos O-1, O-78 u O-125**

**<Ejemplo 1-1>**

Cribado de bacteriófagos y aislamiento de bacteriófagos individuales

60 Se centrifugaron 50 ml de una muestra obtenida a partir de heces de pollo recogidas en torno a la granja SamwhawonJong en Gwangcheon, Hongsung-gun, Chungcheong, a 4.000 rpm durante 10 minutos y el sobrenadante resultante se filtró mediante un filtro de 0,45 μm para preparar un líquido de muestra, que a su vez se utilizó para realizar un método de superposición de agar blando. El método de superposición de agar blando se refiere a un método de observación de lisis por bacteriófagos que utiliza una célula hospedadora que crece sobre agar (unido a un medio sólido que utiliza agar al 0,7 %).

65 Específicamente, se mezclaron 150 μl de una solución de cultivo agitado (OD<sub>600</sub> = 2) de *Escherichia coli* patógena aviar (E09-19) obtenida del Department of Veterinary Medicine de Konkuk University y 2 ml de medio 10xLB (10 g/l

de triptófano; 5 g/l de extracto de levadura; 10 g/l de NaCl) con 18 ml del líquido de muestra filtrado, seguido del cultivo a 30 °C durante 18 horas y la solución de cultivo resultante se centrifugó a 4.000 rpm durante 10 minutos y el sobrenadante resultante se filtró mediante un filtro de 0,45 µm. Posteriormente, una solución mixta que consiste en 3 ml de agar 0,7 % (p/v) y 150 µl de una solución de cultivo agitado ( $OD_{600} = 2$ ) de *Escherichia coli* patógena aviar (E09-19) se vertió y solidificó sobre una placa de medio LB, sobre la que se añadieron 10 µl del líquido de muestra gota a gota, seguido de cultivo a 30 °C durante 18 horas, identificando de este modo la formación de placas.

Dado que se sabe que está presente un tipo de bacteriófago por placa, los inventores trataron de aislar bacteriófagos individuales de las placas formadas. Específicamente, se añadieron 400 µl de solución SM (5,8 g/l de NaCl; 2 g/l de  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ; 50 ml de Tris-HCl 1M (pH 7,5)) a las placas y se dejaron a temperatura ambiente durante 4 horas, obteniendo de ese modo una solución de bacteriófagos.

Posteriormente, se mezclaron 100 µl de la solución de bacteriófagos con 12 ml de agar 0,7 % (p/v) y 500 µl de una solución de cultivo agitado ( $OD_{600} = 2$ ) de *Escherichia coli* patógena aviar (E09-19), que se utilizó para realizar un método de superposición de agar blando utilizando una placa de medio LB que tiene un diámetro de 150 mm donde se realizó el cultivo hasta que el bacteriófago se lisó completamente. Después de completarse el cultivo, se añadieron 15 ml de solución SM a la placa de medio LB y se dejó a temperatura ambiente durante 4 horas, obteniendo de ese modo una solución de bacteriófagos.

A la solución obtenida, se añadió cloroformo 1 % (v/v) y se mezcló durante 10 minutos, seguido de centrifugación a 4.000 rpm durante 10 minutos, obteniéndose de este modo un sobrenadante, que a su vez se filtró mediante un filtro de 0,45 µm, obteniendo de este modo una muestra final.

#### <Ejemplo 1-2>

##### Cultivo a gran escala y purificación del bacteriófago

Se cultivó el bacteriófago obtenido en el Ejemplo 1-1 a gran escala utilizando *Escherichia coli* patógena aviar (E09-19) y de ahí se purificó el bacteriófago a continuación.

Específicamente, *Escherichia coli* patógena aviar (E09-19) se produjo en cultivo agitado y se inoculó a  $1,5 \times 10^{10}$  ufc, seguido de centrifugación a 4.000 rpm durante 10 minutos y resuspensión en 4 ml de solución SM. A esto, se añadió el bacteriófago a  $1,5 \times 10^6$  ufp con multiplicidad de infección (MOI; del inglés, Multiplicity of Infection) de 0,0001 y a continuación se dejó a temperatura ambiente durante 20 minutos.

