

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 724 215**

21 Número de solicitud: 201800049

51 Int. Cl.:

A61K 35/51 (2015.01)

C12N 5/074 (2010.01)

A61P 31/00 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

01.03.2018

43 Fecha de publicación de la solicitud:

09.09.2019

71 Solicitantes:

UNIVERSIDAD DE ALCALÁ (100.0%)
Plaza de San Diego, s/n
28801 Alcalá de Henares (Madrid) ES

72 Inventor/es:

BODEGA MAGRO, Guillermo;
RAMIREZ CHAMOND, Manuel Rafael;
COPA PATIÑO, José Luis;
SOLIVERI DE CARRANZA, Juan;
ALIQUE AGUILAR, Matilde;
MORAN MORALES, Miriam y
BOHORQUEZ MAGRO, M. Lourdes

54 Título: **Microvesículas endoteliales con efecto microbicida**

57 Resumen:

Microvesículas endoteliales con efecto microbicida.
La presente invención se refiere al uso de las microvesículas derivadas de células endoteliales (MVe) como medicamento, más específicamente como antibiótico. Las MVe de la invención son útiles frente a bacterias Gram+ y Gram-, además de frente a bacterias multirresistentes a antibióticos comunes. Por lo tanto, la presente invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende las MVe de la invención para su uso en el tratamiento de infecciones bacterianas que se seleccionan preferentemente de entre cualquiera de las siguientes sepsis, gangrena, salmonelosis, botulismo, cólera, impétigo, meningitis, neumonía, tétanos, tuberculosis, gonorrea, sífilis, nefritis y cistitis.

DESCRIPCIÓN

Microvesículas endoteliales con efecto microbicida.

5 Sector de la técnica

La presente invención se refiere a microvesículas derivadas de células endoteliales (MVe) con efecto microbicida y se encuadra dentro del sector farmacéutico, en concreto en el diseño de nuevos antibióticos.

10 Antecedentes de la invención

La sepsis es una de las principales causas de mortalidad en todo el mundo [1]. *The American College of Chest Physicians* y *The Society of Critical Care Medicine* la definen como síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS) ante una infección [2]. Este síndrome se caracteriza por una respuesta sistémica compleja que cursa con un exceso de activación celular y una inflamación incontrolada que lesiona los tejidos y órganos propios en respuesta a una infección principalmente de tipo bacteriano. Su forma más severa puede conducir a choque séptico y disfunción multiorgánica que causa la muerte del enfermo [3].

A nivel mundial, se registran anualmente de 20 a 30 millones de casos de sepsis, y es la causa del fallecimiento de 50 personas cada hora. La sepsis afecta anualmente a unas 50.000 personas en España, de las cuales 17.000 mueren. En los últimos diez años los casos de sepsis se han duplicado y los estudios consideran que la tendencia seguirá al alza [4].

Algunos de los factores objetivos que explican esta tendencia son el creciente uso de catéteres y otros equipamientos invasivos, la quimioterapia, la inmunosupresión en pacientes con trasplantes de órganos o enfermedades inflamatorias, y también el incremento de la población mayor de 65 años, muchos de los cuales sufren enfermedades crónicas, y, en general, son un grupo con mayor riesgo de infección [5].

A pesar de varias décadas de estudio de esta patología, el tratamiento estándar de la sepsis bacteriana sigue siendo la administración de líquidos y vasopresores para restaurar la presión arterial y el flujo sanguíneo de órganos, la oxigenación y la administración de antibióticos. Esto tiene un gran coste sanitario, ya que el paciente con sepsis permanece hospitalizado en la UCI. En España el coste económico medio aproximado del tratamiento y hospitalización en la UCI de un paciente con sepsis es de unos 17.000 €, aunque la cifra es muy inferior al coste de otros países próximos como Alemania donde asciende a 25.000 - 50.000 € [4].

El uso cada vez más frecuente de antibióticos de amplio espectro ha dado como resultado un aumento de la resistencia bacteriana a los antimicrobianos lo que supone una gran problemática a nivel mundial [6] y en especial para estos enfermos, ya que no solo se prolonga la duración de su estancia en la UCI, sino que el efecto sobre la mortalidad es incierto siendo el tipo de organismo que causa la sepsis determinante del resultado.

El aumento de bacterias resistentes también ha contribuido a que haya aumentado la frecuencia de casos de sepsis por bacterias Gram positivas (Gram+), ahora casi tan comunes como las infecciones por Gram negativas (Gram-). Los organismos predominantes causantes de sepsis son *Staphylococcus aureus* (20,5%), *Pseudomonas* (19,9%), *Enterobacteriaceae* (principalmente *E. coli*, 16,0%), y hongos (19%) [7]. Además estos organismos son los que encabezan la lista de la OMS de patógenos para los que se necesitan nuevos antibióticos con prioridad elevada y crítica [8].

Recientes estudios sobre sepsis e infección *in vivo* han observado un gran aumento de MV en sangre [9-12], Mostefai et al. (2008) [10] observaron que el número de MV circulantes aumentó en pacientes sépticos en comparación con pacientes no sépticos, y concretamente observaron un gran incremento de MVe en estos pacientes. También se ha observado que los pacientes con bacteriemia tenían niveles más elevados de MV circulantes que los sujetos sanos. Herrmann et al. (2015) [13] investigaron el potencial diagnóstico de las MV derivadas de células polimorfonucleares (PMN) para diferenciar la sepsis del síndrome de respuesta inflamatoria sistémica. Los resultados obtenidos demostraban que las MV sufren cambios fenotípicos en función de estímulos específicos, como la infección, que las conduce a un aumento de su capacidad de agregación bacteriana. Hasta ahora, es por tanto conocido el incremento de MVs en sangre cuando existe una infección bacteriana, así como la utilidad de dichas MVs para la diferenciación entre distintas patologías de origen bacteriano.

Teniendo en cuenta lo anterior, existe en el estado de la técnica la necesidad de desarrollar fármacos, preferiblemente antibióticos, alternativos a los conocidos en el estado de la técnica, para el tratamiento de infecciones bacterianas en general, donde dichos fármacos sean de amplio espectro, siendo eficaces también frente a bacterias multirresistentes.

Descripción de la invención

La presente invención se refiere a MVe que poseen una potente capacidad antimicrobiana tanto sobre los principales patógenos implicados en sepsis como en bacterias multirresistentes a los antibióticos convencionales. Estas MV causan la destrucción de bacterias pero no afectan a las células eucariotas. Por lo que la invención proporciona una aplicación de estas microvesículas para la obtención de un nuevo medicamento, específicamente un antibiótico.

Las MVe juegan un importante papel en la defensa contra patógenos siendo, por tanto, beneficiosas al formar parte de la respuesta natural a la infección. Esta nueva función de las MV es de gran utilidad diagnóstica y también ofrece una amplia variedad de dianas terapéuticas, así como una alternativa a los antibióticos para el tratamiento de patologías infecciosas como la sepsis. Dicha acción bactericida de las MVe de la invención se lleva a cabo incluso a concentraciones fisiológicas de las mismas, y con una elevada concentración de microorganismos, específicamente bacterias, siendo esta acción más patente cuanto mayor concentración de MVe se utilice.

Además, la actividad antimicrobiana asociada a las MVe de la invención no es dependiente de la vía del complemento y se muestra muy estable, pues es resistente a la congelación y a tratamientos térmicos de hasta 85°C. El tratamiento con las MVe de la invención no induce cambios fisiopatológicos en las células eucariotas.

Las MVe tienen actividad bactericida tanto frente a bacterias Gram- como frente a bacterias Gram+. Estos resultados sugieren un papel relevante de las MVe en las patologías infecciosas como la sepsis, siendo prometedoras dianas terapéuticas para su tratamiento.

Las MV son estructuras derivadas de la membrana celular, de 0.2 a 1.5 μm de diámetro. Las MV plasmáticas se generan a partir de una gran variedad de tipos celulares: células endoteliales, leucocitos y plaquetas. Debido a su composición de proteínas, lípidos y otros componentes citoplásmicos, las MV pueden transmitir un gran número de mensajes entre células y contribuir a una gran variedad de procesos fisiológicos y patológicos [14], incluso se ha demostrado su función como eliminadores de especies reactivas de oxígeno [15].

Este contenido funcional varía según la célula de origen de la MV y depende también de las condiciones fisiológicas y patológicas existentes en el momento de su formación y secreción [16], lo que hace que la definición de su función sea un desafío, ya que las diferentes

poblaciones de MV pueden tener efectos sinérgicos o incluso efectos opuestos sobre las células receptoras.

5 Así, un primer aspecto de la presente invención se refiere al uso de MV derivadas de células endoteliales para la elaboración de un medicamento. Alternativamente, la presente invención se refiere también a MV derivadas de células endoteliales para su uso como medicamento.

10 El término medicamento, tal y como se usa en esta memoria, hace referencia a cualquier sustancia usada para prevención, diagnóstico, alivio, tratamiento o curación de enfermedades en el hombre y los animales. En el contexto de la presente invención, la enfermedad es una enfermedad que cursa con infección bacteriana.

15 En una realización preferida del uso de las MV de la presente invención, éstas se caracterizan porque el medicamento es preferiblemente un antibiótico.

