



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 116 221**

⑫ Número de solicitud: 9601109

⑤① Int. Cl.⁶: A01N 43/40

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫② Fecha de presentación: **17.05.96**

⑫③ Fecha de publicación de la solicitud: **01.07.98**

⑫③ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
01.07.98

⑦① Solicitante/s: **Universidad de Málaga**
Plaza de El Ejido s/n
29071 Málaga, ES

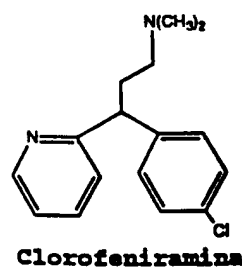
⑦② Inventor/es: **Sánchez Jiménez, Francisca María;**
Medina Torres, Miguel Angel;
Torres Montosa, Juan Antonio y
González González, Dolores

⑦④ Agente: **No consta**

⑤④ Título: **Aplicación de la clorofeniramina en la regulación del crecimiento fúngico.**

⑤⑦ Resumen:

Aplicación de la clorofeniramina como regulador del crecimiento fúngico, en base a los resultados obtenidos sobre cultivos *in vitro* de diferentes especies de hongos. El maleato de clorofeniramina presenta un efecto bifásico, dependiente de la concentración, sobre la proliferación fúngica, similar al efecto observado sobre algunas líneas proliferantes de mamíferos. El maleato de clorofeniramina (mezcla racémica) añadido al medio de cultivo a concentración final 10 micromolar potencia el crecimiento fúngico de distintas especies, por lo que tiene posible aplicación en la preparación de medios de cultivo potenciadores del crecimiento y/o la productividad fúngica. Por el contrario, concentraciones superiores a 100 micromolar de clorofeniramina (mezcla racémica) inhiben el crecimiento de distintas especies de hongos saprofitos y parásitos de frutos con importancia económica, por lo que se podría utilizar en la preparación de agentes antifúngicos.



ES 2 116 221 A1

DESCRIPCION

Aplicación de la clorofeniramina en la regulación del crecimiento fúngico.

Campo de la técnica

La presente invención tiene su aplicación dentro de la industria dedicada a la fabricación de agentes reguladores del crecimiento fúngico, especialmente para el control de enfermedades fúngicas vegetales.

Antecedentes

El índice MERCK (décima edición de 1983) describe la clorofeniramina ($C_{16}H_{19}ClN_2$) como: gamma-(4-clorofenil)-N,N-dimetil-2-piridinopropanamina; ó 2-[p-cloro-alfa-(2-dimetilaminoetil)bencil piridina. Otros nombres para este compuesto son: 1-(p clorofenil)-1-(2-piridil)-3-N,N,dimetilpropilamina; 3-(p-clorofenil)-3-(2-piridil)-3-N,N,di-metilpropilamina; gamma-(4-clorofenil)-gamma-(2-piridil) propildimetil-amina; clorpropenpiridamina; etc.

La síntesis de este compuesto fue patentada por Schering en EE.UU. con números de patente: 2,567,245 (de 1951) y 2,676,964 (de 1954). Tanto en terapia humana como veterinaria, este compuesto está catalogado como un antihistamínico, formando parte de múltiples fórmulas comerciales(anti-inflamatorios, antihistamínicos, antigripales, etc), como por ejemplo, las recogidas en la patente ES 2 019 634 (fecha de publicación de 2.12.87). La LD₅₀ de administración oral de clorofeniramina calculada con ratones es de 162mg/kg. El peso molecular de la forma comercial, maleato de clorofeniramina, mezcla racémica, es de 390.9 g/mol (ver producto de la marca SIGMA Química, España, referencia C-4915). El mecanismo de acción como antihistamínico probado para este compuesto se basa en su capacidad antagonista de la unión de la histamina (2-(4-imidazolil) etilamina, producto de la histidina descarboxilasa, EC 4.1.1.22) a los receptores de tipo H1 de células de mamíferos (Timmerman, *J. Med. Chem.*, 33, 1990, 4-11).

Recientemente, hemos comprobado que la clorofeniramina, como otras 1,4-diaminas naturales y sintéticas, inhibe la expresión de la enzima ornitina descarboxilasa (EC 4.1.1.17), y la proliferación de tumores mamarios in vivo en un 50% (0.5mg i.p. /día/ animal). En cultivo de células de tumores mamarios experimentales y humanos, no sólo reduce la proliferación celular sino que a concentración de 250 micromolar actúa como un citotóxico (Urdiales *et al.*, *FEBS Lett.*, 305, 1992, 260-264; Medina *et al.*, *Breast Cancer Res. Treat.*, 35, 1995, 187-194). Sin embargo, a bajas concentraciones, este antihistamínico produce un efecto estimulador de la proliferación celular en algunos tipos tumorales (Medina *et al.*, *Breast Cancer Res. Treat.*, 35, 1995, 187-194).

