

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 895 800**

21 Número de solicitud: 202130815

51 Int. Cl.:

C07K 14/005 (2006.01)

A61K 38/46 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN

B2

22 Fecha de presentación:

10.10.2019

43 Fecha de publicación de la solicitud:

22.02.2022

88 Fecha de publicación diferida del informe sobre el estado de la técnica:

08.06.2022

Fecha de modificación de las reivindicaciones:

10.02.2023

Fecha de concesión:

15.01.2024

45 Fecha de publicación de la concesión:

22.01.2024

62 Número y fecha presentación solicitud inicial:

P 201930890 10.10.2019

73 Titular/es:

UNIVERSITAT D'ALACANT / UNIVERSIDAD DE ALICANTE (100.0%)

CARRETERA SAN VICENTE DEL RASPEIG, S/N 03690 SAN VICENTE DEL RASPEIG (Alicante) ES

72 Inventor/es:

**SOLER BODÍ, Vicent;
GARCÍA MARTÍNEZ, Jesús;
MARCO GUZMÁN, Noemí;
PEÑA PARDO, Aránzazu y
MARTÍNEZ MOJICA, Francisco J.**

74 Agente/Representante:

ESCUDERO PRIETO, Nicolás Enrique

Observaciones:

La lista de secuencias está accesible al público en la página web de la OEPM para su descarga en formato electrónico.

54 Título: **USOS DE PROTEÍNAS VÍRICAS CON ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA FRENTE A *Escherichia coli***

57 Resumen:

La presente invención se refiere a un polipéptido que consiste en una secuencia aminoacídica según SEQ ID NO: 2 para su uso en el tratamiento de enfermedades producidas por *E. coli*. La presente invención se refiere también al uso no terapéutico de un polipéptido que consiste en una secuencia aminoacídica según SEQ ID NO: 2 La presente invención se refiere también a una composición que comprende un polipéptido que consiste en una secuencia aminoacídica según SEQ ID NO: 2 para su uso en el tratamiento de enfermedades producidas por *E. coli*, y al uso no terapéutico de una composición que comprende un polipéptido que consiste en una secuencia aminoacídica según SEQ ID NO: 2

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 41 LP 24/2015.
Dentro de los seis meses siguientes a la publicación de la concesión en el Boletín Oficial de la Propiedad Industrial cualquier persona podrá oponerse a la concesión. La oposición deberá dirigirse a la OEPM en escrito motivado y previo pago de la tasa correspondiente (art. 43 LP 24/2015).

ES 2 895 800 B2

DESCRIPCIÓN

USOS DE PROTEÍNAS VÍRICAS CON ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA FRENTE A *Escherichia coli*

Campo de la invención

5 La presente invención se encuadra en el campo general de la ingeniería genética y en particular, se refiere a proteínas víricas que han sido modificadas mediante la adición de una cola policatiónica de aminoácidos en su extremo C-terminal, de tal forma que presentan actividad antibacteriana específica frente a *Escherichia coli* (*E. coli*) sin necesidad de tratamientos previos de permeabilización de la envoltura.

10

Estado de la técnica

Las endolisinas son enzimas producidas por bacteriófagos (virus que infectan bacterias). La función biológica de estas endolisinas es hidrolizar enlaces en la pared celular bacteriana al finalizar el ciclo reproductivo del virus, provocando así la lisis celular y la consiguiente liberación de los nuevos bacteriófagos producidos durante su etapa intracelular. Para poder acceder a su diana en la pared celular, estas enzimas necesitan de la participación de otras proteínas, denominadas holinas (Gutiérrez D, Fernández L, Rodríguez A, and García P (2018). Are Phage Lytic Proteins the Secret Weapon To Kill *Staphylococcus aureus*? MBio. 9(1)), que forman poros en la membrana citoplasmática.

20 Las endolisinas (junto con las holinas) son una de las familias de proteínas más diversas conocidas. Estructuralmente, pueden estar formadas por un único dominio globular, o compuestas por uno o dos dominios de unión a la pared celular y un dominio catalítico (García P, Rodríguez L, Rodríguez A, and Martínez B (2010). Food biopreservation: promising strategies using bacteriocins, bacteriophages and endolysins. Trends Food Sci Technol. 21(8): 373–382; Oliveira H, Melo LDR, Santos SB, Nóbrega FL, Ferreira EC, Cerca N, Azeredo J, and Kluskens LD (2013). Molecular aspects and comparative genomics of bacteriophage endolysins. J Virol. 87(8): 4558–70).

Debido a su capacidad de lisar bacterias, las endolisinas se han propuesto como agentes antibacterianos alternativos al empleo de antibióticos, ya que el uso de estos últimos ha dado lugar a la aparición de resistencias disminuyendo de manera considerable su eficacia (Love MJ, Bhandari D, Dobson RCJ, and Billington C (2018). Potential for Bacteriophage Endolysins

to Supplement or Replace Antibiotics in Food Production and Clinical Care. *Antibiot* (Basel, Switzerland). 7(1)).

Adicionalmente, el amplio espectro de actuación de muchos antibióticos puede dar lugar a efectos secundarios durante el tratamiento de infecciones, tales como la alteración de la microbiota natural del paciente al afectar a diferentes especies además del agente causal (Love MJ, Bhandari D, Dobson RCJ, and Billington C (2018). Potential for Bacteriophage Endolysins to Supplement or Replace Antibiotics in Food Production and Clinical Care. *Antibiot* (Basel, Switzerland). 7(1); O'Flaherty S, Ross RP, and Coffey A (2009). Bacteriophage and their lysins for elimination of infectious bacteria: Review article. *FEMS Microbiol Rev.* 33(4): 801–819).