20 En otra realización preferida del uso de las MV de la invención, dicho antibiótico es efectivo frente a bacterias Gram+ y Gram-. En otra realización más preferida aún, las bacterias Gram+ se seleccionan de la lista que consiste en: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus resistente a meticilina*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium tetani*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Bacillus anthracis*, *Actinomyces israelii*; o combinaciones de las mismas, y las bacterias Gram- se seleccionan de la lista que consiste en: *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Haemophilus influenzae*, *Bordetella pertussis*, *Helicobacter pylori*, *Legionella pneumophila*, *Acinetobacter baumannii*, *Neisseria meningitidis* o combinaciones de las mismas.

En otra realización preferida del uso de las MV de la invención, éstas se caracterizan por que el medicamento, preferiblemente el antibiótico, comprende la fracción citosólica de las mismas.

30 Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de las MV derivadas de células endoteliales de la invención para la elaboración de un medicamento, preferiblemente un antibiótico, para el tratamiento de patologías que cursan con infección bacteriana. Alternativamente, la presente invención se refiere a las MV derivadas de células endoteliales de la invención para su uso en el tratamiento de patologías que cursan con infección bacteriana.

35 En una realización preferida, el uso de las MV de la invención para el tratamiento de patologías que cursan con infección bacteriana se caracteriza por que dicho medicamento, preferiblemente un antibiótico, comprende la fracción citosólica de las mismas.

40 El término "tratamiento" tal como se entiende en la presente invención se refiere a combatir los efectos causados como consecuencia de una enfermedad o condición patológica de interés en un sujeto (preferiblemente mamífero, y más preferiblemente un humano) que incluye:

45 (i) inhibir la enfermedad o condición patológica, es decir, detener su desarrollo;

(ii) aliviar la enfermedad o la condición patológica, es decir, causar la regresión de la enfermedad o la condición patológica o su sintomatología;

50 (iii) estabilizar la enfermedad o la condición patológica.

A los efectos de la presente invención el término patologías que cursan con infección bacteriana se refieren a aquellas enfermedades infecciosas causadas por bacterias. En otra realización preferida, las patologías que cursan con infección bacteriana se seleccionan de la

lista que consiste en: sepsis, gangrena, salmonelosis, botulismo, cólera, impétigo, meningitis, neumonía, tétanos, tuberculosis, gonorrea, sífilis, nefritis y cistitis.

5 En otra realización preferida, la infección bacteriana es producida por una bacteria que se selecciona de la lista que consiste en bacterias Gram+ y Gram-. En otras realizaciones más preferidas, las bacterias Gram+ y Gram- se seleccionan de la lista que consiste en cualquiera de las mencionadas anteriormente a lo largo de la presente invención, o combinaciones de las mismas.

10 Otro aspecto de la presente invención se refiere a una composición, preferiblemente una composición farmacéutica que comprende las MV derivadas de células endoteliales de la invención, y al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable.

15 El término "vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a un vehículo que debe estar aprobado por una agencia reguladora del gobierno federal o un gobierno estatal o enumerado en la Farmacopea Estadounidense o la Farmacopea Europea, u otra farmacopea reconocida generalmente para su uso en animales, y más concretamente en humanos.

20 El término "vehículo" se refiere a un diluyente, coadyuvante, excipiente o portador con el que se deben administrar las MVe de la invención o la composición que las comprende; obviamente, dicho vehículo debe ser compatible con las mismas.

25 La composición farmacéutica de la invención, si se desea, puede contener también, cuando sea necesario, aditivos para aumentar, controlar o dirigir de otro modo el efecto terapéutico deseado de las MVe de la invención, las cuales comprenden dicha composición farmacéutica, y/o sustancias auxiliares o sustancias farmacéuticamente aceptables, tales como agentes tamponantes, tensioactivos, codisolventes, conservantes, etc. Dichas sustancias farmacéuticamente aceptables que pueden usarse en la composición farmacéutica de la invención son conocidas, en general, los técnicos en la materia y se usan normalmente en la
30 elaboración de composiciones farmacéuticas. Ejemplos de vehículos farmacéuticos adecuados se describen, por ejemplo, en "*Remington's Pharmaceutical Sciences*", de E.W. Martin. Puede encontrarse información adicional sobre dichos vehículos en cualquier manual de tecnología farmacéutica (Farmacia Galénica).

35 En otra realización preferida, la composición de la invención puede comprender además al menos un principio activo.

40 Tal y como se emplea aquí, el término "principio activo", "sustancia activa", "sustancia farmacéuticamente activa", "ingrediente activo" o "ingrediente farmacéuticamente activo" significa cualquier componente que potencialmente proporcione una actividad farmacológica u otro efecto diferente en el diagnóstico, cura, mitigación, tratamiento, o prevención de una enfermedad, o que afecta a la estructura o función del cuerpo del hombre u otros animales. El término incluye aquellos componentes que promueven un cambio químico en la elaboración del fármaco y están presentes en el mismo de una forma modificada prevista que proporciona la
45 actividad específica o el efecto.

A efectos de la presente invención, el principio activo se selecciona de la lista que consiste en: antibióticos, antiinflamatorios, antipiréticos y analgésicos, más específicamente los principios activos se seleccionan de la lista que consiste en ácido acetilsalicílico, diclofenaco,
50 indometacina, piroxicam, ibuprofeno, naproxeno, dihidrocodeína, dextropropoxifeno, fentanilo, tramadol, metamizol, paracetamol y/o cualquier combinación de los anteriores.

La composición farmacéutica de la invención contendrá una cantidad terapéuticamente efectiva o eficaz de las MV de la invención, más preferiblemente de la fracción citosólica de dichas

- MVe, para proporcionar el efecto terapéutico deseado. Tal como se usa en la presente descripción, el término "cantidad terapéuticamente efectiva" o "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a la cantidad de MVe o de la fracción citosólica de las mismas contenida en la composición farmacéutica que es capaz de producir el efecto terapéutico deseado y, en general, se determinará, entre otros factores, por el efecto terapéutico deseado que se persigue. En general, la cantidad terapéuticamente efectiva de MVe o de la fracción citosólica de las mismas que debe administrarse dependerá, entre otros factores, de las propias características del sujeto, la gravedad de la enfermedad, la forma de administración, etc. Por este motivo, las dosis mencionadas en esta invención deben tenerse en cuenta sólo como guía para la persona conocedora de la técnica, que debe ajustar esta dosis dependiendo de los factores anteriormente descritos. La composición farmacéutica de la invención se formulará de acuerdo con la forma de administración elegida. La composición farmacéutica de la invención puede prepararse en un modo de dosificación líquido o gel, por ejemplo, en forma de suspensión, para ser inyectada o perfundida al individuo.
- La administración de la composición farmacéutica de la invención al individuo se llevará a cabo por los medios convencionales. Por ejemplo, dicha composición farmacéutica se puede administrar a dicho individuo por vía intravenosa utilizando los dispositivos adecuados, tales como jeringas, catéteres (un catéter intravenoso periférico estándar, un catéter venoso central o un catéter arterial pulmonar, etc.), trocates, cánulas, etc. En todos los casos, la composición farmacéutica de la invención se administrará utilizando los equipos, aparatos y dispositivos adecuados a la administración de este tipo de composiciones y conocidos por el experto en la técnica.
- Como entiende el experto en la materia, en ocasiones la administración directa de la composición farmacéutica de la invención al sitio que se pretende beneficiar puede ser ventajosa. De este modo, la administración directa de la composición farmacéutica de la invención al órgano o tejido deseado se puede lograr por administración directa (por inyección, etc.) en la superficie externa del órgano o tejido afectado por medio de inserción de un dispositivo adecuado, e.g., una cánula apropiada, por perfusión arterial o venosa (incluyendo mecanismos de flujo retrógrado) o por otros medios mencionados en esta descripción o conocidos en la técnica.
- La composición farmacéutica de la invención, si se desea, se puede almacenar hasta el momento de su aplicación mediante los procedimientos convencionales conocidos por los técnicos en la materia. Esta composición farmacéutica también se puede almacenar junto a medicamentos adicionales, útiles en el tratamiento en enfermedades, en una forma activa que comprende una terapia combinada.
- Otro aspecto de la presente invención se refiere a un método de tratamiento de patologías que cursan con infección bacteriana que comprende la administración a un sujeto aquejado de dicha patología, o en necesidad de tratamiento, de una cantidad terapéuticamente eficaz de las MVe de la invención o de la composición de la invención.
- A efectos de la presente invención el término un "sujeto en necesidad de tratamiento" incluye aquellos casos que ya tienen el trastorno así como aquellos en los que el trastorno se va a prevenir. La administración puede llevarse a cabo "en combinación con" uno o más agentes terapéuticos incluye la administración simultánea (concurrente) y consecutiva en cualquier orden.
- En una realización preferida del método de tratamiento de la invención, este se caracteriza por que las patologías que cursan con infección bacteriana se seleccionan de la lista que consiste en: sepsis, gangrena, salmonelosis, botulismo, cólera, impétigo, meningitis, neumonía, tétanos, tuberculosis, gonorrea, sífilis, nefritis y cistitis.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