El mecanismo molecular de acción de este compuesto sobre la viabilidad y el crecimiento de células proliferantes debe estar relacionado, al menos en parte, con su capacidad de unión a los ácidos nucleicos, modificando su conformación (mediante interacciones hidrofóbicas y electrostáticas). Así, por ejemplo, se ha demostrado que la clorofeniramina inhibe la iniciación de la traducción de la enzima ornitina descarboxi-

lasa, que es estrictamente dependiente de la desnaturalización del extremo 5' de su mensajero. La clorofeniramina debe, por tanto, estabilizar esta estructura secundaria del mRNA (Medina *et al.*, *Breast Cancer Res. Treat.*, 35, 1995, 187-194).

No obstante, no pueden descartarse otras vías de actuación de este compuesto que contribuyan a su efecto antiproliferativo. En cualquier caso, otros antagonistas de receptores de histamina como el DPPE (N,N-dietil-2-[4(fenilmetil)fenoxil etanoamina) y el histidinol ó [3-(4-imidazolil)-2-amino-1-propanol] también regulan el crecimiento *in vivo* y en cultivo de algunos tipos celulares cancerosos y células proliferantes animales (Brandes *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 179, 1991, 12971304; Zaharko *et al.*, *Cancer Res.*, 52, 1992, 3604-3609; Mitsuhashi y Payan, *J. Invest. Dermatol.*, 98, 1992, 8S-11s).

Dada la universalidad del metabolismo de la histamina y la histidina descarboxilasa, descrita desde procariotas (*E. coli*, *Lactobacillus* sp., *Morganella* sp., etc) hasta el hombre, y su relación con la proliferación celular de bacterias y mamíferos (Kamath *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 266, 1991, 9432-9437; Bartholeyns y Bouclier, *Cancer Res.*, 44, 1984, 639-645), nos planteamos la posibilidad de desarrollar una nueva aplicación de este fármaco como agente regulador de la proliferación de otros modelos eucariotas distintos del reino animal.

El reino Fungi incluye una gran variedad de organismos eucariotas con repercusión económica contrapuesta. Desde aquellos organismos que han servido de pilar fundamental para la Biotecnología y la industria asociada a sus productos (*Saccharomyces* sp., *Penicillium* sp., etc), hasta otros patógenos o saprofitos cuya proliferación representa un problema indeseable en distintas áreas de la Biomedicina y la Agroalimentación. Por tanto, decidimos probar el efecto de análogos de histamina sobre el crecimiento de hongos de especies representativas.

Uno de los problemas más importantes de la rentabilidad de las cosechas en almacén, es su frecuente contaminación por hongos saprofitos o patógenos que inhabilitan la comercialización del producto. Entre las especies más frecuentes que colonizan los frutos en estadio post-cosecha están algunas de los géneros *Alternaria* y *Penicillium*. Por otra parte, los métodos preventivos de contaminación de frutos post-cosecha incluyen la reducción de la temperatura y los niveles de oxígeno durante el almacenamiento, y el tratamiento de los frutos con fungicidas del tipo de los benzoimidazoles (ej.: benomilo ó metil 1-(butilcarbamil)2-benzimidazolcarbamato), las dicarboximidas (ej.: iprodiona, vinclozolin), otros hidrocarburos aromáticos como los derivados clorobencénicos: hexaclorobenceno, diclorano, etc; y los inhibidores de la biosíntesis de ergosterol (ej.: feranimol e imazalil, y la misma iprodiona).

En concreto, esta última familia de fungicidas comprende un grupo heterogéneo de sustancias que, según Fusch y de Waard (en: *Fungicide resistance in crop protection*, 1982, Centre for Agricultural Publishing and Documentation, Wageningen), tienen en común el presentar, al menos, un nitrógeno contenido en un anillo he-

terocíclico y un carbono asimétrico; pudiéndose clasificar en:

- A) compuestos con un anillo saturado y dos átomos de nitrógeno (ej.: triforina), o un átomo de nitrógeno y otro de oxígeno (ej.: tridemorph); y
- B) compuestos con un anillo insaturado de seis átomos que contiene un átomo de nitrógeno (ej.: EL-241 y otros derivados de piridina), o dos átomos de nitrógeno (ej.: feranimol y otros derivados de pirimidina), así como imidazoles (ej.: imazalil, prochloraz, etc).