Sin embargo, la utilización de endolisinas como agente antibacteriano en el grupo concreto de las bacterias Gram-negativas (G-) tiene varias limitaciones. En primer lugar, debido a problemas de accesibilidad a su diana en la pared celular por la presencia de una membrana lipídica externa (ME). Para paliar este problema se podría emplear un tratamiento permeabilizante de la ME o añadir a la endolisina colas policatiónicas (de aminoácidos con carga neta positiva) que ayuden a vencer las repulsiones electrostáticas debidas a la red de cargas negativas de la superficie celular (Walmagh M, Briers Y, Santos SB dos, Azeredo J, and Lavigne R (2012). Characterization of Modular Bacteriophage Endolysins from Myoviridae Phages OBP, 201φ2-1 and PVP-SE1. *PLoS One.* 7(5): e36991). En segundo lugar, hay muy poca variabilidad en la composición de la pared celular de las distintas especies de G-, comprometiendo la especificidad (Love MJ, Bhandari D, Dobson RCJ, and Billington C (2018). Potential for Bacteriophage Endolysins to Supplement or Replace Antibiotics in Food Production and Clinical Care. *Antibiot* (Basel, Switzerland). 7(1); Zampara A, Sørensen MCH, Grimon D, Antenucci F, Briers Y, and Brøndsted L (2018). Innolysins: A novel approach to engineer endolysins to kill Gram-negative bacteria. *bioRxiv.* 408948).

Por los motivos anteriormente expuestos, derivados de la problemática que en general afecta al empleo de endolisinas en G-, existe pues la necesidad de proporcionar proteínas con adecuada actividad lítica que no requieran tratamientos permeabilizantes, y que sean específicas de un grupo concreto de bacterias.

Breve descripción de la invención

La presente invención soluciona los problemas descritos en el estado de la técnica ya que proporciona proteínas con actividad antibacteriana específica frente a *E. coli* sin necesidad de tratamientos previos de permeabilización de su envoltura.

5 La presente invención describe un polipéptido con actividad endolisina (de aquí en adelante, péptido de la presente invención) que consiste en la secuencia de aminoácidos según la SEQ ID NO: 2 o un derivado del mismo. El polipéptido de la presente invención comprende una cola policationica de aminoácidos en el extremo C-terminal (SEQ ID NO: 2). En particular, comprende una cola policationica de histidinas.

10 En la presente invención el término “polipéptido” es sinónimo del término “proteína”. En la presente invención el término “polipéptido” se refiere a una secuencia de aminoácidos, donde dichos aminoácidos están unidos entre sí, por enlaces peptídicos.

El derivado del péptido que describe la presente invención comprende una adición y/o inserción en la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 2.

15 La presente invención describe un ácido nucleico aislado, que codifica el polipéptido de la presente invención (de aquí en adelante, ácido nucleico de la presente invención). Más en particular, el ácido nucleico de la presente invención, una vez clonado, codifica el polipéptido de secuencia aminoacídica según la SEQ ID NO:2. Más en particular, el ácido nucleico de la presente invención consiste en la secuencia nucleotídica según la SEQ ID NO: 1.

20 La presente invención describe un vector que comprende el ácido nucleico de la presente invención (de aquí en adelante vector de la presente invención).

La presente invención describe una célula hospedadora, que contiene el ácido nucleico de la presente invención, y/o el vector de la presente invención, y/o la proteína de la presente invención.

25 La presente invención describe un método para la transformación genética de una célula huésped mediante la introducción del ácido nucleico de la presente invención para que exprese el polipéptido de la presente invención. El polipéptido de la presente invención una vez expresado es purificado. La transformación genética, la expresión del polipéptido de la presente invención, y la purificación, pueden llevarse a cabo por métodos de ingeniería
30 genética conocidos por el experto en la materia.

En un primer aspecto, la presente invención se refiere al uso no terapéutico de un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos según la SEQ ID NO: 2 como antimicrobiano

frente a *E. coli*. En una realización particular, la presente invención se refiere al polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos según la SEQ ID NO: 2 como antimicrobiano en alimentos, cosméticos, aguas contaminados con *E. coli*.

5 En otro aspecto, la presente invención se refiere a un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos según la SEQ ID NO: 2 para su uso en el tratamiento de enfermedades producidas por *E. coli*. Más en particular, para el tratamiento de infecciones causadas por *E. coli*.

10 La presente invención describe una composición que comprende un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos según la SEQ ID NO: 2 (de aquí en adelante composición de la presente invención). La presente invención describe la composición de la presente invención que comprende un excipiente química y/o farmacéuticamente aceptable.

15 En la presente invención por “excipiente” se refiere a cualquier componente que no tiene actividad terapéutica y que es no tóxico, principalmente se refiere a vehículos y tampones tales como soluciones salinas, soluciones acuosas, emulsiones, colorantes, saborizantes, aromatizantes, etc.

En otro aspecto, la presente invención se refiere al uso no terapéutico de una composición que comprende un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos según la SEQ ID NO: 2 como antimicrobiano frente a *E. coli*. En una realización particular, como antimicrobiano en alimentos, cosméticos, aguas contaminadas con *E. coli*.

20 En otro aspecto, la presente invención se refiere a una composición que comprende un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos según la SEQ ID NO: 2 para su uso en el tratamiento de enfermedades producidas por *E. coli*. Más en particular, para el tratamiento de infecciones causadas por *E. coli*.

25 Descripción de las figuras

Figura 1. Muestra el vector de expresión pCDF-1b, utilizado para clonar las endolisinas de la presente invención. El vector presenta un sitio de clonación múltiple que incluye las secuencias de corte para las enzimas de restricción *NcoI* y *BamHI*, un casete de resistencia a estreptomicina (Sm) para la selección de transformantes, así como un promotor T7 y un
30 operador *lac* para inducir la expresión del gen clonado.

Figura 2. Muestra el resultado de un experimento de spot test realizado con UK-C a una concentración de 16 µg/mL sobre una cepa de *E. coli*. El halo de claridad alrededor del punto

donde se ha depositado la solución de la proteína indica el efecto inhibitor del crecimiento producido por la endolisina.