Breve descripción de los dibujos

- 10 **Fig. 1.** Valoración antimicrobiana de las MVe a una concentración de 100.000 MV/mL sobre *S. aureus* a concentraciones de inóculo de 2×10^4 UFC/mL ($p < 0,001$) (A), y 2×10^7 UFC/mL ($p = 0,008$) (D). Media $\pm$ SD, $n = 3$. $^{**}p < 0.01$, $^{***}p < 0.001$. Solo se ha incluido el dato de la significación estadística correspondiente a la última hora del ensayo.
- 15 **Fig. 2.** Valoración antimicrobiana de las MVe a una concentración de 100.000 MV/mL sobre *P. aeruginosa* a concentraciones de inóculo de 2×10^2 y 2×10^3 UFC/mL ($p = 0,0075$) (A) y 2×10^2 UFC/mL ($p = 0,0064$) (B). Media $\pm$ SD, $n = 3$. $^{**}p < 0.01$. Solo se ha incluido el dato de la significación estadística correspondiente a la última hora del ensayo.
- 20 **Fig. 3.** Valoración antimicrobiana de las MVe a concentración de 500.000 MV/mL ($p = 0,0048$) (A) y 1.000.000 MV/mL ($p < 0,001$) (B) sobre *P. aeruginosa* a concentración de inóculo de 2×10^2 UFC/mL. Media $\pm$ SD, $n = 3$. $^{**}p < 0.01$, $^{***}p < 0.001$. Solo se ha incluido el dato de la significación estadística correspondiente a la última hora del ensayo.
- 25 **Fig. 4.** Valoración antimicrobiana de las MVe a una concentración de 100.000 MV/mL sobre SARM a concentraciones de inóculo de 2×10^5 UFC/mL ($p < 0,001$) (A) y 2×10^6 UFC/MI ($p = 0,0018$) (B). Media $\pm$ SD, $n = 3$. $^{*}p < 0.05$; $^{**}p < 0.01$, $^{***}p < 0.001$. Solo se ha incluido el dato de la significación estadística correspondiente a la última hora del ensayo.
- 30 **Fig. 5.** Valoración antimicrobiana de las MVe a concentración de 500.000 MV/mL sobre SARM a concentraciones de inóculo de 2×10^6 UFC/mL ($p < 0,0001$) (A) y 2×10^7 UFC/mL ($p = 0,0001$) (B). Media $\pm$ SD, $n = 3$. $^{****}p < 0.0001$. Solo se ha incluido el dato de la significación estadística correspondiente a la última hora del ensayo.
- 35 **Fig. 6.** Valoración antimicrobiana de las fracciones citosólica y de membrana de las MVe obtenidas a partir de 500.000 MV/mL sobre *S. aureus* (2×10^6 UFC/mL) ($p < 0,0001$). Media $\pm$ SD, $n = 3$. $^{****}p < 0.0001$. Solo se ha incluido el dato de la significación estadística correspondiente a la última hora del ensayo.
- 40 **Fig. 7.** Valoración de la capacidad antimicrobiana de las MVe (A) y su fracción citosólica (B) tras su descomplementación (indicado como C) ($p < 0,0001$). 500.000 MVe/mL. Media $\pm$ SD, $n = 3$. $^{****}p < 0.0001$. Solo se ha incluido el dato de la significación estadística correspondiente a la última hora del ensayo.
- 45 **Fig. 8.** Interacción de las MVe con *P. aeruginosa* a los 30 min (A). Interacción de las MVe con *P. aeruginosa* a las 4 h (B). Interacción de las MVe con *S. aureus* a las 4 h (C). Interacción de las MVe con *S. aureus* a las 20 h (D). Imágenes obtenidas con contraste por interferencia diferencial (DIC) (1). Imágenes obtenidas al solapar las imágenes de fluorescencia (gris claro en la figura) y la obtenida con DIC (2).

Ejemplos

Los siguientes ejemplos sirven para ilustrar la naturaleza de la presente invención. Estos ejemplos se incluyen solamente con fines ilustrativos y no han de ser interpretados como

limitaciones a la invención que aquí se reivindica. Por tanto, los ejemplos descritos más adelante ilustran la invención sin limitar el campo de aplicación de la misma.

Materiales y métodos

5

Cultivo, aislamiento y cuantificación de MVe

Las células endoteliales de cordón umbilical (HUVEC; número de catálogo ATCC. PCS-100-010) se cultivaron en medio de crecimiento endotelial (EGM) (Lonza, Basilea, Suiza) suplementado con un 10% de suero fetal bovino (FBS, *Fetal Bovine Serum*) (Sigma, St. Louis, EUA) descomplementado. Los cultivos se mantuvieron a 37°C en una atmósfera con un 5% de CO₂ y un 95% de humedad.

Las MVe se obtuvieron a partir de los sobrenadantes de dichos cultivos celulares. Se utilizaron los sobrenadantes del pase 4 al 7 para obtener un *pool* de MVe jóvenes. El aislamiento se realizó centrifugando los sobrenadantes a 3100 rpm durante 15 min a temperatura ambiente, seguido de otra centrifugación a 14000 rpm durante 15 min a 4°C. Después las MV se resuspendieron en PBS (Sigma, St. Louis, EUA) y, tras descartar la contaminación de los diferentes pases mediante la realización de una prueba de contaminación, incubando una muestra de cada pase en caldo Luria Bertani (LB) (Conda, Torrejón de Ardoz, España) a 37°C durante 72 h, se unificaron los pases libres de contaminación y se procedió a la cuantificación de las MV.

Las MVe se cuantificaron mediante citometría de flujo con el citómetro BD FACSCalibur™. Primero se seleccionó la población de MV en función del tamaño (FSC/forward scatter) y complejidad (SSC/side scatter) utilizando un kit destinado a tal efecto (Flow Cytometry Sub-Micron Size Reference Kit, Green Fluorescent. Life Technologies, Paisley, RU) que contiene esferas de diferentes tamaños. Utilizando como referencia las esferas de 0,5 µm, 1 µm y 2 µm se determinó en el *dot-plot* la zona en la que estaban las MV, las cuales tienen un tamaño de 0.2 a 2 µm de diámetro. Los eventos menores de 0,5 µm fueron excluidos para distinguir correctamente los verdaderos eventos del ruido del citómetro, así como los eventos mayores de 2 µm para evitar la posible confusión con cuerpos apoptóticos.

Una vez localizadas por su tamaño, se seleccionaron aquellos eventos positivos para Anexina V (Alexa Fluor 647, Biolegend. San Diego, EUA) y para CD31 (CD31 L133.1 PE, Becton Dickinson. Franklin Lakes, EUA), ya que al ser MV de origen endotelial son positivas para dicho marcador.

El número absoluto de MV (eventos)/ µL fue determinado usando una concentración conocida de *Flow Count Calibrator beads* de 10 µm (Beckman Coulter. Brea, EUA) y siguiendo las recomendaciones del fabricante de utilizar el software CXP (eventos totales x esferas estándar/L)/(esferas estándar contadas).

Fraccionamiento de las MVe

45

Se fraccionó una muestra de MVe mediante sonicación y luego se centrifugó a 50000 rpm durante 1 h y a 4°C. Así se consiguió separar el contenido citosólico y la membrana de las MVe para valorar, de forma independiente, su capacidad antimicrobiana en los bioensayos.

Cultivos bacterianos y bioensayos

50

La elección del medio de cultivo adecuado para los bioensayos fue un proceso complejo, ya que las bacterias necesitaban un medio apropiado para su crecimiento óptimo y las MVe también necesitaban un medio apropiado dada su procedencia de células eucariotas. Por ello,

se probaron las diferentes combinaciones de los medios para establecer la proporción más idónea de los mismos para llevar a cabo los bioensayos. Además la combinación elegida se suplementó con suero fetal bovino (FBS, *Fetal Bovine Serum*) ya que se observó que de lo contrario, se reducía la actividad de las MVe.

Los medios de cultivo utilizados para el bioensayo fueron caldo Mueller-Hinton (MFI) 1X (Scharlau Microbiology, Barcelona, España) y Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Sigma, St. Louis, EUA). Se utilizaron solos y también mezclados en distintas proporciones (50:50, 25:75 y 75:25 V/V). Además, en todos los casos el medio de cultivo fue suplementado con un 10% de FBS. Finalmente, el medio de elección para los bioensayos consistió en un 75% de caldo MFI y un 25% de DMEM, suplementado con un 10% de FBS. Una vez formulado el medio se realizaron experimentos para conocer la concentración mínima de inóculo a utilizar de cada microorganismo (Tabla 1).

<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	SARM
2 x 10 ⁴ UFC/mL	2 x 10 ² UFC/mL	2 x 10 ⁵ UFC/mL

Tabla 1.- Concentración mínima de inóculo para el crecimiento óptimo de los diferentes microorganismos en el medio de elección para los bioensayos (MH:DMEM 75:25 V/V, + 10% FBS).

Se han utilizado tres microorganismos diferentes: *Staphylococcus aureus* (CECT 108, Gram positivo), *Pseudomonas aeruginosa* (CECT 240, Gram negativo), ambos procedentes de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), y *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina y otros antibióticos (SARM 10225758) cedido por el Hospital Príncipe de Asturias (Alcalá de Henares, España). La generación utilizada de los diferentes microorganismos fue siempre inferior a la G-5. Para la realización de los bioensayos de valoración antimicrobiana de las MVe, el cultivo y la preparación del inóculo de los microorganismos citados anteriormente se preparó de acuerdo a los métodos estándares internacionales ISO 20776-1 [18].