A continuación, con ello se inocularon 150 ml de medio LB y se cultivó a 30 °C durante 6 horas. Después de completarse el cultivo, se añadió cloroformo a un volumen de 1 % (v/v) del volumen final, seguido de agitación durante 20 minutos, a lo que se añadieron ADNasa y ARNasa como enzimas de restricción en una concentración final de 1 µg/ml, respectivamente y se dejó a 30 °C durante 30 minutos. Posteriormente, se añadieron cloruro de sodio y polietilenglicol a una concentración final de 1M y 10 % (p/v), respectivamente y se dejó a 4 °C durante 3 horas, seguido de centrifugación a 4 °C y 12.000 rpm durante 20 minutos, obteniéndose de este modo un precipitado.

El precipitado obtenido se suspendió en 5 ml de solución SM y a continuación se dejó a temperatura ambiente durante 20 minutos, se añadieron 4 ml de cloroformo al mismo con agitación, seguido de centrifugación a 4 °C con 4.000 rpm durante 20 minutos, obteniendo de este modo un sobrenadante. El sobrenadante se filtró a través de un filtro de 0,45 µm, seguido de ultracentrifugación (35.000 rpm, 1 hora, 4 °C) utilizando un método de gradiente de densidad de glicerol (densidad: glicerol 40 %, 5 %), purificando de este modo un bacteriófago.

Los presentes inventores aislaron un bacteriófago que tiene una capacidad específica para matar *Escherichia coli* patógena aviar de los serotipos O-1, O-78 u O-125 a partir de muestras recogidas de heces de pollos en granjas, que se designó como "Bacteriófago ΦCJ25" y se depositó en el Korean Culture Center of Microorganisms (KCCM) (361-221 Hongje 1-dong, Seodaemun-gu, Seoul, Corea) el 25 de octubre de 2013, con el número de entrada KCCM 11463P.

#### <Ejemplo 2>

##### Observación morfológica de ΦCJ25

El bacteriófago ΦCJ25 purificado en el Ejemplo 1 se diluyó en solución de gelatina 0,01 % y se fijó con una solución de glutaraldehído 2,5 %. El bacteriófago resultante se añadió gota a gota a una placa de mica recubierta de carbono (aprox. 2,5 mmx2,5 mm), se aclimató durante 10 minutos y a continuación se lavó con agua destilada.

Posteriormente, la película de carbono se montó sobre una rejilla de cobre y se tiñó con acetato de uranilo 4 % durante 60 segundos, se secó y se examinó en un microscopio electrónico de transmisión (Jem-1011, 80 kV, de x200.000 aumentos) (Fig. 1).



La Fig. 1 es una imagen de microscopía electrónica de transmisión del bacteriófago ΦCJ25, en la que el bacteriófago ΦCJ25 tiene características morfológicas de una cápside icosaédrica que tiene un tamaño de aproximadamente 83 nm con una cola contráctil, que indica que el bacteriófago pertenece al morfotipo A1 de *Myoviridae*.

### <Ejemplo 3>

#### Análisis de tamaño de ADN genómico total de ΦCJ25

El ADN genómico se extrajo del bacteriófago ΦCJ25 purificado en el Ejemplo 1.

Específicamente, se añadieron ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 20 mM, 50 µg/ml de proteasa K y dodecilsulfato sódico (SDS) 0,5 % (p/v) a una solución cultivada del bacteriófago ΦCJ25 y se dejó a 50 °C durante una hora, a la que se añadió una cantidad igual de fenol (pH 8,0) con agitación, seguido de centrifugación a temperatura ambiente y 12.000 rpm durante 10 minutos, obteniendo de este modo un sobrenadante.