Descripción detallada de la invención

5 *Ejemplo 1: Clonación y expresión de la proteína vírica modificada UK-C.*

El gen sintético de la endolisina, de secuencia nucleotídica identificada en la presente invención como SEQ ID NO:1, aislado del profago (genoma de un fago insertado en una bacteria) identificado en el genoma de la cepa enterotoxigénica UMNK-88 de *E. coli*, se amplificó por PCR con los cebadores descritos en la tabla 1, bajo las siguientes condiciones:

10 1 ciclo de 5 min a 95°C; seguido por 25 ciclos de 10 s a 95°C, 30 s a 52°C, y 2 min a 72°C, y finalmente 1 ciclo de 10 min a 72 °C. El producto de la amplificación fue purificado y posteriormente digerido con la enzima de restricción *BamHI* durante 3 h a 37 °C para finalizar con una digestión mediante *NcoI* a 37 °C durante 24 h. Tras cada digestión, las enzimas se inactivaron a 80 °C durante 20 min, y los productos de digestión se purificaron así mismo tras

15 cada inactivación. El mismo procedimiento de restricción fue llevado a cabo con el plásmido pCDF-1b, el vector usado para la clonación (Figura 1), el cual fue finalmente tratado con fosfatasa alcalina, y posteriormente purificado de forma equivalente. Los productos digeridos de vector e inserto se mezclaron en una proporción 1:3 y se ligaron a 16 °C durante 16 h con la enzima DNA ligasa del bacteriófago T4. Las cantidades de cada una de las moléculas de

20 DNA se estimaron fluorimétricamente con un dispositivo Qubit (Invitrogen®).

Tabla 1: cebadores empleados en la clonación y expresión de la proteína vírica modificada UK-C

Cebador	Secuencia(5'-3')	Tamaño del amplicón (pb)	Uso
UK-C <i>Forward</i> UK-C <i>Reverse</i>	SEQ ID NO:3 SEQ ID NO: 4	541	Amplificación del gen de UK-C
T7 <i>Forward</i> T7 <i>Reverse</i>	SEQ ID NO: 5 SEQ ID NO:6	780	Confirmación de transformantes

El producto de ligación se transformó en células de BL21(AI) quimiocompetentes, preparadas de acuerdo al método descrito por Green y Rogers ([Green R, and Rogers EJ (2013). Transformation of chemically competent *E. coli*. Methods Enzymol. 529: 329–36). Los transformantes se seleccionaron mediante crecimiento en medio sólido LB conteniendo 100

µg/mL de estreptomicina. Posteriormente se amplificaron mediante PCR utilizando los cebadores correspondientes de confirmación (Tabla 1), bajo las siguientes condiciones: 1 ciclo inicial de 5 min a 95 °C; seguido por 25 ciclos de 30 s a 94 °C, 30 s a 53 °C, 80 s a 72 °C; y 1 ciclo final de 7 min a 72 °C.

- 5 Los productos de PCR de clones portadores de inserto se secuenciaron para confirmar su identidad y en tal caso se procedió a su expresión y la purificación de la proteína siguiendo el siguiente procedimiento. Una de las colonias transformantes confirmadas de esta manera, se transfirió a un matraz con 100 mL de caldo LB, incubando el cultivo a 37 °C y 200 rpm. Cuando la DO600 alcanzó un valor de 0,3 se indujo la expresión de la proteína mediante la adición de
10 IPTG y arabinosa, a las concentraciones finales de 1 mM y 0,3%, respectivamente. Tras 4 h de incubación del cultivo en las mismas condiciones, se centrifugó a 4000 g durante 30 min a 4 °C. Tras descartar el sobrenadante, las células se resuspendieron en tampón de lisis (50 mM Tris-HCl, pH 7,6; 1 mM Pefabloc; 0,1 mg/mL lisozima; 10 µg/mL DNAsa I) y se sonicaron en hielo, administrando 30 pulsos de 30 s a intervalos de 30 s. El lisado resultante se
15 centrifugó a 4000 g durante 30 min a 4 °C, y el sobrenadante se filtró a través de un filtro estéril de 0,45 µm seguido por una segunda filtración con un filtro de 0,22 µm. La proteína se purificó a partir del último filtrado con una columna Hispur™ Ni-NTA Chromatography (Thermo Fisher Scientific™) a 4 °C. La cantidad total de proteína purificada se determina por el método de Bradford (Kruger NJ (2009). The Bradford Method For Protein Quantitation.
20 Humana Press, Totowa, NJ; pp 17–24). El producto obtenido se congeló en nitrógeno líquido, tras lo cual se almacenó a -80 °C en alícuotas.

La eficacia de la endolisina UK-C purificada fue testada mediante experimentos de “spot test” frente a distintas cepas bacterianas. Cultivos de estas cepas crecidos en medio LB líquido a 37 °C hasta una DO600 de 0,3 se mezclaron con 5 mL de LB fundido a 50 °C y se vertieron
25 seguidamente sobre placas con medio LB sólido. Una vez solidificado todo el medio, se depositaron en su superficie alícuotas de 10 µL de suspensiones de la enzima UK-C a distintas concentraciones. Tras incubar a 37 °C durante 12 h, se observó la aparición de zonas de inhibición del crecimiento producidos por la lisis (Figura 2).

Los resultados obtenidos (tabla 2) demuestran que UK-C es capaz de lisar de forma directa a
30 la mayoría (91,2 %) de cepas de *E. coli* testadas (159 en total), sin necesidad de ningún tratamiento previo de permeabilización de su superficie celular. Además, su acción lítica se limita a esta especie sin afectar a ninguna de las bacterias ensayadas pertenecientes a otras especies, incluso aquellas próximamente emparentadas. En base a estos resultados, la

endolisina UK-C se confirma como un agente antimicrobiano con alta especificidad frente a *E. coli*.

Tabla 2. Resultados de los experimentos de “spot test” obtenidos con la endolisina UK-C frente a distintas cepas bacterianas.