La figura 1 compara la estructura química de la clorfeniramina con las de algunos fungicidas comerciales de los nombrados anteriormente, según el programa HyperChem de modelización molecular. Ciertamente, existe cierta analogía estructural entre estos fungicidas y la clorfeniramina u otros análogos de la histamina; en todo caso, la clorfeniramina cumple los supuestos descritos por Fusch y de Waard ya que contiene un carbono asimétrico y un anillo heterocíclico de piridin. Muchos de los fungicidas mejor caracterizados mencionados anteriormente (incluyendo la iprodiona, imazalil o EL-241) también contienen radicales de clorobenceno, al igual que la clorfeniramina. La figura 2 muestra las imágenes estereoscópicas del feranimol (fórmulas superiores) y de la clorfeniramina (fórmulas inferiores) en su configuración más probable, calculada por el programa HyperChem de modelización molecular. No obstante, a pesar de tener mecanismos de acción diferentes, tanto la iprodiona, también llamada 3-(3,5-diclorofenil)-N-(1-metiletil)-2,4-dioxo-1-imidazolidina carboxiamida, como el benomilo o el imazalil, contienen anillos imidazólicos, al igual que la histamina. Mientras que el mecanismo de acción del benomilo parece basarse en la interferencia de la formación del citoesqueleto, la mayoría de los otros compuestos mostrados en la figura 1, con actividad fungicida demostrada y patentada, interfieren con la biosíntesis del ergosterol y se comercializan bajo distintos nombres. Por ejemplo Fungafloor, Fecundal (imazalil) Rubigan, Rimidin (fenanimol), etc.

Por último, son múltiples las semejanzas estructurales y funcionales de los análogos de histamina (producto de la histidina descarboxilasa) y las poliaminas (productos de la ornitina descarboxilasa). Nuestro grupo de investigación lleva más de siete años estudiando este tema sobre células tumorales (Matés *et al.*, *Biochem. Pharmacol.*, 42, 1991, 1045-1052; Viguera *et al.*, *Trends Biochem. Sci.*, 19, 1994, 318-319). Las poliaminas derivadas de ornitina, así como la histamina, se han descrito como cationes orgánicos fundamentales para la proliferación celular en distintos modelos distribuidos a lo largo de toda la escala filogenética. Sin embargo, cuando las concentraciones intracelulares de poliaminas aumentan en exceso, terminan siendo tóxicas para la célula (Poulin *et al.*, *Biochem. J.*, 311, 1995, 723-727). En 1988, un análogo metil-fluorado de ornitina e inhibidor irreversible de la ornitina descarboxilasa, el DFMO (DL-alfa-difluorometilornitina

o MM71782) fue patentado como fungicida por Carson y McCann (Patente U.S.A. 4760091, Chemical Abstracts 109, 185468). Este compuesto inhibe el crecimiento radial *in vitro* de *Botrytis cinerea* en medio Czapek-Dox/agar a concentración 1 mM del inhibidor (Smith *et al.*, *J. General Microbiol.*, 136, 1990, 985-992), siendo también efectivo sobre el crecimiento de otros hongos como *Verticillium dahliae* o *Uromyces phaseoli* creciendo tanto *in vitro*, en medio Czapek-Dox/agar, como sobre hojas de distintas especies vegetales compatibles (Rajam *et al.*, *Proc. Matl. Acad. Sci. USA*, 82, 1985, 6874-6878; Mussell *et al.*, *Plant Disease*, 71, 1987, 313-318).

A pesar del gran paralelismo entre el metabolismo y función biológica de las aminas derivadas de histidina y ornitina sobre células proliferantes de mamíferos (Sánchez-Jiménez *et al.*, *Advances in the Biosciences*, vol.49, 1993, pp. 40-70, Pergamon Press), no conocemos ninguna referencia bibliográfica o patente proponiendo al análogo de histamina, clorfeniramina, con potencial antifúngico. No obstante, no sería de extrañar que un determinado compuesto fuese un agente antiproliferativo en ambos modelos eucariotas (hongos y mamíferos). De hecho, es un caso común que conocidos fungicidas actúen como antitumorales. Por ejemplo, algunos benzaimidazoles, análogos estructurales y funcionales del benomilo, están descritos como un potentes antitumorales, incluyendo cáncer humano (Brabander *et al.*, *En: Microtubules and Microtubules Inhibitors*, 1975, North Holland Publishing Co., Amsterdam).

Breve descripción

La adición de maleato de cloro feniraffina, en adelante CPA, (mezcla racémica, SIGMA C-4915) a concentración final 10 micromolar en medio Czapek-Dox/agar tuvo un efecto estimulador de la proliferación *in vitro* de cepas de las siguientes especies: *Alternaria alternata*, *Penicillium digitatum*, *Cladosporium cladosporioides*. CPA se añadió al medio a pH neutro. El crecimiento radial se siguió por análisis de imagen del halo de crecimiento de las distintas especies.

Por el contrario, la adición de concentraciones en el rango 100-500 micromolar de CPA (pH neutro) a cultivos *in vitro* de cepas de *Alternaria alternata*, *Penicillium brevicompactum*, *Penicillium digitatum*, *Cladosporium cladosporioides* y *Botrytis cinerea*, inhibía el crecimiento de estas especies de forma significativa.