Los microorganismos se cultivaron en placas con un medio nutritivo no selectivo, agar de recuento en placa (PCA, *Plate Count Agar*) (Scharlau Microbiology. Barcelona, España), a 37°C durante 24 h. Después se resuspendieron varias colonias en caldo Mueller-Hinton 1X (Scharlau Microbiology. Barcelona, España) y se incubó a 37°C en agitación a 110 rpm durante 24 h. Partiendo del caldo anterior, se preparó una dilución del mismo y se midió la absorbancia con el espectrofotómetro a 625 nm hasta conseguir una dilución en el rango de 0.08-0.11 (0.05 McFarland), lo que corresponde a una concentración de 1 x 10⁸ UFC/mL. A partir de esta dilución, se pudo ajustar la concentración de microorganismo requerida según el tipo de microorganismo y el método utilizado para la administración del inóculo. En este estudio, se realizaron varias diluciones para obtener los diferentes inóculos con concentraciones desde 2 x 10² UFC/mL hasta 2 x 10⁷ UFC/mL.

Los bioensayos se realizaron en placas de 96 pocillos y se utilizó la placa lectora Ultra Microplate Reader ELx808 (BioTek. Winooski, EUA) siguiendo un protocolo de lectura de la absorbancia a 630 nm cada hora durante un total de 20 h, incubación a 37 °C y agitación.

MVe: efecto bactericida o bacteriostático

Después de los bioensayos, también se analizó el efecto que habían tenido las MVe sobre las bacterias para ver si tenían un efecto bactericida o bacteriostático. Para ello, se tomaron muestras de algunos pocillos tras los bioensayos, se pusieron en placas de PCA y se

incubaron durante 48 h a 37°C. Los resultados mostraron que las MVe, y más concretamente la fracción citosólica ejercen un efecto bactericida ya que no hay crecimiento en placa.

Microscopía confocal

Las MVe se tiñeron con CellTracker CM-Dil (Life Technologies, Paisley, RU) para visualizar su interacción con *S. aureus* y *P. aeruginosa*. Se observó su interacción pasados 30 min, a las 4 h y a las 20 h. La fluorescencia se detectó usando un microscopio confocal Leica TSC SP5 (Leica Microsystems. Wetzlar, Alemania).

Análisis estadístico

La concentración de MVe se obtuvo a partir del análisis de los datos de tres medidas independientes de la muestra con el programa Cyflogic (versión 1.2.1) y el software CXP citado anteriormente. Los datos de los bioensayos se analizaron con el software de análisis Gen5 (versión 2.00) y utilizando la hoja de cálculo Microsoft Excel. Cada condición se realizó por triplicado ($n=3$) y en los gráficos se representa cada punto como media $\pm$ SD. El análisis estadístico se realizó con el programa GraphPad Prism (versión 5.00); las diferencias entre grupos se analizaron utilizando *Student's t test* y *One-way ANOVA*. Se ha considerado significación estadística un $p<0,05$.

Ejemplo 1. Análisis del efecto bactericida de las MVe de la invención sobre *S. aureus*.

El estudio de la valoración antimicrobiana de las MVe se realizó inicialmente sobre *S. aureus*. El primer bioensayo se realizó utilizando un inóculo bacteriano a una concentración de 2×10^4 UFC/mL y una concentración de MVe de 10000 MV/mL, que corresponde a una concentración fisiológica. Los controles crecieron normalmente; sin embargo, no hubo crecimiento bacteriano en ninguno de los casos en los que se añadieron MVe. Para corroborar dichos resultados, se realizó otro bioensayo utilizando la misma concentración de MVe e inóculos bacterianos de diferentes concentraciones, desde 2×10^4 UFC/mL hasta 2×10^7 UFC/mL. Como se observa en la Figura 1, no hubo crecimiento bacteriano cuando se añadieron MVe independientemente de la concentración del inóculo ($p<0,001$), excepto en los que se utilizó un inóculo de 2×10^7 UFC/mL. En este caso, se detectó un aumento del número de microorganismos, por multiplicación de los mismos, 12 h más tarde de la entrada del control en fase exponencial de crecimiento, y, al final del bioensayo ($t=20$ h) se observó que las MVe inhibieron un 64% ($p=0,008$) el crecimiento bacteriano a dicha concentración de inóculo.

Ejemplo 2. Análisis del efecto bactericida de las MVe de la invención sobre *P. aeruginosa*.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos sobre bacterias Gram+, se estudió si las MVe tenían el mismo efecto sobre las bacterias Gram-. Para ello, se utilizaron inóculos de *P. aeruginosa* a una concentración de 2×10^2 UFC/mL y de 2×10^3 UFC/mL, y una concentración fisiológica de MVe (10000 MV/mL). Cuando se utilizó un inóculo de 2×10^3 UFC/mL y MVe, el microorganismo entró en fase exponencial a las 10 h, al igual que el control, pero a $t=20$ h las MVe inhibieron el crecimiento bacteriano un 14% ($p=0,0075$) (Figura 2A). Cuando se utilizó el inóculo de 1×10^2 UFC/mL y MVe, el microorganismo entró en fase exponencial de crecimiento a las 11 h, al igual que el control, pero a $t=20$ h las MVe inhibieron el crecimiento bacteriano un 13% ($p=0,0064$) (Figura 2B). Se realizó otro bioensayo utilizando la concentración más baja de inóculo y aumentando la concentración de MVe 5 (5X) y 10 (10X) veces, para simular los niveles de MV que se encuentran en estados patológicos como la sepsis. Cuando se aumentó la concentración de MVe 5 veces, se detectó un aumento del número de microorganismos, por multiplicación de los mismos 2 h más tarde de la entrada del control en fase exponencial de crecimiento, y, a $t=20$ h las MVe inhibieron un 71% ($p=0,0048$) el crecimiento bacteriano

(Figura 3A). Sin embargo, cuando se aumentó la concentración de MVe 10 veces, se produjo una inhibición total del crecimiento bacteriano ($p<0,001$) (Figura 3B).

Ejemplo 3. Análisis del efecto bactericida de las MVe de la invención sobre *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM).

Posteriormente, se realizó un bioensayo utilizando SARM, que es un microorganismo de gran importancia en hospitales por su resistencia a varios antibióticos y frente al cual se necesitan nuevas terapias. Se utilizaron inóculos de SARM de 2×10^5 UFC/mL y de 2×10^6 UFC/mL y una concentración de MVe de 10000 MV/mL. El crecimiento bacteriano resultó totalmente inhibido ($p<0,001$) cuando se utilizó el inóculo de 2×10^5 UFC/mL (Figura 4A). Con el inóculo de 2×10^6 UFC/mL no hubo inhibición total, pero el microorganismo entró en fase exponencial de crecimiento 1 h más tarde que el control, y a $t=20$ h las MVe inhibieron un 13% ($p=0,018$) el crecimiento bacteriano (Figura 4B). Se realizó otro bioensayo aumentando la concentración de MVe 5 veces y utilizando inóculos de SARM de 2×10^6 UFC/mL y de 2×10^7 UFC/mL. Con dicha concentración de MVe hubo una inhibición total del crecimiento bacteriano en ambos casos ($p<0,001$ y $p=0,0001$) (Figura 5).

Ejemplo 4. Análisis del efecto bactericida de la fracción citosólica y la fracción de membrana aisladas de las MVe de la invención sobre *S. aureus*.

Con el fin de dilucidar en qué fracción de la MVe reside el mecanismo antimicrobiano, se realizó un bioensayo añadiendo, de forma independiente, cada una de las fracciones (citosólica y de membrana), separadas previamente por ultracentrifugación. Se utilizó un inóculo de 2×10^6 UFC/mL de *S. aureus* y una concentración de membrana y citosol equivalente a 50000 MV/mL. También se realizó un control con 50000 MV/mL para ver si el efecto de las fracciones individuales era igual que el de las MV enteras. La fracción citosólica produjo una inhibición total del crecimiento bacteriano, al igual que el control con 50000 MV/mL ($p<0,0001$), mientras que la fracción de membrana no inhibió el crecimiento (Figura 6), aunque lo retrasó.

Ejemplo 5. Análisis de actividad bactericida de las MVe de la invención vía inhibición del complemento.

Las MVe contienen y/o llevan asociadas proteínas del sistema del complemento (C1QBP, C3, C4-A, C5, C6 C9) mecanismo de defensa cuya misión principal es eliminar patógenos de la circulación. De hecho, presentan gran cantidad de C3 que es clave en la activación de las distintas vías del sistema del complemento [17], lo que sugiere la importancia de éstas MVe en la defensa contra patógenos.

Con el fin de elucidar si los efectos microbicidas observados en los ejemplos anteriores eran debidos a la carga de proteínas del sistema del complemento que contienen éstas MVe se realizó un bioensayo descomplementando a 56°C durante 30 min el FBS que se le suplementaba al medio y las propias MVe. Se utilizó una concentración de 10000 MV/mL y un inóculo de 2×10^6 UFC/mL de *S. aureus*. Se probaron las diferentes combinaciones posibles: medio + MVe descomplementadas, medio con FBS descomplementado + MVe, y medio con FBS descomplementado + MVe descomplementadas, con sus respectivos controles. En todos los casos en los que había MVe, tanto normales como descomplementadas, hubo una inhibición total del crecimiento bacteriano, mientras que en los controles sin MVe hubo un crecimiento adecuado ($p<0,0001$) (Figura 7 A).

Dado que la capacidad antimicrobiana de las MVe reside en el citosol, se realizó otro bioensayo descomplementando a 56°C durante 30 min, el FBS y la fracción citosólica. Se utilizó un inóculo de 2×10^6 UFC/mL de *S. aureus* y una concentración de citosol equivalente a 10000 MV/mL, y se probaron las mismas combinaciones que en el bioensayo anterior. En

todos los casos en los que había citosol, hubo una inhibición total del crecimiento bacteriano ($p < 0,0001$), igual al que se observó en los bioensayos con las MVe sin fraccionar (Figura 7B).