Cepa	Uso en la invención	Sensibilidad a endolisina ¹	Información adicional
BL21(AI)	Clonado y expresión <i>Spot test</i>	+	<i>E. coli</i> : cepa de laboratorio
K12	<i>Spot test</i>	+	<i>E. coli</i> : cepa de laboratorio
ECOR01	<i>Spot test</i>	+	<i>E. coli</i> : cepa estándar de referencia ²
ECOR02	<i>Spot test</i>	+	<i>E. coli</i> : cepa estándar de referencia
ECOR04	<i>Spot test</i>	+	<i>E. coli</i> : cepa estándar de referencia
ECOR05	<i>Spot test</i>	+	<i>E. coli</i> : cepa estándar de referencia
ECOR06	<i>Spot test</i>	+	<i>E. coli</i> : cepa estándar de referencia
ECOR07	<i>Spot test</i>	+	<i>E. coli</i> : cepa estándar de referencia
ECOR08	<i>Spot test</i>	+	<i>E. coli</i> : cepa estándar de referencia
ECOR09	<i>Spot test</i>	+	<i>E. coli</i> : cepa estándar de referencia
ECOR10	<i>Spot test</i>	+	<i>E. coli</i> : cepa estándar de referencia
ECOR11	<i>Spot test</i>	+	<i>E. coli</i> : cepa estándar de referencia
ECOR12	<i>Spot test</i>	+	<i>E. coli</i> : cepa estándar de referencia
ECOR13	<i>Spot test</i>	+	<i>E. coli</i> : cepa estándar de referencia
ECOR14	<i>Spot test</i>	+	<i>E. coli</i> : cepa estándar de referencia
ECOR15	<i>Spot test</i>	+	<i>E. coli</i> : cepa estándar de referencia
ECOR16	<i>Spot test</i>	+	<i>E. coli</i> : cepa estándar de referencia
ECOR17	<i>Spot test</i>	+	<i>E. coli</i> : cepa estándar de referencia
ECOR18	<i>Spot test</i>	+	<i>E. coli</i> : cepa estándar de referencia
ECOR19	<i>Spot test</i>	+	<i>E. coli</i> : cepa estándar de referencia
ECOR20	<i>Spot test</i>	+	<i>E. coli</i> : cepa estándar de referencia

ECOR21	<i>Spot test</i>	-	<i>E. coli</i> : cepa estándar de referencia
ECOR22	<i>Spot test</i>	+	<i>E. coli</i> : cepa estándar de referencia
ECOR23	<i>Spot test</i>	-	<i>E. coli</i> : cepa estándar de referencia
ECOR24	<i>Spot test</i>	+	<i>E. coli</i> : cepa estándar de referencia
ECOR25	<i>Spot test</i>	+	<i>E. coli</i> : cepa estándar de referencia
ECOR26	<i>Spot test</i>	+	<i>E. coli</i> : cepa estándar de referencia
ECOR27	<i>Spot test</i>	+	<i>E. coli</i> : cepa estándar de referencia
ECOR28	<i>Spot test</i>	+	<i>E. coli</i> : cepa estándar de referencia
ECOR29	<i>Spot test</i>	+	<i>E. coli</i> : cepa estándar de referencia
ECOR30	<i>Spot test</i>	+	<i>E. coli</i> : cepa estándar de referencia
ECOR31	<i>Spot test</i>	+	<i>E. coli</i> : cepa estándar de referencia
ECOR32	<i>Spot test</i>	+	<i>E. coli</i> : cepa estándar de referencia
ECOR33	<i>Spot test</i>	+	<i>E. coli</i> : cepa estándar de referencia
ECOR34	<i>Spot test</i>	+	<i>E. coli</i> : cepa estándar de referencia
ECOR35	<i>Spot test</i>	+	<i>E. coli</i> : cepa estándar de referencia
ECOR36	<i>Spot test</i>	+	<i>E. coli</i> : cepa estándar de referencia
ECOR38	<i>Spot test</i>	+	<i>E. coli</i> : cepa estándar de referencia
ECOR39	<i>Spot test</i>	+	<i>E. coli</i> : cepa estándar de referencia
ECOR40	<i>Spot test</i>	+	<i>E. coli</i> : cepa estándar de referencia
ECOR41	<i>Spot test</i>	+	<i>E. coli</i> : cepa estándar de referencia
ECOR42	<i>Spot test</i>	+	<i>E. coli</i> : cepa estándar de referencia
ECOR43	<i>Spot test</i>	+	<i>E. coli</i> : cepa estándar de referencia
ECOR44	<i>Spot test</i>	-	<i>E. coli</i> : cepa estándar de referencia
ECOR45	<i>Spot test</i>	+	<i>E. coli</i> : cepa estándar de referencia
ECOR46	<i>Spot test</i>	+	<i>E. coli</i> : cepa estándar de referencia

ECOR47	<i>Spot test</i>	+	<i>E. coli</i> : cepa estándar de referencia
ECOR48	<i>Spot test</i>	+	<i>E. coli</i> : cepa estándar de referencia
ECOR49	<i>Spot test</i>	-	<i>E. coli</i> : cepa estándar de referencia
ECOR50	<i>Spot test</i>	+	<i>E. coli</i> : cepa estándar de referencia
ECOR51	<i>Spot test</i>	+	<i>E. coli</i> : cepa estándar de referencia
ECOR52	<i>Spot test</i>	+	<i>E. coli</i> : cepa estándar de referencia
ECOR53	<i>Spot test</i>	+	<i>E. coli</i> : cepa estándar de referencia
ECOR54	<i>Spot test</i>	+	<i>E. coli</i> : cepa estándar de referencia
ECOR55	<i>Spot test</i>	-	<i>E. coli</i> : cepa estándar de referencia
ECOR56	<i>Spot test</i>	+	<i>E. coli</i> : cepa estándar de referencia
ECOR57	<i>Spot test</i>	+	<i>E. coli</i> : cepa estándar de referencia
ECOR58	<i>Spot test</i>	+	<i>E. coli</i> : cepa estándar de referencia
ECOR59	<i>Spot test</i>	+	<i>E. coli</i> : cepa estándar de referencia
ECOR60	<i>Spot test</i>	+	<i>E. coli</i> : cepa estándar de referencia
ECOR61	<i>Spot test</i>	+	<i>E. coli</i> : cepa estándar de referencia
ECOR62	<i>Spot test</i>	+	<i>E. coli</i> : cepa estándar de referencia
ECOR63	<i>Spot test</i>	+	<i>E. coli</i> : cepa estándar de referencia
ECOR64	<i>Spot test</i>	+	<i>E. coli</i> : cepa estándar de referencia
ECOR65	<i>Spot test</i>	+	<i>E. coli</i> : cepa estándar de referencia
ECOR66	<i>Spot test</i>	+	<i>E. coli</i> : cepa estándar de referencia
ECOR67	<i>Spot test</i>	+	<i>E. coli</i> : cepa estándar de referencia
ECOR68	<i>Spot test</i>	+	<i>E. coli</i> : cepa estándar de referencia
ECOR69	<i>Spot test</i>	+	<i>E. coli</i> : cepa estándar de referencia
ECOR70	<i>Spot test</i>	+	<i>E. coli</i> : cepa estándar de referencia
ECOR71	<i>Spot test</i>	+	<i>E. coli</i> : cepa estándar de referencia