El sobrenadante se mezcló con una cantidad igual de FC (fenol: cloroformo = 1:1), seguido de centrifugación a temperatura ambiente y 12.000 rpm durante 10 minutos, obteniendo de este modo un sobrenadante. El sobrenadante se mezcló con una cantidad igual de cloroformo, seguido de centrifugación a temperatura ambiente y 12.000 rpm durante 10 minutos, obteniendo de este modo un sobrenadante. El sobrenadante se mezcló con 10 % (v/v) de acetato de sodio 3M basado en el volumen total, seguido de la adición de 2 volúmenes de etanol frío 95 %, mezclado y permaneciendo a -20 °C durante 1 hora.

Posteriormente, la sustancia resultante se centrifugó a 0°C y 12.000 rpm durante 10 minutos, de la que se retiró un sobrenadante para obtener un precipitado, que se disolvió en 50 µl de solución tamponada de TE (Tris-EDTA, pH 8,0). El ADN extraído se diluyó 10 veces y se determinó la concentración de ADN mediante la medición de la absorbancia a OD<sub>260</sub>.

A continuación, se cargó 1 µg de ADN sobre un gel de agarosa PFGE (electroforesis en gel de campo pulsado) 1 % y se desarrolló utilizando el BIORAD PFGE SYSTEM NO.7 PROGRAM (tamaño que varía de 25 kb a 100 kb; tiempo de cambio de carril de 0,4 a 2,0 segundos, forma lineal; tensión directa, 180 V; tensión inversa, 120 V) a temperatura ambiente durante 20 horas (Fig. 2).

La Fig. 2 es una fotografía de gel de electroforesis de ADN genómico del bacteriófago ΦCJ25 y puede observarse que el tamaño de ADN genómico del bacteriófago ΦCJ25 fue de aproximadamente 39 kpb.

### <Ejemplo 4>

#### Análisis del patrón de proteínas de ΦCJ25

Se mezclaron 15 µl de la solución de bacteriófago ΦCJ25 purificado (valoración 10<sup>11</sup> ufp/ml) con 3 µl de 5x solución de muestra de SDS y a continuación se hirvieron durante 5 minutos para realizar SDS-PAGE 12 % (Fig. 3).

La Fig. 3 es una fotografía de electroforesis de resultados de SDS-PAGE realizada sobre el bacteriófago ΦCJ25 y puede observarse que las proteínas principales tienen un tamaño de aproximadamente 43 kDa, aproximadamente 49,3 kDa, aproximadamente 60,4 kDa y aproximadamente 94,9 kDa.

### <Ejemplo 5>

#### Análisis de las propiedades genéticas de ΦCJ25

Para determinar las propiedades genéticas del bacteriófago ΦCJ25 purificado en el Ejemplo 1, el ADN del bacteriófago ΦCJ25 se analizó utilizando como un analizador genómico un FLX Titanium Sequencer (Roche). Los genes se recombinaron utilizando GS y un software ensamblador de novo (Roche) de Macogen Inc. El marco abierto de lectura se identificó utilizando los software Gene-Mark. hmm, Glimmer v3.02 y FGENESB. El marco abierto de lectura se anotó utilizando BLASTP y el programa InterProScan.

La secuencia de nucleótidos del bacteriófago ΦCJ25 mostró similitud a la secuencia de nucleótidos de bacteriófagos notificados anteriormente (fago EcoDSI de *Enterobacteria*), pero pudo observarse que no hubo bacteriófagos en los que todos los fragmentos coincidieran al 100 %. Por consiguiente, pudo observarse que el bacteriófago era un bacteriófago aislado nuevo.

La siguiente Tabla 1 muestra los resultados de la comparación entre la secuencia de nucleótidos del bacteriófago ΦCJ25 y la secuencia de nucleótidos descodificada del bacteriófago previo notificado en la técnica.