- 5 Además de calentar las MVe a 56 °C para descomplementar, se realizó un tratamiento a 85 °C, tanto a las MVe como a la fracción citosólica, con el fin de testar la su resistencia al calor. Este tratamiento no afectó a la actividad antimicrobiana de los componentes testados.

Ejemplo 6. Análisis de la interacción de las MVe de la invención con *P. aeruginosa* y *S. aureus*.

- 10 Finalmente, se visualizó por microscopía confocal la interacción de las MVe con *P. aeruginosa* y *S. aureus* a diferentes tiempos (30 min, 4 h y 20 h). Se utilizó una elevada concentración tanto de bacterias como de MV para poder visualizarlas fácilmente. Las MVe interaccionan rápidamente con *P. aeruginosa* (Figura 8A), y a las 4h se pueden ver grandes acúmulos de MV y bacterias, estando estas últimas muertas ya que han perdido su forma característica y se ven rotas (Figura 8B). A las 20 h *P. aeruginosa* había formado un *biofilm* que estaba completamente lleno de MVe. En cuanto a *S. aureus*, las MVe tardan un poco más tiempo en interaccionar con el microorganismo, pero a las 4 h ya se observan acúmulos de MV y *S. aureus* (Figura 8C). A las 20 h se observa que esos acúmulos son de mayor tamaño que los observados a las 4h (Figura 8D). En cada una de las figuras marcadas con 1 se muestra la imagen obtenida con DIC, en las marcadas con 2 se muestra la imagen de fluorescencia (CellTracker) y la obtenida con DIC solapadas.
- 15
- 20

REFERENCIAS

1. Ramachandran, G. 2014. Gram positive and gram negative bacterial toxins in sepsis. *Virulence*, 5(1):213-218.
2. Hodgkin, K.E. and M. Moss. 2008. The epidemiology of sepsis. *Current Pharmaceutical Design*, 14(19): 1833-1839.
3. Meziani, F., Delabranche, X., Asfar, P. and F. Toti. 2010. Bench to bedside review: Circulating microparticles a new player in sepsis? *Critical Care*, 14(5):236-243.
4. Nota de Prensa Sepsis Day. 2016 (13 Septiembre). Sociedad Española de Medicina Intensiva, Crítica y Unidades Coronarias.
<http://www.semicyuc.org/temas/semicyuc/comunicados-oficiales/lasepsis-acaba-con-la-vida-de-una-persona-cada-cuatro-segundos>
5. Van Amersfoort, E.S., Van Berkel, T. and J. Kuiper. 2003. Receptors, mediators, and mechanisms involved in bacterial sepsis and septic shock. *Clinical Microbiology Reviews*, 16(3):379-414.
6. Nota descriptiva Resistencia a los antibióticos. 2016 (Octubre). Organización Mundial de la Salud, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/es/>
7. Mayr, F.B., Yende, S. and D.C. Angus. 2014. Epidemiology of severe sepsis. *Virulence*, 5(1):4-11.
8. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. 2017(27 Febrero). Organización Mundial de la Salud.
<http://www.who.int/medicines/publications/global-priority-list-antibiotic-resistant-bacteria/en/>
9. Zafrani, L., Gerotziafas, G., Bymes, C., Hu, X., Perez, J., Lévi, C., et al. 2012. Calpastatin Controls polymicrobial sepsis by limiting procoagulant microparticle release. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 185(7):744- 755.
10. Mostefai, H.A., Meziani, F., Mastronardi, M.L., Agouni, A., Heymes, C., et al. 2008. Circulating microparticles from patients with septic shock exert protective role in vascular function. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 178:1148-1155.
11. Schorey, J.S. and C.V. Harding. 2016. Extracellular vesicles and infectious diseases: New complexity to an old story. *Journal of Clinical Investigation*, 126(4): 1181-1189.
12. Souza, A.C.P., Yuen, P.S.T. and R.A. Star. 2015. Microparticles: Markers and mediators of sepsis-induced microvascular dysfunction, immunosuppression, and AKI. *Kidney International*, 87(6): 1100-1108.
13. Hermann, I. K., Bertazzo, S., O'Callaghan, D. Schlegel, A. A., et al. 2015. Differentiating sepsis from non-infectious systemic inflammation based on microvesicle bacteria aggregation. *Nanoscale*, 7:13511-13520.
14. Zafrani, L., Ince, C. and P. Yuen. 2013. Microparticles during sepsis: target, canary or cure? *Intensive Medicine Care*, 39:1854-1856.
15. Bodega, G., Alique, M., Bohórquez, L., Ciordia, S., Mena, M.C. and M.R. Ramírez. 2017. The antioxidative role of young and senescent human umbilical vein endothelial cells and

their microvesicles. Volume. Article ID 7094781,12 pages.
<https://doi.org/10.1155/2017/7094781>.

- 5 16. Pitt, J.M., Kroemer, G. and L. Zitvogel. 2016. Extracellular vesicles: Masters of intercellular communication and potential clinical interventions. *Journal of Clinical Investigation*, 126(4): 1139-1143.
- 10 17. Ehrnthaller, C., Ignatius, A., Gebhard, F. and M. Huber-Lang. 2011. New insights of an old defense system: Structure, function, and clinical relevance of the complement system. *Molecular Medicine*, 17(3-4):317-329.
- 15 18. Clinical laboratory testing and in vitro diagnostic test Systems. Susceptibility testing of infectious agents and evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices. 2006. International Standard (ISO 20776-1).

REIVINDICACIONES

1. Uso de microvesículas derivadas de células endoteliales (MVe) para la elaboración de un antibiótico.
2. Uso según la reivindicación 2 donde el antibiótico es efectivo frente a bacterias Gram+ y Gram-.
3. Uso según la reivindicación 2 donde las bacterias Gram+ se seleccionan de la lista que consiste en: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus resistente a meticilina*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium tetani*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Bacillus anthracis*, *Actinomyces israelii* o combinaciones de las mismas;
4. Uso según la reivindicación 2 donde las bacterias Gram- se seleccionan de la lista que consiste en: *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Haemophilus influenzae*, *Bordetella pertussia*, *Helicobacter pylori*, *Legionella pneumophila*, *Acinetobacter baumannii*, *Neisseria meningitidis* o combinaciones de las mismas.
5. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 caracterizado por que el antibiótico comprende la fracción citosólica de las MVe.
6. Uso de MVe para la elaboración de un medicamento para el tratamiento de patologías que cursan con infección bacteriana.
7. Uso según la reivindicación 6 caracterizado por que el medicamento comprende la fracción citosólica de la MVe.
8. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 7 donde el medicamento es un antibiótico.
9. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8 donde la infección bacteriana es producida por una bacteria que se selecciona de la lista que consiste en bacterias Gram+ y Gram-.
10. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9 donde las bacterias Gram+ se seleccionan de la lista que consiste en: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus resistente a meticilina*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium tetani*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Bacillus anthracis*, *Actinomyces israelii* o combinaciones de las mismas.
11. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9 donde las bacterias Gram- se seleccionan de la lista que consiste en: *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Haemophilus influenzae*, *Bordetella pertussia*, *Helicobacter pylori*, *Legionella pneumophila*, *Acinetobacter baumannii*, *Neisseria meningitidis* o combinaciones de las mismas.
12. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 11 donde la patología que cursa con infección bacteriana se selecciona de la lista que consiste en: sepsis, gangrena, salmonelosis, botulismo, cólera, impétigo, meningitis, neumonía, tétanos, tuberculosis, gonorrea, sífilis, nefritis y cistitis.
13. Composición farmacéutica que comprende MVe y al menos un excipiente y/o vehículo farmacéuticamente aceptable.

14. Composición farmacéutica según la reivindicación 13 caracterizada por que comprende la fracción citosólica de las MVe.
- 5 15. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 14 que además comprende al menos un principio activo.
- 10 16. Composición farmacéutica según la reivindicación 15 donde el principio activo se selecciona de la lista que consiste en: antibióticos, antiinflamatorios, antipiréticos, analgésicos y/o cualquier combinación de los mismos.
17. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 16 donde el principio activo se selecciona de la lista que consiste en: ácido acetilsalicílico, diclofenaco, indometacina, piroxicam, ibuprofeno, naproxeno, dihidrocodeína, dextropropoxifeno, fentanilo, tramadol, metamizol, paracetamol, y/o cualquier combinación de los anteriores.