ECOR72	<i>Spot test</i>	+	<i>E. coli</i> : cepa estándar de referencia
ETEC01	<i>Spot test</i>	-	<i>E. coli</i> : cepa porcina (Dinamarca) ³ , serotipo O:149
ETEC02	<i>Spot test</i>	-	<i>E. coli</i> : cepa porcina (Dinamarca), serotipo O:149
ETEC03	<i>Spot test</i>	-	<i>E. coli</i> : cepa porcina (Dinamarca), serotipo O:139
ETEC04	<i>Spot test</i>	+	<i>E. coli</i> : cepa porcina (Dinamarca), serotipo O:149
ETEC05	<i>Spot test</i>	+	<i>E. coli</i> : cepa porcina (Dinamarca), serotipo O:141
ETEC06	<i>Spot test</i>	+	<i>E. coli</i> : cepa porcina (Dinamarca), serotipo O:139
ETEC07	<i>Spot test</i>	+	<i>E. coli</i> : cepa porcina (Dinamarca), serotipo O:139
ETEC08	<i>Spot test</i>	+	<i>E. coli</i> : cepa porcina (Dinamarca), serotipo O:149
ETEC09	<i>Spot test</i>	+	<i>E. coli</i> : cepa porcina (Dinamarca), serotipo O:149
ETEC10	<i>Spot test</i>	-	<i>E. coli</i> : cepa porcina (Dinamarca), serotipo O:139
ETEC11	<i>Spot test</i>	+	<i>E. coli</i> : cepa porcina (Dinamarca), serotipo O:139
ETEC12	<i>Spot test</i>	+	<i>E. coli</i> : cepa porcina (Dinamarca), serotipo O:149
ETEC13	<i>Spot test</i>	+	<i>E. coli</i> : cepa porcina (Dinamarca), serotipo O:149
ETEC14	<i>Spot test</i>	-	<i>E. coli</i> : cepa porcina (Dinamarca), serotipo O:149
ETEC15	<i>Spot test</i>	+	<i>E. coli</i> : cepa porcina (Dinamarca), serotipo O:149
ETEC16	<i>Spot test</i>	-	<i>E. coli</i> : cepa porcina (Dinamarca), serotipo O:139

ETEC17	<i>Spot test</i>	+	<i>E. coli</i> : cepa porcina (Dinamarca), serotipo O:149
ETEC18	<i>Spot test</i>	+	<i>E. coli</i> : cepa porcina (Dinamarca), serotipo O:149
ETEC19	<i>Spot test</i>	-	<i>E. coli</i> : cepa porcina (Dinamarca), serotipo O:149
ETEC20	<i>Spot test</i>	-	<i>E. coli</i> : cepa porcina (Dinamarca), serotipo O:149
ETEC21	<i>Spot test</i>	+	<i>E. coli</i> : cepa porcina (Dinamarca), serotipo O:139
ETEC22	<i>Spot test</i>	+	<i>E. coli</i> : cepa porcina (Dinamarca), serotipo O:149
ETEC23	<i>Spot test</i>	-	<i>E. coli</i> : cepa porcina (Dinamarca), serotipo O:141
ETEC24	<i>Spot test</i>	+	<i>E. coli</i> : cepa porcina (Dinamarca), serotipo O:141
ETEC25	<i>Spot test</i>	+	<i>E. coli</i> : cepa porcina (Dinamarca), serotipo O:139
ETEC26	<i>Spot test</i>	-	<i>E. coli</i> : cepa porcina (Dinamarca), serotipo O:149
ETEC27	<i>Spot test</i>	-	<i>E. coli</i> : cepa porcina (Dinamarca), serotipo O:149
ETEC28	<i>Spot test</i>	+	<i>E. coli</i> : cepa porcina (Dinamarca), serotipo O:141
ETEC29	<i>Spot test</i>	-	<i>E. coli</i> : cepa porcina (Dinamarca), serotipo O:149
ETEC30	<i>Spot test</i>	+	<i>E. coli</i> : cepa porcina (Dinamarca), serotipo O:139
ETEC31	<i>Spot test</i>	+	<i>E. coli</i> : cepa porcina (Dinamarca), serotipo O:149
ETEC32	<i>Spot test</i>	+	<i>E. coli</i> : cepa porcina (Dinamarca), serotipo O:149
ETEC33	<i>Spot test</i>	+	<i>E. coli</i> : cepa porcina (Dinamarca), serotipo O:149