TABLA 1

Consulta				Sujeto		Identidades	
Nombre	Longitud	Inicio	Final	Descripción	E-valor	Coincidencia/Total	Pct. (%)
SEQ ID NO: 1	39618	1	9030	fago EcoDS1 de Enterobacteria, genoma completo	0	8653/9041	95

El ADN del bacteriófago preparado ΦCJ25 se analizó utilizando un secuenciador de ADN y la secuencia de nucleótidos total analizada se expone en la SEQ ID NO: 1.

5

#### <Ejemplo 6>

##### Estabilidad de pH de ΦCJ25

10 Para identificar si el bacteriófago ΦCJ25 puede mantener estabilidad a pH bajo como las condiciones estomacales, la estabilidad del bacteriófago ΦCJ25 se examinó a diferentes pH (pH 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 5,5, 6,5, 7,0, 8,0, 9,0, 10,0 y 11,0).

15 Para el experimento, se prepararon diferentes soluciones de pH (soluciones tamponadoras de acetato de sodio (pH 4,0, pH 4,5, pH 5,0, pH 5,5), soluciones tamponadoras de citrato de sodio (pH 2,5, pH 3,0 y pH 3,5), soluciones tamponadoras de fosfato de sodio (pH 6,5 y pH 7,0) y soluciones de Tris-HCl (pH 8,0, pH 9,0, pH 10,0 y pH 11,0)) a una concentración de 0,2M.

20 Se mezclaron 180 µl de cada solución de pH con 20 µl de una solución de bacteriófago con valoración  $1,0 \times 10^{10}$  UFP/ml para permitir que cada solución de pH tuviera una concentración de 1M y a continuación la solución resultante se dejó a temperatura ambiente durante 2 horas. Para un grupo de control, se mezclaron 20 µl de una solución de bacteriófago con valoración  $1,0 \times 10^{10}$  UFP/ml con 180 µl de solución SM mediante el mismo método y la solución resultante se dejó a temperatura ambiente durante 2 horas. Después, las soluciones se diluyeron en serie y se cultivaron 10 µl de cada una de las soluciones en cada etapa de dilución mediante el método de superposición de agar blando a 30 °C durante 18 horas para determinar la valoración de bacteriófago basándose en si el bacteriófago se lisó (Fig. 4).

25 La Fig. 4 muestra resultados experimentales de resistencia al ácido del bacteriófago ΦCJ25. En la Fig. 4, se pudo observar que el bacteriófago ΦCJ25 no perdió su actividad y mantuvo la estabilidad desde pH 3,5 a pH 11,0, en comparación con el grupo de control.

30

#### <Ejemplo 7>

##### Estabilidad térmica del bacteriófago ΦCJ25

35

Si los bacteriófagos se formulan en aditivos para piensos entre las formas de administración de bacteriófagos, se puede generar calor durante los procesos de formulación y por tanto, se realizó el siguiente experimento para determinar la estabilidad térmica de los bacteriófagos.

40 Específicamente, se dejaron 100 µl de solución de bacteriófago ΦCJ25 con  $1,25 \times 10^{10}$  UFP/ml a 37 °C, 45 °C, 53 °C y 60 °C durante 10 minutos, 30 minutos, 60 minutos y 120 minutos, respectivamente. Después, la solución de cultivo experimental resultante se diluyó en serie, se cultivaron 10 µl de cada una de las soluciones en cada etapa de dilución mediante el método de superposición de agar blando a 30 °C durante 18 horas para determinar la valoración de bacteriófago basándose en si el bacteriófago se lisó (Fig. 5).

45

La Fig. 5 muestra resultados experimentales de resistencia al calor del bacteriófago ΦCJ25. Como se muestra en la Fig. 5, se pudo observar que el bacteriófago ΦCJ25 no mostró pérdida de actividad a 53 °C durante un máximo de 120 minutos y mostró reducción de actividad de aproximadamente 1 log o menos a 60 °C durante un máximo de 120 minutos.