En tres cepas distintas de *Alternaria alternata* y en cultivos de *Penicillium brevicompactum*, *Penicillium digitatum* y *Cladosporium cladosporioides*, 500 micromolar de CPA resultó más eficaz como inhibidor del crecimiento que la iprodiona a igual concentración. En las tres cepas de *Alternaria alternata*, 500 micromolar de CPA resultó también ser más eficaz que el benomilo, a igual concentración.

De estos resultados se concluye que CPA podría tener aplicación como regulador del crecimiento fúngico. El estímulo que causa a bajas concentraciones (50 micromolar o inferiores) podría tener aplicación en cultivos de interés biotecnológico (crecimiento de cepas productoras de antibióticos, por ejemplo). La inhibición causada por clorfeniramina a concentraciones superiores a

100 micromolar podría ser de interés en la prevención del crecimiento fúngico sobre frutos en estadio post-cosecha.

Todos los hongos mencionados en esta memoria sobre los que CPA tiene un efecto inhibitor *in vitro* se han aislado de vegetales, y son conocidos saprofitos y/o parásitos de frutos recolectados.

Descripción detallada de la invención

Se estudió el efecto de distintas concentraciones de CPA (10, 50, 100 y 500 micromolar) sobre cultivos *in vitro* de hongos de las siguientes especies aisladas de los frutos indicados en paréntesis:

- *Alternaria alternata*, cepa CH7 (aislada de *Annona cherimola* Mill.= chirimoya).
- *Alternaria alternata*, cepa CH8 (aislada de chirimoya).
- *Alternaria alternata*, cepa CH24 (aislada de chirimoya).
- *Penicillium brevicompactum*, cepa CH9A (aislada de chirimoya)
- *Penicillium corylophilum*, cepa CH9B (aislada de chirimoya)
- *Penicillium digitatum*, cepa N (aislada de *Citrus aurantium* = naranja).
- *Cladosporium cladosporoides* CH1 (aislada de chirimoya).

Los hongos se aislaban y mantenían en medio agar/patata/dextrosa. Todos los experimentos se realizaron en medio Czapek-Dox/agar en placas Petri de cultivo. CPA se añadía al medio a la concentración indicada en cada caso, a partir de una disolución concentrada que previamente había sido neutralizado y esterilizada por filtración. Posteriormente, se procedía a la inoculación de los hongos, depositando en el centro de la placa un círculo de 5mm de diámetro de micelio, que procedía del borde de un cultivo previo en crecimiento activo. En la nueva placa, el crecimiento de los hongos se siguió por análisis de imagen de los halos de crecimiento de los hongos, cuantificándose el área de los halos en milímetros cuadrados. Todas las medidas se efectuaron por triplicado. El área total de las placas de cultivo utilizadas es 5.370 milímetros cuadrados.

Las concentraciones iguales o inferiores a 50 micromolar de CPA tuvieron un efecto estimulador sobre el crecimiento de las tres cepas de *A. alternata* utilizadas, y sobre las de *P. digitatum* y *C. cladosporoides*. Este efecto aparecía en los primeros días del cultivo y se prolongaba durante toda la incubación (máximo de 18 días). No se observó efecto estimulador significativo por parte de CPA en el rango 10-500 micromolar sobre *P. brevicompactum* o *P. corylophilum*. La figura 3 representa el porcentaje de crecimiento respecto al control de los cultivos de las especies a las que CPA estimulaba el crecimiento, a concentración igual o menor a 50 micromolar. Estos porcentajes están calculados al día 7 de cultivo, cuando los cultivos, se encuentran en fase logarítmica de crecimiento. Como representación de *A. alternata* se

utilizó la cepa CH24 para su representación. En las otras dos cepas de esta especie utilizadas en los ensayos, los resultados fueron similares.

Como se indicaba en los antecedentes, esta respuesta bifásica de la proliferación frente a poliaminas derivadas de ornitina, o a histamina y sus análogos (L-histidinol, DPPE, CPA), se han observado en multitud de ocasiones sobre cultivos de células de mamíferos. El presente trabajo demuestra que algunos miembros del reino Fungi presentan la misma respuesta bifásica frente a CPA, y que este hallazgo podría tener aplicabilidad durante la fase proliferativa y/o productora de cultivos de hongos de interés industrial.

En la figura 3 también puede observarse que a concentraciones iguales o superiores a 100 micromolar, CPA inhibía el crecimiento fúngico de *A. alternata* y *P. digitatum*, en un porcentaje significativo. Ampliamos las especies mencionadas en esta figura a una tercera de *Botritis cinerea* aislada de frutos de tomate (*Lycopersicon esculentum*) y cultivada *in vitro* como se describe para las demás especies. Los resultados se muestran en la figura 4.