ETEC34	<i>Spot test</i>	+	<i>E. coli</i> : cepa porcina (Dinamarca), serotipo O:149
ETEC35	<i>Spot test</i>	+	<i>E. coli</i> : cepa porcina (Dinamarca), serotipo O:139
ETEC36	<i>Spot test</i>	+	<i>E. coli</i> : cepa porcina (Dinamarca), serotipo O:139
ETEC37	<i>Spot test</i>	+	<i>E. coli</i> : cepa porcina (Dinamarca), serotipo O:149
ETEC38	<i>Spot test</i>	-	<i>E. coli</i> : cepa porcina (Dinamarca), serotipo O:149
ETEC39	<i>Spot test</i>	+	<i>E. coli</i> : cepa porcina (Dinamarca), serotipo O:138
ETEC40	<i>Spot test</i>	+	<i>E. coli</i> : cepa porcina (Dinamarca), serotipo O:141
ETEC41	<i>Spot test</i>	+	<i>E. coli</i> : cepa porcina (Dinamarca), serotipo O:141
ETEC42	<i>Spot test</i>	+	<i>E. coli</i> : cepa porcina (Dinamarca), serotipo O:139
ETEC43	<i>Spot test</i>	+	<i>E. coli</i> : cepa porcina (Dinamarca), serotipo O:139
ETEC44	<i>Spot test</i>	+	<i>E. coli</i> : cepa porcina (Dinamarca), serotipo O:149
ETEC45	<i>Spot test</i>	+	<i>E. coli</i> : cepa porcina (Dinamarca), serotipo O:149
ETEC02-08	<i>Spot test</i>	+	<i>E. coli</i> : cepa porcina (Murcia, España) ⁴
ETEC02-12	<i>Spot test</i>	+	<i>E. coli</i> : cepa porcina (Murcia, España)
ETEC03-26	<i>Spot test</i>	+	<i>E. coli</i> : cepa porcina (Murcia, España)
ETEC03-64	<i>Spot test</i>	+	<i>E. coli</i> : cepa porcina (Murcia, España)
ETEC06-40	<i>Spot test</i>	+	<i>E. coli</i> : cepa porcina (Murcia, España)
ETEC06-45	<i>Spot test</i>	+	<i>E. coli</i> : cepa porcina (Murcia, España)
ETEC11-21	<i>Spot test</i>	+	<i>E. coli</i> : cepa porcina (Murcia, España)

ETEC11-28	<i>Spot test</i>	+	<i>E. coli</i> : cepa porcina (Murcia, España)
ETEC13-17	<i>Spot test</i>	+	<i>E. coli</i> : cepa porcina (Murcia, España)
ETEC13-41	<i>Spot test</i>	+	<i>E. coli</i> : cepa porcina (Murcia, España)
ETEC15-09	<i>Spot test</i>	+	<i>E. coli</i> : cepa porcina (Murcia, España)
ETEC15-30	<i>Spot test</i>	+	<i>E. coli</i> : cepa porcina (Murcia, España)
1625848	<i>Spot test</i>	+	<i>E. coli</i> : cepa aviar (Castellón, España) ⁴
1707272	<i>Spot test</i>	+	<i>E. coli</i> : cepa aviar (Castellón, España)
1707273	<i>Spot test</i>	+	<i>E. coli</i> : cepa aviar (Castellón, España)
1708083	<i>Spot test</i>	+	<i>E. coli</i> : cepa aviar (Castellón, España)
1719578	<i>Spot test</i>	+	<i>E. coli</i> : cepa aviar (Castellón, España)
1721099	<i>Spot test</i>	+	<i>E. coli</i> : cepa aviar (Castellón, España)
1721100	<i>Spot test</i>	+	<i>E. coli</i> : cepa aviar (Castellón, España)
1721103	<i>Spot test</i>	+	<i>E. coli</i> : cepa aviar (Castellón, España)
1724989	<i>Spot test</i>	+	<i>E. coli</i> : cepa aviar (Castellón, España)
1725261	<i>Spot test</i>	+	<i>E. coli</i> : cepa aviar (Castellón, España)
1725262	<i>Spot test</i>	-	<i>E. coli</i> : cepa aviar (Castellón, España)
1725263	<i>Spot test</i>	+	<i>E. coli</i> : cepa aviar (Castellón, España)
1725264	<i>Spot test</i>	+	<i>E. coli</i> : cepa aviar (Castellón, España)
1725265	<i>Spot test</i>	+	<i>E. coli</i> : cepa aviar (Castellón, España)
1725377	<i>Spot test</i>	+	<i>E. coli</i> : cepa aviar (Castellón, España)
1727275	<i>Spot test</i>	+	<i>E. coli</i> : cepa aviar (Castellón, España)
1728039	<i>Spot test</i>	+	<i>E. coli</i> : cepa aviar (Castellón, España)
1728447	<i>Spot test</i>	+	<i>E. coli</i> : cepa aviar (Castellón, España)
1729548	<i>Spot test</i>	+	<i>E. coli</i> : cepa aviar (Castellón, España)
1730721	<i>Spot test</i>	+	<i>E. coli</i> : cepa aviar (Castellón, España)

1811038	<i>Spot test</i>	+	<i>E. coli</i> : cepa aviar (Castellón, España)
1815463	<i>Spot test</i>	+	<i>E. coli</i> : cepa aviar (Castellón, España)
1815464	<i>Spot test</i>	+	<i>E. coli</i> : cepa aviar (Castellón, España)
1815465	<i>Spot test</i>	+	<i>E. coli</i> : cepa aviar (Castellón, España)
1820121	<i>Spot test</i>	+	<i>E. coli</i> : cepa aviar (Castellón, España)
1820595	<i>Spot test</i>	+	<i>E. coli</i> : cepa aviar (Castellón, España)
1822680	<i>Spot test</i>	-	<i>E. coli</i> : cepa aviar (Castellón, España)
1822681	<i>Spot test</i>	+	<i>E. coli</i> : cepa aviar (Castellón, España)
1822682	<i>Spot test</i>	+	<i>E. coli</i> : cepa aviar (Castellón, España)
1822683	<i>Spot test</i>	+	<i>E. coli</i> : cepa aviar (Castellón, España)
1525846	<i>Spot test</i>	-	<i>Salmonella</i> : cepa aviar (Castellón, España) ⁶ , serotipo Typhimurium
1526709	<i>Spot test</i>	-	<i>Salmonella</i> : cepa aviar (Castellón, España), serotipo Typhimurium
1528220	<i>Spot test</i>	-	<i>Salmonella</i> : cepa aviar (Castellón, España), serotipo Typhimurium
1515416	<i>Spot test</i>	-	<i>Salmonella</i> : cepa aviar (Castellón, España), serotipo Typhimurium monofásica
1516142	<i>Spot test</i>	-	<i>Salmonella</i> : cepa aviar (Castellón, España), serotipo Typhimurium monofásica
1523709	<i>Spot test</i>	-	<i>Salmonella</i> : cepa aviar (Castellón, España), serotipo Typhimurium monofásica
1606449	<i>Spot test</i>	-	<i>Salmonella</i> : cepa aviar (Castellón, España), serotipo Hadar
1610748	<i>Spot test</i>	-	<i>Salmonella</i> : cepa aviar (Castellón, España), serotipo Hadar
1600005	<i>Spot test</i>	-	<i>Salmonella</i> : cepa aviar (Castellón, España), serotipo Infantis