50

#### <Ejemplo 8>

##### Estabilidad de secado del bacteriófago ΦCJ25

55 Si los bacteriófagos se formulan en aditivos para piensos entre las formas de administración de bacteriófagos, los bacteriófagos se pueden secar durante los procedimientos de formulación y por tanto, se realizó el siguiente experimento para determinar la estabilidad de los bacteriófagos ante las condiciones de secado.

60 Basándose en los resultados del experimento de resistencia al calor, el experimento de secado se realizó utilizando un concentrador SpeedVac. Se secaron 200 µl de solución de bacteriófago ΦCJ25 con  $1,2 \times 10^{10}$  UFP/ml a 60 °C al

vacío durante 2 horas y los sedimentos resultantes se introdujeron en 200 µl de solución SM, seguido de resuspensión completa a 4 °C durante un día, midiendo valoraciones de este modo (Fig. 6).

5 La Fig. 6 muestra resultados experimentales de resistencia al secado del bacteriófago ΦCJ25. Como se muestra en la Fig. 6, se pudo observar que después del secado, en comparación con valoraciones iniciales y estabilidad relativa, el bacteriófago ΦCJ25 mostró pérdida de actividad de aproximadamente 1 log o menos cuando se secó a 60 °C durante 2 horas.

10 <Ejemplo 9>

10 Examen del intervalo de infecciones del bacteriófago ΦCJ25 sobre una cepa aislada de tipo silvestre, *Escherichia coli* patógena aviar

15 Se analizó la actividad lítica del bacteriófago ΦCJ25 para 46 cepas del tipo silvestre de *Escherichia coli* patógena aviar por el College of Veterinary Medicine, Konkuk University (KU), 10 cepas de *Escherichia coli* patógena aviar aisladas por la Korea Animal and Plant Quarantine Agency (KAPQA), 7 cepas de *Escherichia coli* patógena aviar aisladas por el College of Veterinary Medicine, Chonbuk National University (CNU) y 26 cepas de *Escherichia coli* patógena aviar de diagnóstico de enfermedad aisladas por Komipharm farm (KF) junto con *Escherichia coli* patógena aviar (E09-19) utilizada en el presente experimento.

20 Específicamente, se mezclaron 150 µl de una solución de cultivo agitado de cada cepa (OD<sub>600</sub> = 2) y se vertieron a la misma 10 µl de la solución de bacteriófago ΦCJ25 con valoración 10<sup>9</sup> ufp/ml y se cultivaron mediante el método de superposición de agar blando a 30 °C durante 18 horas y a continuación se examinó la formación de placas (Table 2).

25 Los resultados se muestran en la Tabla 2.

TABLA 2

N.º	Cepas de KU	Serotipado	Φ CJ25	N.º	Cepas de KAPQA	Serotipado	Φ CJ25
1	E09-1		0	48	06Q-035	O-78	0
2	E09-2		0	49	06D-044	O-78	
3	E09-3		0	50	06Q-140	O-78	0
4	E09-4		0	51	07D-001	O-78	0
5	E09-5		0	52	07D-022	O-78	0
6	E09-6	O-78	0	53	07Q-039	O-78	0
7	E09-7		0	54	KWU-02	O-78	0
8	E09-8	O-78	0	55	KWU-32	O-78	0
9	E09-9	O-78	0	56	KWU-33	O-78	
N.º	Cepas de KU	Serotipado	Φ CJ25	N.º	Cepas de KAPQA	Serotipado	Φ CJ25
10	E09-10		0	57	KWU-43	O-78	0
11	E09-11	O-78	0	N.º	Cepas de CNU	Serotipado	Φ CJ25
12	E09-12	O-125	0				
13	E09-13		0	58	A12-MRA-076-Ⓢ		0
14	E09-14		0	59	A10-LSf-005		
15	E09-15		0	60	A11-LSF-043		
16	E09-16		0	61	A12-MRA-076-Ⓢ		
17	E09-17		0	62	D12-JW-058		0
18	E09-18			63	A12-LSF-083	O-78	
19	E09-19		0	64	A12-MRA-076-Ⓢ		0
20	E09-20		0	N.º	Cepas de KF	Serotipado	Φ CJ25
21	E09-21		0				
22	E09-22		0	65	12-001-3		0
23	E09-23		0	66	12-053		0
24	E09-24		0	67	12-055		0
25	E09-25		0	68	12-086-1	O-78	0
26	E09-26		0	69	12-086-2	O-78	0
27	E09-27		0	70	12-096-3		0
28	E09-28		0	71	12-175		0
29	E09-29		0	72	12-187	O-78	0