Con objeto de coinparar la efectividad antifúngica de CPA frente a distintas especies de hongos, se probó su efecto junto con el del benomilo y el de la iprodiona, a concentraciones finales 500 micromolar sobre distintas especies, en igualdad de condiciones de cultivo. El crecimiento de un cultivo en ausencia de estos compuestos se consideró 100%. La siguiente tabla resume los resultados de porcentajes de la inhibición del crecimiento causada por los diferentes compuestos a los 7 días de cultivo (fase logarítmica de crecimiento):

Especie	Benomilo	Iprodiona	CPA
<i>A. alternata</i> (CH7)	29(*)	47(*)	82(*)
<i>A. alternata</i> (CH8)	23(*)	35(*)	77(*)
<i>A. alternata</i> (CH24)	51(*)	57(*)	85(*)
<i>P. brevicompactum</i>	98(*)	0	30(*)
<i>P. corylophilum</i>	0	1	20
<i>P. digitatum</i>	99(*)	20(*)	55(*)
<i>C. cladosporoides</i>	89(*)	0	22(*)

(*) Se señalan con asterísco las diferencias estadísticamente significativas respecto al control, según el test SNK (p<0.5).

Como ejemplo representativo, en la figura 5 se muestra el crecimiento de la cepa CH24 de *Alternaria alternata* en presencia de los distintos compuestos a 500 micromolar de concentración final.

La figura 6 muestra la fotografía de uno de los cultivos controles de *Alternaria alternata* CH24 (derecha), junto con un cultivo de la misma cepa tratado con CPA a 500 micromolar (izquierda), tras llevar ambos cultivos 11 días de incubación.

Explicación de las figuras

Figura 1. Representación de las estructuras químicas de la clorfeniramina y de diversos fungicidas comerciales, según el programa HyperChem de modelización molecular (Chem-Plus 1.5, 1993-95, Hypercube Inc., EE.UU.).

Figura 2. A) Fórmulas químicas de la clorofeniramina y elfenarimol, destacando los átomos de nitrógeno y los carbonos asimétricos; B) Representación estereoscópica de la estructura espacial de la clorofeniramina y el fenarimol (no se destacan los substituyentes), según el programa HyperChem de modelización molecular (Chem-Plus 1.5, 1993-95, Hypercube Inc., EE.UU.).

Figura 3. Dependencia de la concentración del efecto causado por la clorofeniramina, añadida a tiempo 0, sobre el crecimiento de distintas cepas de hongos aislados de frutos vegetales. Como controles se utilizaron cultivos de cada especie, sembrados y crecidos simultáneamente en un medio carente de clorofeniramina. El crecimiento de estos controles se consideró el 100%. Todas las medidas se realizaron por triplicado.

Figura 4. Efecto causado por CPA (250 y 500 micromolar) sobre el crecimiento de una cepa de *Botritis cinerea* aislada de *Lycoper-*

sicon esculentum (tomate). Como control se utilizaron cultivos sembrados y crecidos simultáneamente pero no tratados con clorofeniramina. Todos los cultivos se realizaron en Czapek-Dox/agar. CPA se añadía a tiempo 0. Todas las medidas se realizaron por triplicado.

Figura 5. Efecto de CPA y los fungicidas iprodiona y benomilo añadidos a tiempo 0 sobre cultivos de *A. Alternata* (CH24) en medio Czapek-Dox/Agar. Todos los compuestos se añadieron al medio de cultivo a una concentración final de 500 micromolar. Todas las medidas se realizaron por triplicado.

Figura 6. Efecto de CPA añadida a tiempo 0 sobre un cultivos de *A. Alternata* (CH24) en medio Czapek-Dox/Agar. Todos los compuestos se añadieron al medio de cultivo a una concentración final de 500 micromolar. Todas las medidas se realizaron por triplicado.

REIVINDICACIONES

1. El uso de cualquiera de los isómeros ópticos de la clorofeniramina en medios de cultivos fúngicos como reguladores del crecimiento y la productividad de los mismos.

2. El uso de cualquiera de los isómeros ópticos de la clorofeniramina como inhibidores del creci-

miento fúngico, sólo o en combinación con otras sustancias fungicidas o aditivos que faciliten su administración.

3. De acuerdo con la reivindicación 2, el uso de la clorofeniramina en la manufactura de preparados comerciales para el control de enfermedades fúngicas vegetales.