1600502	<i>Spot test</i>	-	<i>Salmonella</i> : cepa aviar (Castellón, España), serotipo Infantis
1606338	<i>Spot test</i>	-	<i>Salmonella</i> : cepa aviar (Castellón, España), serotipo Kentucky
1604263	<i>Spot test</i>	-	<i>Salmonella</i> : cepa aviar (Castellón, España), serotipo Kentucky
1604278	<i>Spot test</i>	-	<i>Salmonella</i> : cepa aviar (Castellón, España), serotipo Mikawasima
1604897	<i>Spot test</i>	-	<i>Salmonella</i> : cepa aviar (Castellón, España), serotipo Ohio
1610595	<i>Spot test</i>	-	<i>Salmonella</i> : cepa aviar (Castellón, España), serotipo Ohio
1600668	<i>Spot test</i>	-	<i>Salmonella</i> : cepa aviar (Castellón, España), serotipo Senftenberg
1600669	<i>Spot test</i>	-	<i>Salmonella</i> : cepa aviar (Castellón, España), serotipo Senftenberg
1611229	<i>Spot test</i>	-	<i>Salmonella</i> : cepa aviar (Castellón, España), serotipo Typhimurium monofásica
1632401	<i>Spot test</i>	-	<i>Salmonella</i> : cepa aviar (Castellón, España), serotipo Virchow
1605660	<i>Spot test</i>	-	<i>Salmonella</i> : cepa aviar (Castellón, España), serotipo Virchow
1709159	<i>Spot test</i>	-	<i>Salmonella</i> : cepa aviar (Castellón, España), serotipo Heilderberg
1705878	<i>Spot test</i>	-	<i>Salmonella</i> : cepa aviar (Castellón, España), serotipo Typhimurium
1724918	<i>Spot test</i>	-	<i>Salmonella</i> : cepa aviar (Castellón, España), serotipo Typhimurium
7338	<i>Spot test</i>	-	<i>Salmonella</i> : cepa clínica (Elche, España) ⁷ , serotipo Typhimurium
7342	<i>Spot test</i>	-	<i>Salmonella</i> : cepa clínica (Elche, España), serotipo Typhimurium

7344	<i>Spot test</i>	-	<i>Salmonella</i> : cepa clínica (Elche, España), serotipo Typhimurium
7350	<i>Spot test</i>	-	<i>Salmonella</i> : cepa clínica (Elche, España), serotipo Typhimurium
7356	<i>Spot test</i>	-	<i>Salmonella</i> : cepa clínica (Elche, España), serotipo Typhimurium
7360	<i>Spot test</i>	-	<i>Salmonella</i> : cepa clínica (Elche, España), serotipo Typhimurium
7365	<i>Spot test</i>	-	<i>Salmonella</i> : cepa clínica (Elche, España), serotipo Typhimurium
7372	<i>Spot test</i>	-	<i>Salmonella</i> : cepa clínica (Elche, España), serotipo Typhimurium
7375	<i>Spot test</i>	-	<i>Salmonella</i> : cepa clínica (Elche, España), serotipo Typhimurium
7377	<i>Spot test</i>	-	<i>Salmonella</i> : cepa clínica (Elche, España), serotipo Typhimurium
7380	<i>Spot test</i>	-	<i>Salmonella</i> : cepa clínica (Elche, España), serotipo Typhimurium
7381	<i>Spot test</i>	-	<i>Salmonella</i> : cepa clínica (Elche, España), serotipo Typhimurium
7386	<i>Spot test</i>	-	<i>Salmonella</i> : cepa clínica (Elche, España), serotipo Typhimurium
7389	<i>Spot test</i>	-	<i>Salmonella</i> : cepa clínica (Elche, España), serotipo Typhimurium
7391	<i>Spot test</i>	-	<i>Salmonella</i> : cepa clínica (Elche, España), serotipo Typhimurium
7393	<i>Spot test</i>	-	<i>Salmonella</i> : cepa clínica (Elche, España), serotipo Typhimurium
7399	<i>Spot test</i>	-	<i>Salmonella</i> : cepa clínica (Elche, España), serotipo Typhimurium
7401	<i>Spot test</i>	-	<i>Salmonella</i> : cepa clínica (Elche, España), serotipo Typhimurium
7286	<i>Spot test</i>	-	<i>Salmonella</i> : cepa clínica (Elche, España), serotipo Paratyphi a