(continuación)

N.º	Cepas de KU	Serotipado	Φ CJ25	N.º	Cepas de KAPQA	Serotipado	Φ CJ25
30	E09-30		0	73	12-211-5		0
31	E09-31		0	74	12-220-4		0
32	E09-32		0	75	12-220-6		0
33	E09-33		0	76	12-248		0
34	E09-34		0	77	12-261-1		0
35	E09-35(297)	O-78		78	12-266		0
36	E09-36(343)		0	79	12-274-1		0
37	E09-37(343)		0	80	12-275-2	O-78	0
38	E09-38(343)		0	81	12-286-2		0
39	E09-39(353)		0	82	12-300	O-78	
40	E09-40(353)		0	83	12-303-2	O-78	0
41	E09-41(376)		0	84	12-304-3		0
42	E09-42(376)		0	85	12-299-1	O-78	0
43	E102	O-1	0	86	12-299-2	O-78	0
44	E103	O-78	0	87	12-299-3	O-78	0
45	E104	O-78	0	88	12-324	O-78	0
46	E105	O-78		89	12-338-1	O-78	
N.º	Cepas de KU	Serotipado	Φ CJ25	N.º	Cepas de KAPQA	Serotipado	Φ CJ25
47	E106			90	12-338-4	O-78	

5 Tal como se muestra en la Tabla 2, el bacteriófago ΦCJ25 muestra capacidad de infección hacia *Escherichia coli* patógena aviar (específicamente de los serotipos O-1, O-78 u O-125), que es una bacteria causante de colibacilosis aviar principal en granjas de aves de corral comunes.

Por otra parte, se sabe que el serotipo O-78 es habitualmente la cepa más dominante entre la *Escherichia coli* patógena aviar aislada en granjas de aves de corral.

Referencia del expediente del solicitante o del agente P14-5114	N.º de solicitud internacional
---	--------------------------------

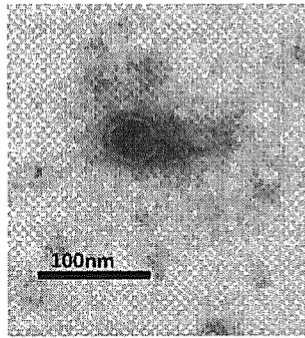
**INDICACIONES RELATIVAS AL MICROORGANISMO DEPOSITADO Y OTRO MATERIAL BIOLÓGICO**

(PCT Regla 13bis)