10

15

20

25

30

35

40

45

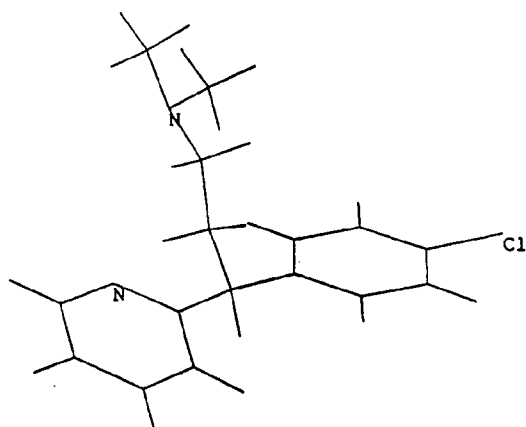
50

55

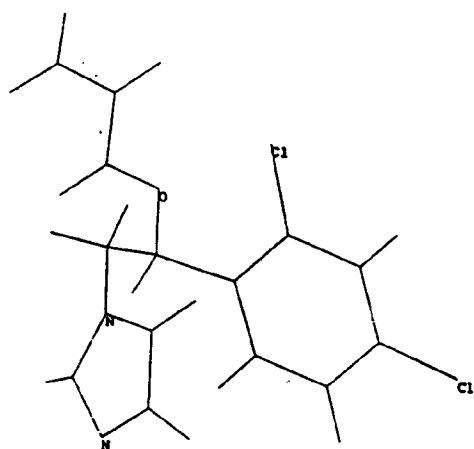
60

65

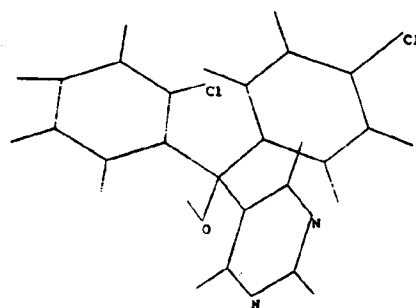
FIGURA 1



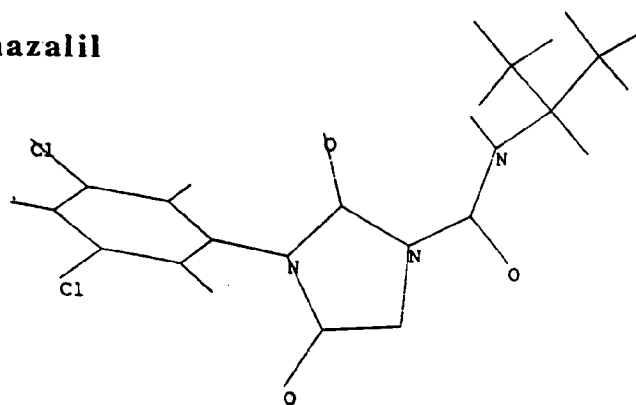
D-clorofeniramina



D-imazalil



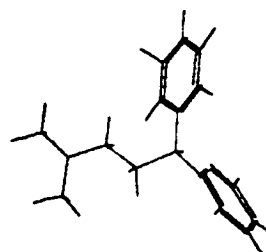
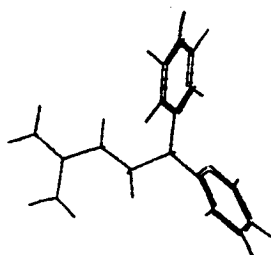
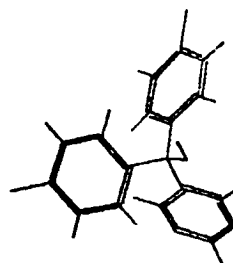
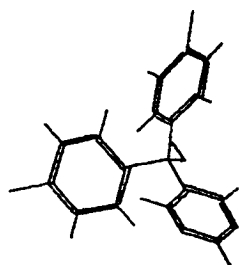
D-fenarimol