7295	<i>Spot test</i>	-	<i>Salmonella</i> : cepa clínica (Elche, España), serotipo Bredeney
7324	<i>Spot test</i>	-	<i>Salmonella</i> : cepa clínica (Elche, España), serotipo Legon
7343	<i>Spot test</i>	-	<i>Salmonella</i> : cepa clínica (Elche, España), serotipo Spartel
7362	<i>Spot test</i>	-	<i>Salmonella</i> : cepa clínica (Elche, España), serotipo Manhattan
7378	<i>Spot test</i>	-	<i>Salmonella</i> : cepa clínica (Elche, España), serotipo Ndolo
7383	<i>Spot test</i>	-	<i>Salmonella</i> : cepa clínica (Elche, España), serotipo Mikawasima
7400	<i>Spot test</i>	-	<i>Salmonella</i> : cepa clínica (Elche, España), serotipo Rissen
7405	<i>Spot test</i>	-	<i>Salmonella</i> : cepa clínica (Elche, España), serotipo 41:z10:1,2
7412	<i>Spot test</i>	-	<i>Salmonella</i> : cepa clínica (Elche, España), serotipo Paratyphi b
CECT 401	<i>Spot test</i>	-	<i>Citrobacter freundii</i> : cepa de laboratorio
CECT 143	<i>Spot test</i>	-	<i>Klebsiella pneumoniae</i> : cepa de laboratorio
CECT 484	<i>Spot test</i>	-	<i>Proteus vulgaris</i> : cepa de laboratorio
CECT 110	<i>Spot test</i>	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> : cepa de laboratorio
CECT 378	<i>Spot test</i>	-	<i>Pseudomonas fluorescens</i> : cepa de laboratorio
CECT 910	<i>Spot test</i>	-	<i>Listeria innocua</i> : cepa de laboratorio
CECT 193	<i>Spot test</i>	-	<i>Bacillus cereus</i> : cepa de laboratorio
CECT 239	<i>Spot test</i>	-	<i>Staphylococcus aureus</i> : cepa de laboratorio

1, Aparición (+) o no (-) de claridad en el crecimiento en el ensayo de spot test en la zona donde se añade una concentración de endolisina de 16 µg/mL.

2, Ochman H, and Selander R (1984). Standard reference strains of *E. coli* from natural populations. J Bacteriol. 157(2): 690–693.

5

3, Cepas enterotoxigénicas de *E. coli*, por cortesía del Dr. Anders Nilsson (Universidad de Estocolmo, Suecia).

4, Cepas enterotoxigénicas de *E. coli* aisladas por la Universidad de Alicante en salidas de campo a granjas porcinas, por cortesía de DHESA (Fortuna, Murcia, España).

5 5, Cepas aviáres de *E. coli*, por cortesía del Dr. Pablo Catalá (CECAV, Castellón, España).

6, Cepas aviáres de *Salmonella*, por cortesía del Dr. Pablo Catalá (CECAV, Castellón, España).

7, Cepas clínicas de *Salmonella*, por cortesía del servicio de Microbiología del Hospital General Universitario de Elche (Alicante, España).

REIVINDICACIONES

1. Uso no terapéutico de un polipéptido que consiste en una secuencia aminoacídica según la secuencia SEQ ID NO:2 como antimicrobiano frente a *E. coli*.
2. Polipéptido que consiste en una secuencia aminoacídica según la secuencia SEQ ID NO:2 para su uso en el tratamiento de enfermedades producidas por *E. coli*.
3. Uso no terapéutico de una composición que comprende un polipéptido que consiste en una secuencia aminoacídica según la secuencia SEQ ID NO:2 como antimicrobiano frente a *E. coli*.
4. Composición que comprende un polipéptido que consiste en una secuencia aminoacídica según la secuencia SEQ ID NO:2 para su uso en el tratamiento de enfermedades producidas por *E. coli*.

FIG.1

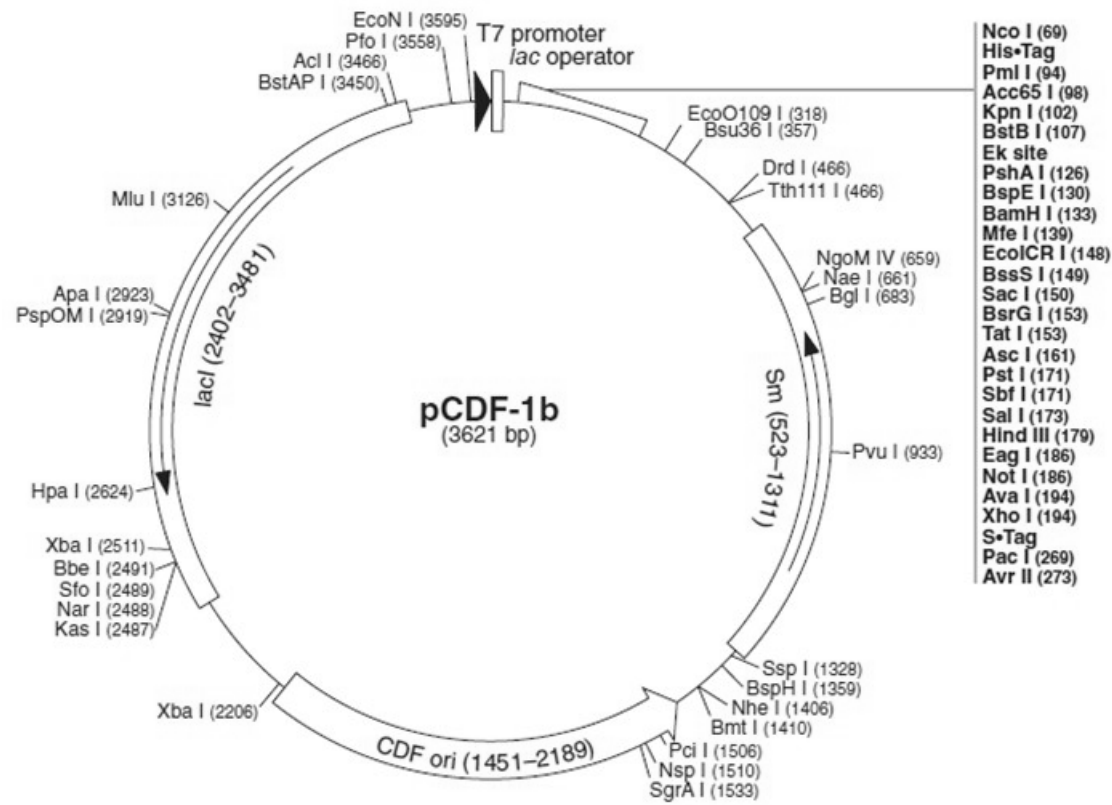


FIG.2