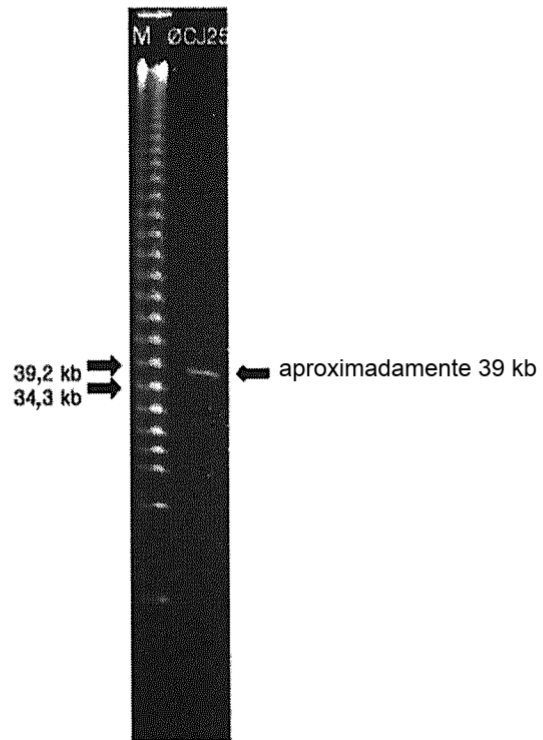
<p><b>A.</b> Las indicaciones hechas a continuación se refieren al microorganismo u otro material biológico depositado al que se hace referencia en la descripción en la página <u>18</u>, línea <u>164</u>.</p>	
<p><b>B. IDENTIFICACIÓN DE DEPÓSITO</b> <span style="float: right;">Se identifican depósitos adicionales en hoja aparte <input type="checkbox"/></span></p> <p>Nombre de la institución depositaria KCCM KCCM Korea Culture Center of Microorganisms</p> <p>Dirección de la institución depositaria (<i>incluyendo código postal y país</i>) Yurim Bldg. 45 Hongjenae 2ga Seodaemunku Seoul 120-861 Korea</p>	
<p>Fecha de depósito 25 de octubre de 2013</p>	<p>Número de entrada KCCM11463P</p>
<p><b>C. INDICACIONES ADICIONALES</b> (<i>dejar en blanco si no procede</i>) <span style="float: right;">Esta información continúa en una hoja adicional <input type="checkbox"/></span></p>	
<p><b>D. ESTADOS DESIGNADOS PARA LOS QUE SE HACEN INDICACIONES</b> (<i>si las indicaciones no son para todos los estados designados</i>)</p>	
<p><b>E. SUMINISTRO SEPARADO DE INDICACIONES</b> (<i>dejar en blanco si no procede</i>)</p> <p>Las indicaciones enumeradas a continuación se presentarán al International Bureau más adelante (<i>especificar la naturaleza general de las indicaciones, por ejemplo, "Número de entrada del depósito"</i>)</p>	
<p><input type="checkbox"/> Solo para uso de la Oficina receptora Esta hoja se recibió con la solicitud internacional</p> <p>Agente autorizado</p>	<p><input type="checkbox"/> Solo para el uso del International Bureau Esta hoja se recibió por el International Bureau en:</p> <p>Agente autorizado</p>

**REIVINDICACIONES**

1. Un bacteriófago ΦCJ25 (KCCM11463P) que tiene una capacidad específica para matar *Escherichia coli* patógena aviar.
2. Una composición que comprende el bacteriófago ΦCJ25 (KCCM11463P) según la reivindicación 1 como un ingrediente activo.
3. El bacteriófago ΦCJ25 (KCCM11463P) según la reivindicación 1 para utilizar en la prevención de colibacilosis aviar causada por *Escherichia coli* patógena aviar de los serotipos O-1, O-78 u O-125.
4. Un aditivo para piensos avícolas que comprende la composición según la reivindicación 2.
5. Piensos avícolas que comprenden el aditivo para piensos avícolas según la reivindicación 4.
6. Un aditivo para agua de bebida avícola que comprende la composición según la reivindicación 2.
7. Agua de bebida avícola que comprende el aditivo para agua de bebida avícola según la reivindicación 6.
8. Un desinfectante que comprende la composición según la reivindicación 2.
9. Un detergente que comprende la composición según la reivindicación 2.
10. La composición según la reivindicación 2 para usar en la prevención de colibacilosis aviar causada por *Escherichia coli* patógena aviar de los serotipos O-1, O-78 u O-125.