iprodiona

FIGURA 2

Fenarimol



Clorofeniramina

FIGURA 3

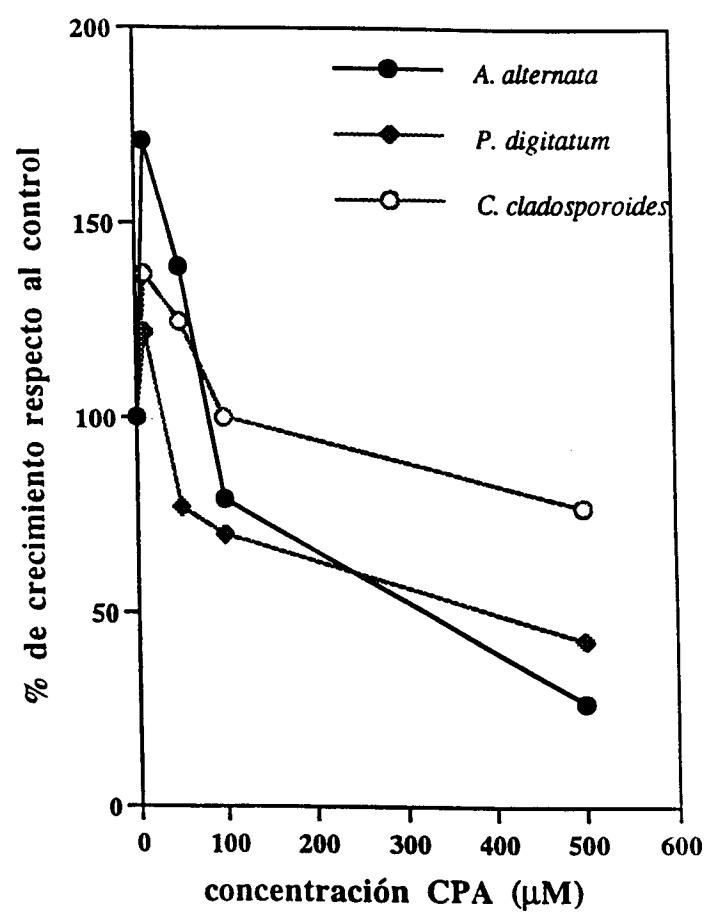


FIGURA 4

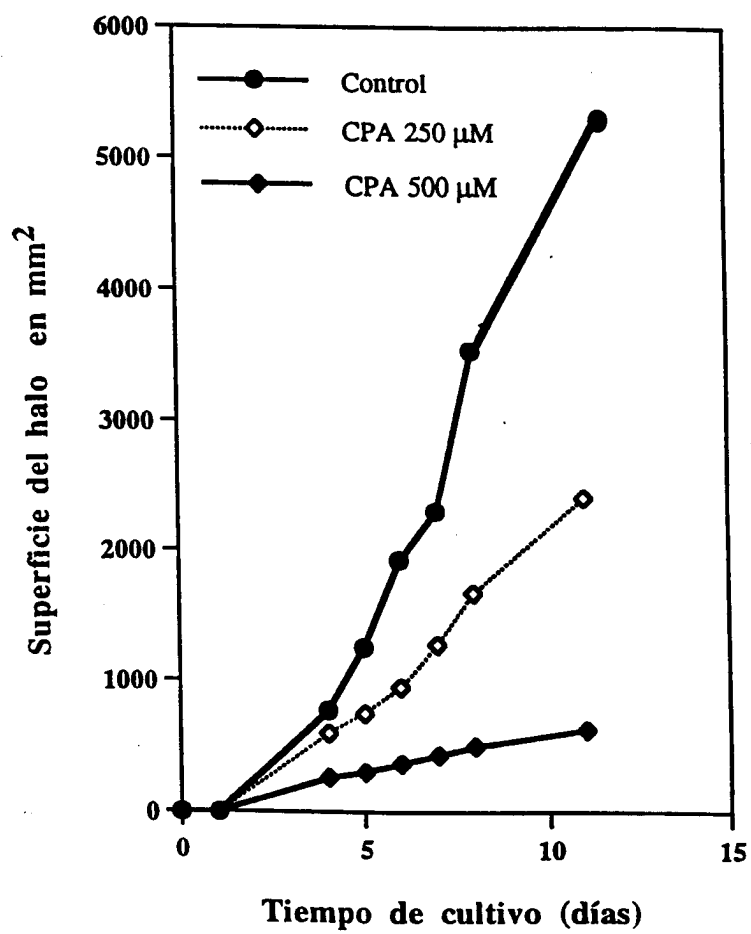


FIGURA 5

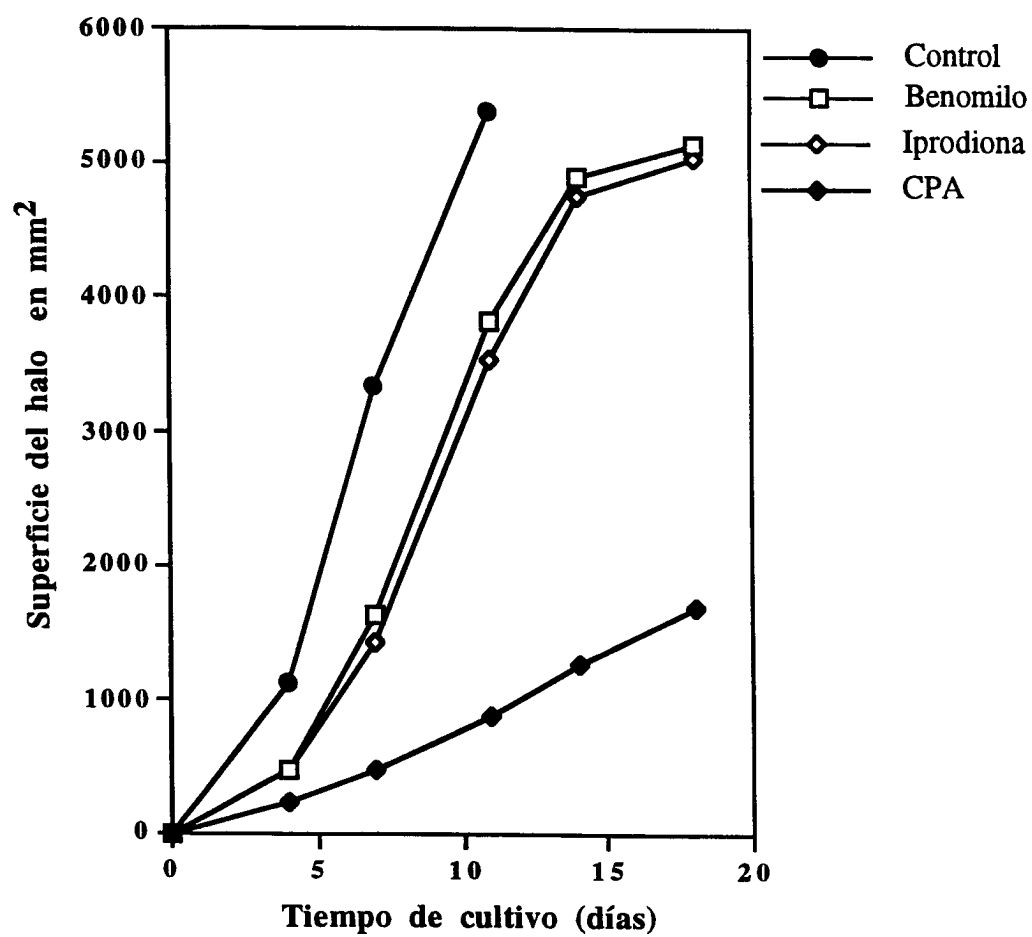
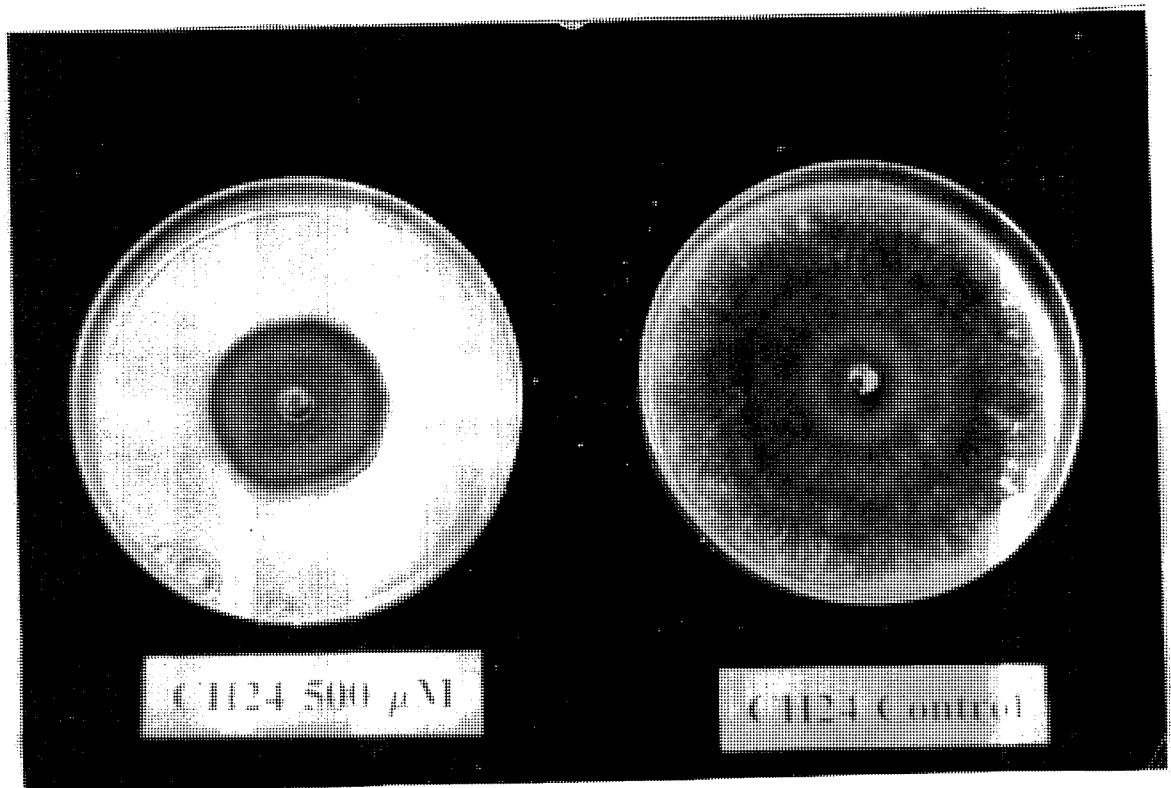


FIGURA 6





OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA

- ⑪ ES 2 116 221
⑫ N.º solicitud: 9601109
⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 17.05.96
⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑮ Int. Cl.⁶: A01N 43/40

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	URDIALES, J.L. et al., "Chlorpheniramine inhibits the ornithine decarboxylase induction of Ehrlich carcinoma growing in vivo", 1992, FEBS Lett., 305 (3), páginas 260-264 * Todo el documento *	1-3
A	MEDINA, M.A. et al., "Chlorpheniramine inhibits the synthesis of ornithine decarboxylase and the proliferation of human breast cancer cell lines", 1995, Breast Cancer Res. and Treat., 35, páginas 187-194 * Todo el documento *	1-3

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones n.º:

Fecha de realización del informe

01.06.98

Examinador

A. Maquedano Herrero

Página

1/1