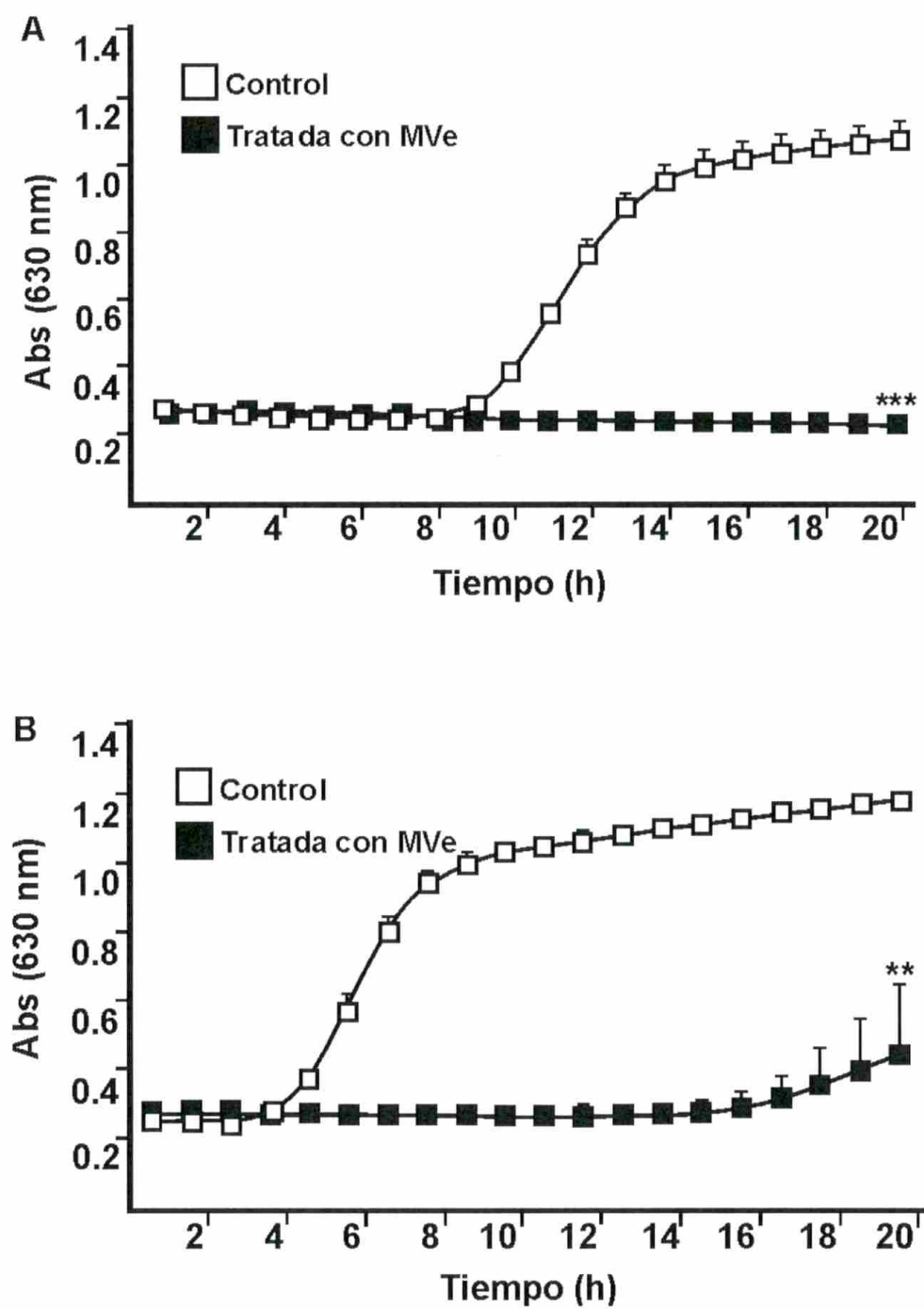


FIG. 1

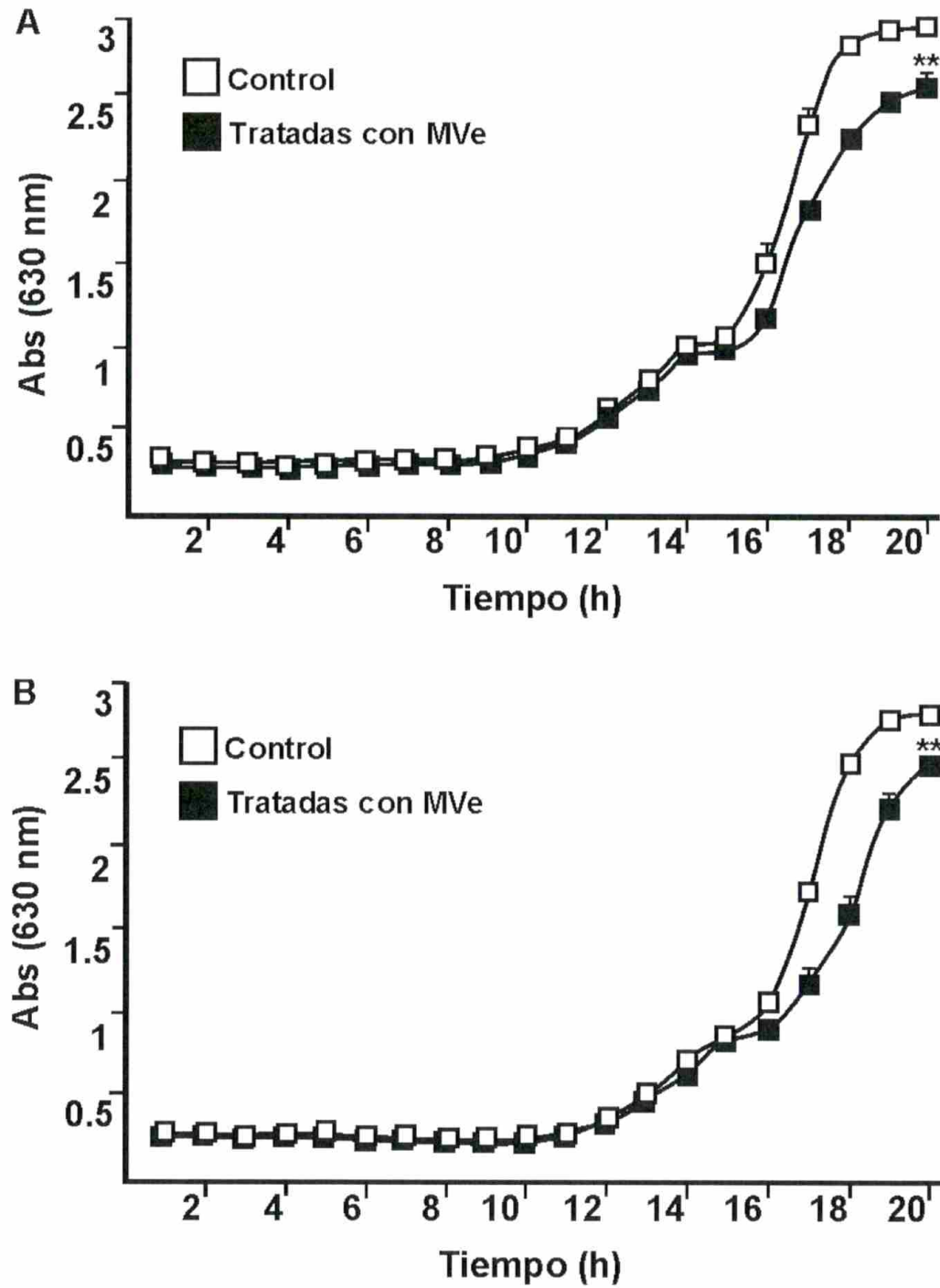


FIG. 2

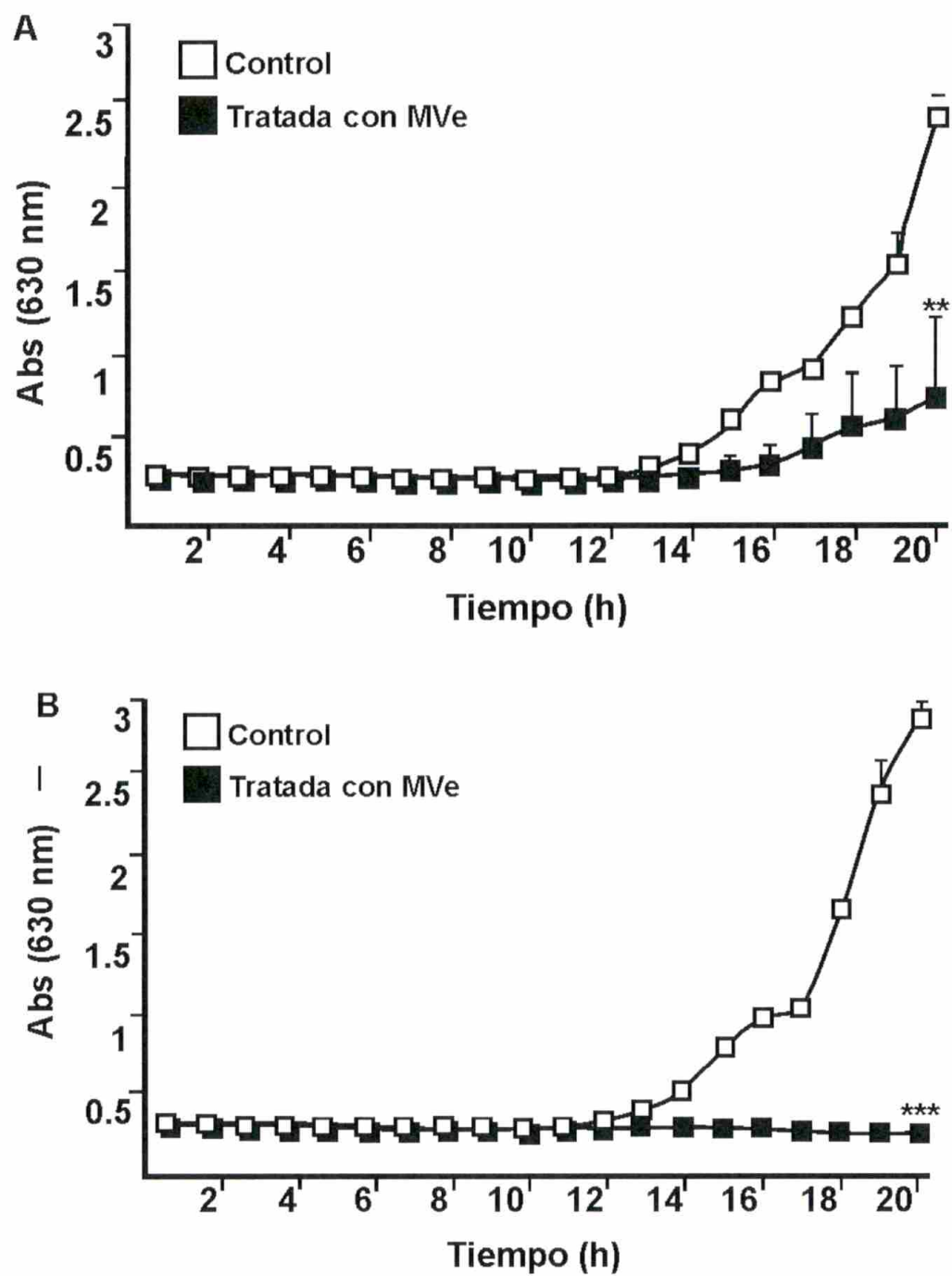


FIG. 3

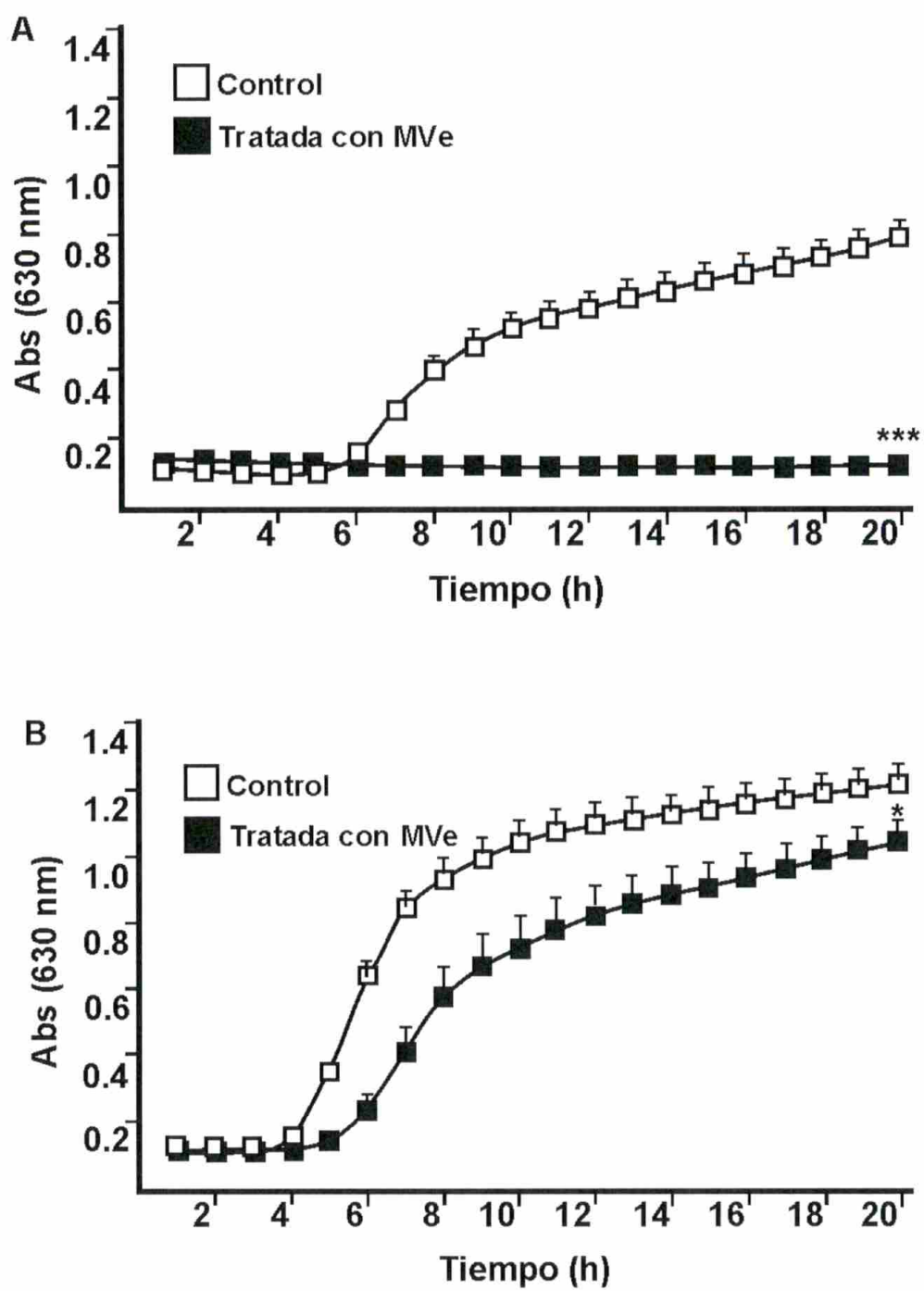


FIG. 4

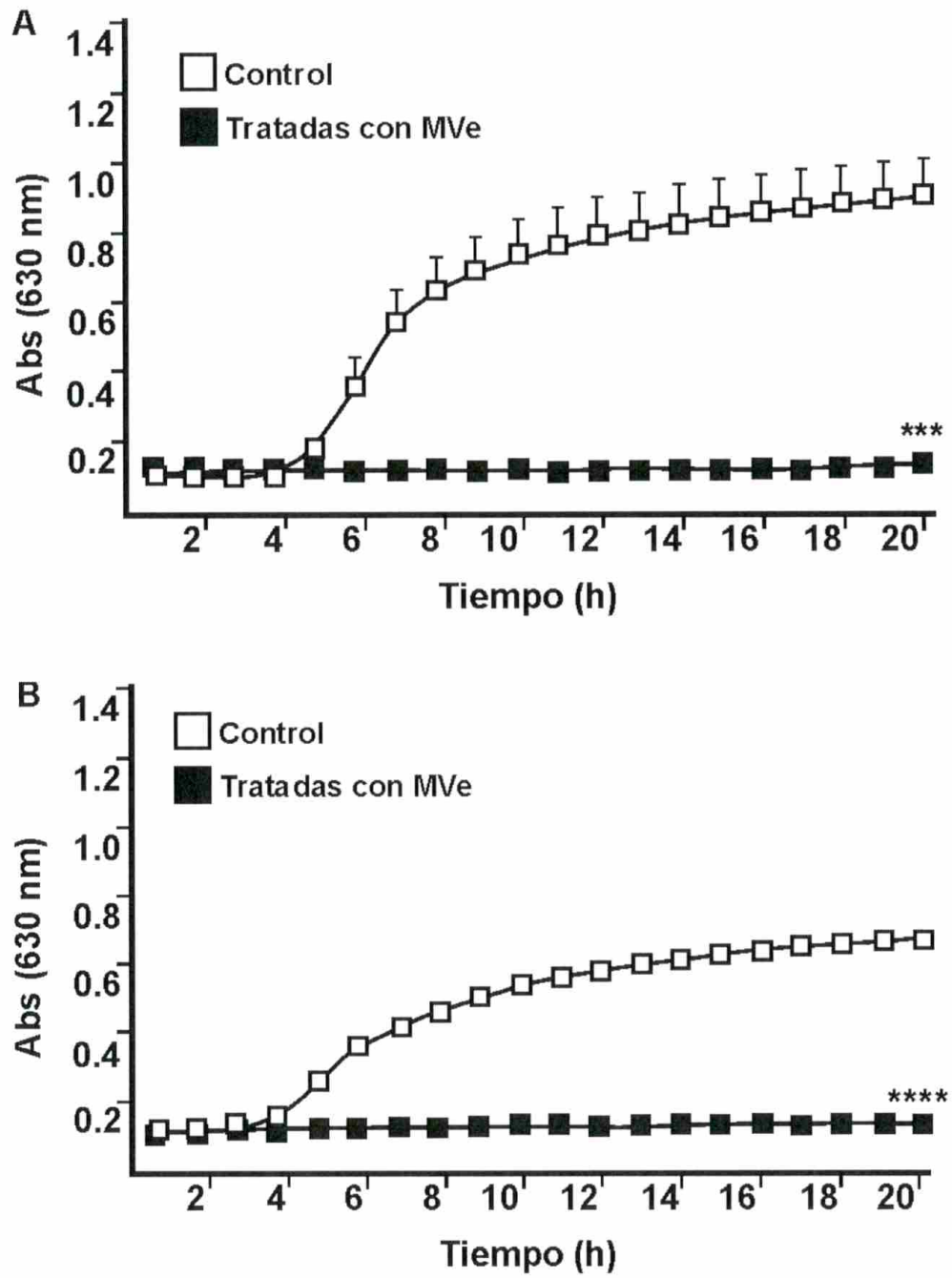


FIG. 5

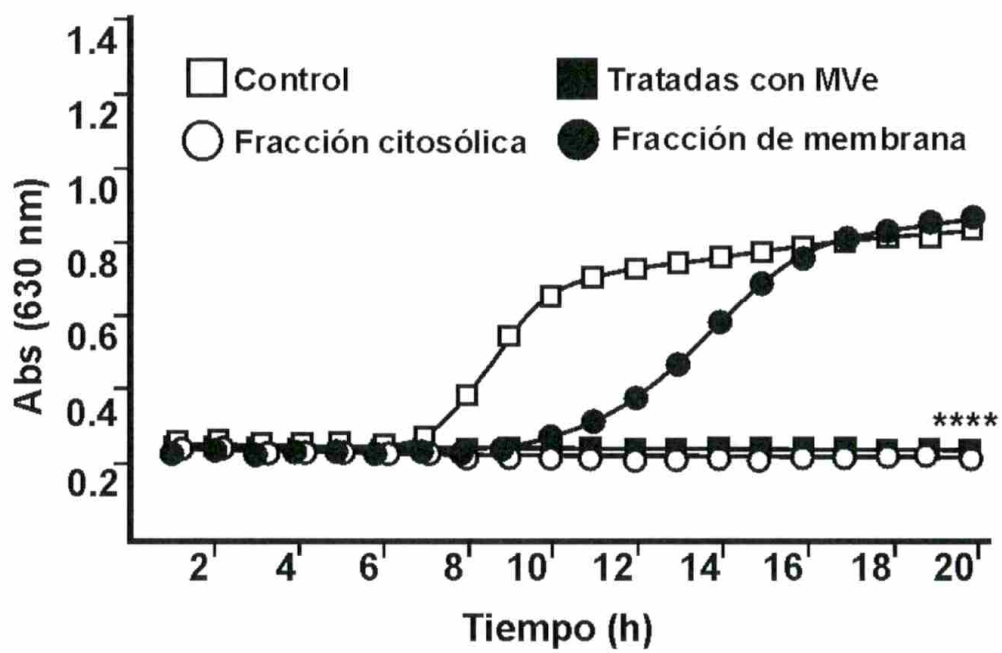
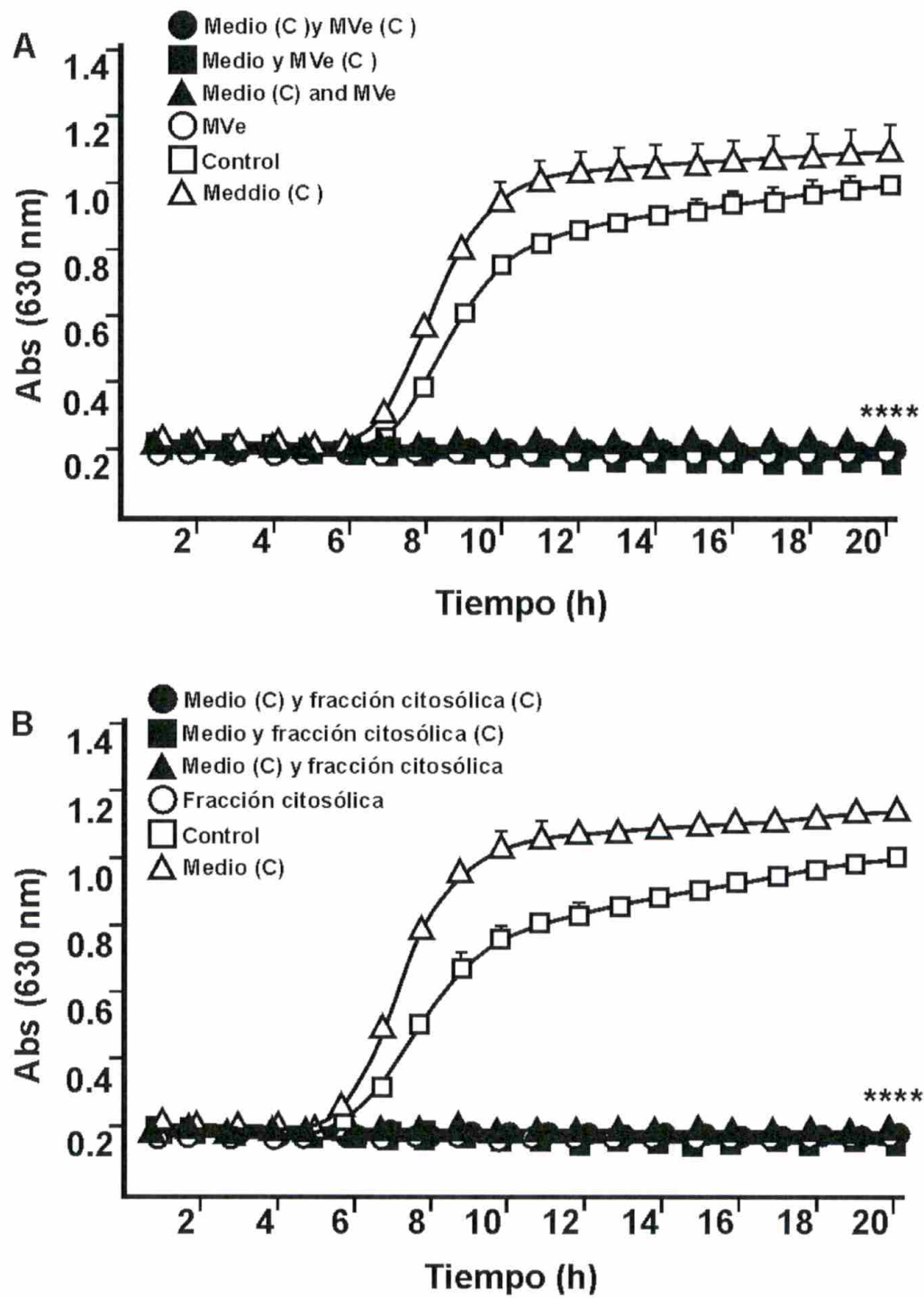


FIG. 6



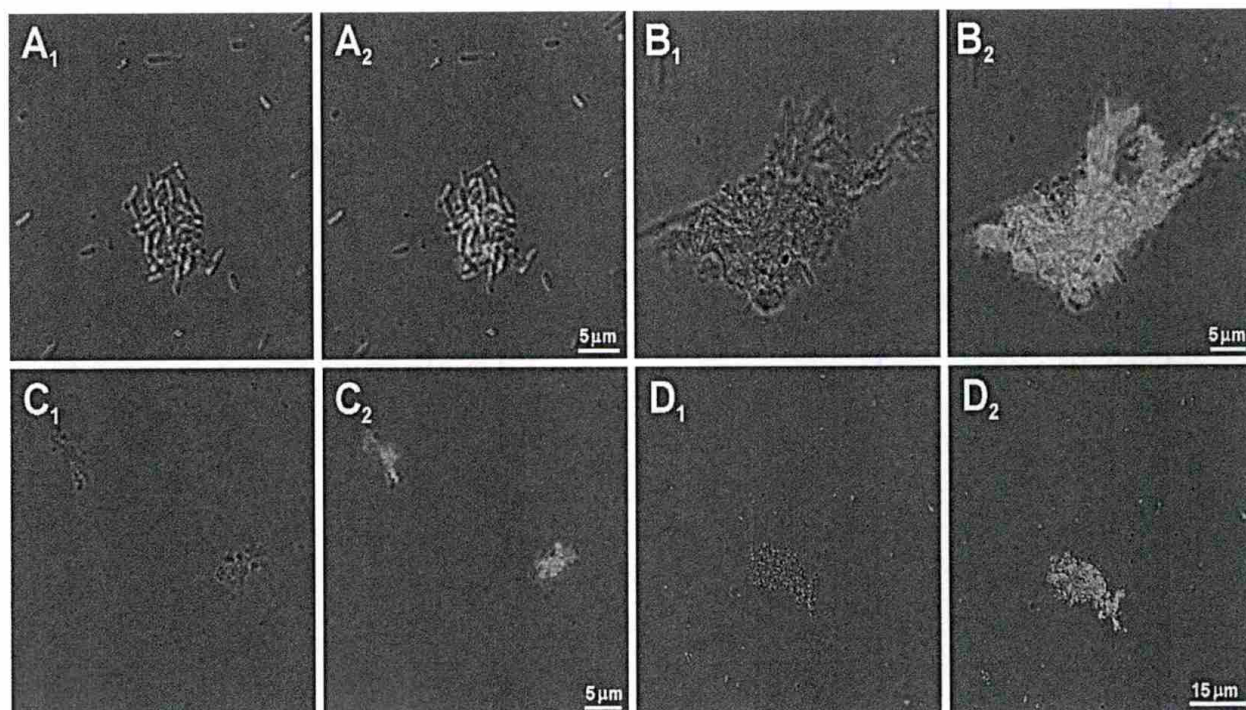


FIG. 8



- ②① N.º solicitud: 201800049
②② Fecha de presentación de la solicitud: 01.03.2018
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	ES 2409180 T3 (FRESENIUS MEDICAL CARE DEUTSCHLAND GMBH) 25/06/2013, Página 3, líneas 18-50; reivindicaciones 1-3.	1-17
A	ES 2423483 T3 (FRESENIUS MEDICAL CARE DEUTSCHLAND GMBH) 20/09/2013, Página 3, línea 47 - página 4, línea 36; reivindicaciones 1-4.	1-17
A	ES 2604946 T3 (CRYO-SAVE AG) 10/03/2017, Página 4, línea 30 - página 5, línea 8; reivindicaciones 1-3, 7-9.	1-17
A	ES 2446301 T3 (THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION) 07/03/2014, Página 3, líneas 13-39.	1-17

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 nº:

Fecha de realización del informe
06.07.2018

Examinador
M. D. García Grávalos

Página
1/2

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

A61K35/51 (2015.01)**C12N5/074** (2010.01)**A61P31/00** (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61K, C12N, A61P

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, NPL, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, PUBMED, USPTO PATENT DATABASE, GOOGLE PATENTS.