**Fig.1**



**Fig.2**

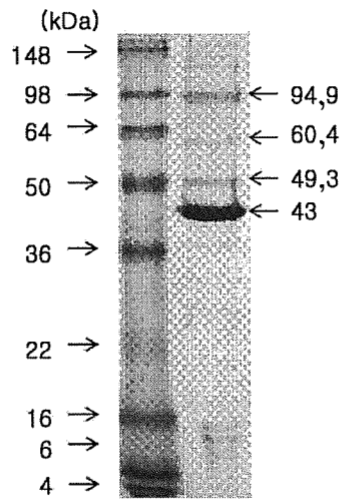


Fig.3

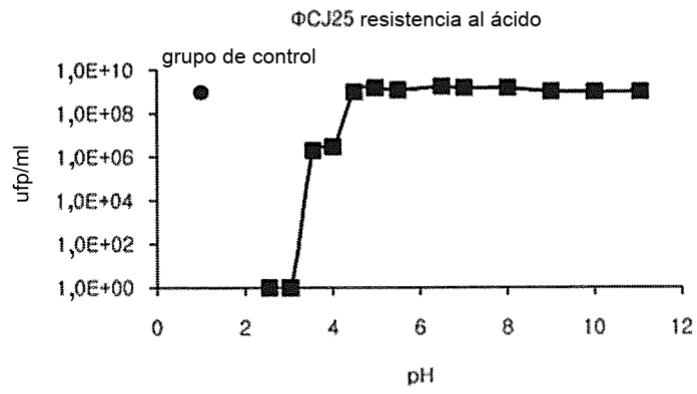
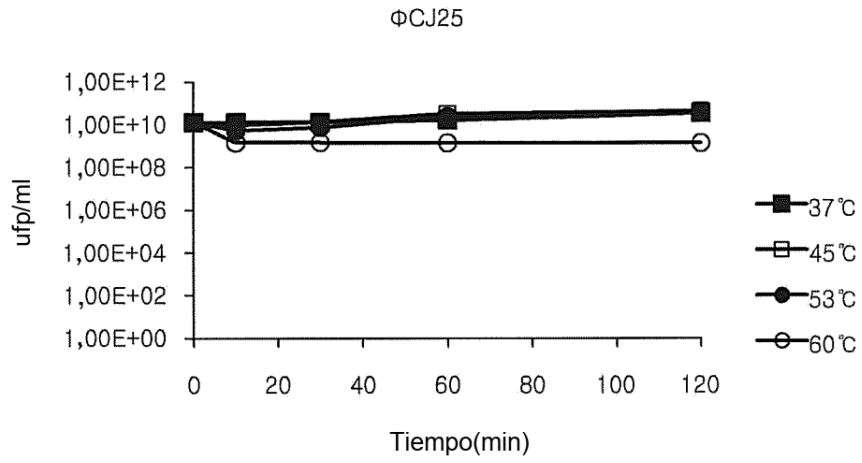
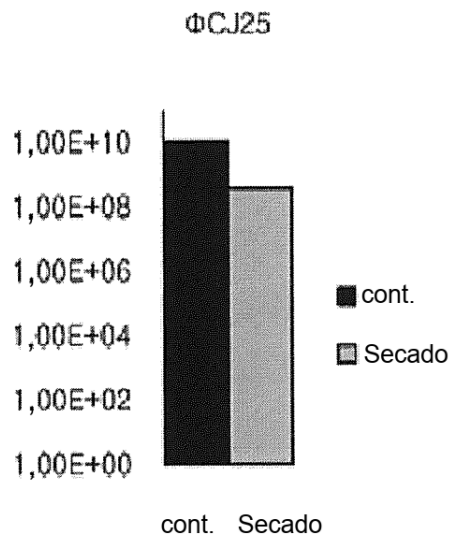


Fig.4





**Fig.5**



**Fig.6**