

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 808 996**

51 Int. Cl.:

A61K 41/00 (2010.01)

A61N 5/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.03.2017 PCT/IB2017/000186**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.09.2017 WO17149378**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.03.2017 E 17715525 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.05.2020 EP 3423098**

54 Título: **Sistema para el tratamiento o la prevención por termoterapia de infecciones resistentes a antimicrobianos o por biopelículas**

30 Prioridad:

01.03.2016 US 201662301946 P

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

02.03.2021

73 Titular/es:

FUNDACIÓ HOSPITAL UNIVERSITARI VALL D'HEBRON - INSTITUT DE RECERCA (33.3%)

Passeig Vall d'Hebrón, 119-129

08035 Barcelona, ES;

FUNDACIO INSTITUT DE BIOENGINYERIA DE CATALUNYA (33.3%) y

INSTITUCIÓ CATALANA DE RECERCA I ESTUDIS AVANÇATS (33.3%)

72 Inventor/es:

GAVALDA SANTAPAU, JOAN;

FRANCO PUNTES, VICTOR y

TORRENTS SERRA, EDUARD

74 Agente/Representante:

CONTRERAS PÉREZ, Yahel

ES 2 808 996 T3

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

DESCRIPCIÓN

Sistema para el tratamiento o la prevención por termoterapia de infecciones resistentes a antimicrobianos o por biopelículas

5

Campo de la invención

La presente invención se refiere, en general, al campo técnico de la termoterapia. Más particularmente, la presente invención está en el campo técnico de la termoterapia para tratar y prevenir infecciones resistentes a antimicrobianos y por biopelículas.

10

Antecedentes de la invención

El acceso a antibióticos eficaces es esencial en todos los sistemas sanitarios. Su uso ha reducido la mortalidad infantil y aumentado la esperanza de vida, y son cruciales para la cirugía invasiva y tratamientos tales como la quimioterapia del cáncer y el trasplante de órganos sólidos. La resistencia a antimicrobianos (RAM) es un concepto en vez de una enfermedad en sí misma y a pesar de su espectacular aumento, no se le presta la misma atención que a las amenazas infecciosas agudas como el SARS, la gripe pandémica o el Ébola, ni la misma atención que a las tres principales enfermedades infecciosas VIH, tuberculosis y malaria. La RAM es una amenaza global grave, que afecta a la economía global, la salud social y pública. Los Informes de Riesgos Sociales del Foro Económico Mundial más recientes han listado la RAM como una de las mayores amenazas de riesgo social para la salud humana.

15

20

Entre las bacterias RAM más importantes en términos de infecciones causantes en pacientes hospitalizados están los denominados patógenos 'ESKAPE'. Estos son *E. faecium*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa* y *Enterobacter* spp. La amenaza más destacada de RAM es la tendencia rápidamente creciente de resistencia entre RAM, las bacterias 'ESKAPE' que provocan las infecciones hospitalarias en los últimos años. Además de los patógenos ESKAPE, RAM en *E. coli*, sigue siendo la principal causa de mortalidad por septicemia intensa en pacientes hospitalizados. En países con altos niveles de resistencia a MDR, que incluye resistencia a carbapenémicos, y en el caso de infecciones debidas a *P. aeruginosa* resistente a carbapenémicos (incidencia de MDR/XDR en *P. aeruginosa* 25-50 %), solo están disponibles algunas opciones terapéuticas, entre estas están las polimixinas. En estos países y en el caso de MDR/XDR en *P. aeruginosa*, la presencia de resistencia a polimixinas o aminoglucósidos es una advertencia importante de que las opciones para el tratamiento de pacientes infectados están siendo más limitadas. Entonces, algunos antibióticos son lo suficientemente eficaces para terapia. Los antibióticos que todavía funcionan, frecuentemente tienen importantes efectos secundarios, son menos eficaces, o son muy caros (tigeciclina). RAM no es solo cara en términos de sufrimiento humano, sino también en términos monetarios. La RAM se atribuye actualmente al menos 50.000 vidas cada año en Europa y los EE. UU. solo y aproximadamente 700.000 vidas en todo el mundo; al coste estimado de más de 1,5 billones de euros o 35 billones de dólares anualmente.

25

30

35

Además de la elevada resistencia a los agentes existentes, hay una falta de nuevos antibióticos en desarrollo. Durante muchos años, la industria farmacéutica ha producido satisfactoriamente en masa nuevos fármacos antibacterianos. Sin embargo, cada vez es más difícil encontrar antibióticos novedosos, y muchas empresas farmacéuticas grandes se han retirado de los programas de desarrollo de antibióticos debido a que el proceso es extremadamente caro, y frecuentemente improductivo. De modo alarmante, los antibióticos están perdiendo su potencia debido a la diseminación de la resistencia a una tasa alarmante, aunque se están desarrollando algunos antibióticos nuevos. Por tanto, los presentes inventores se están enfrentando a una situación paradójica, como una perfecta tormenta, con elevados niveles de bacterias resistentes junto con una tendencia descendente en el desarrollo de antibióticos.

40

45

La diseminación de bacterias RAM podría devolver espectacularmente la moderna medicina a la edad oscura de la era pre-antibióticos; los logros en la medicina moderna, tales como una disminución en la seguridad de los partos, cesáreas, tratamiento de prematuros, cirugía mayor o incluso menor sucia, tratamiento de neumonía, enfermedades de transmisión sexual, trasplante de órganos y quimioterapia del cáncer, que los presentes inventores dan por hecho hoy en día, no serían posibles sin el acceso a un tratamiento eficaz para infecciones bacterianas con antibióticos.

50

Actualmente se reconoce la urgente necesidad de financiar investigaciones pertinentes para el desarrollo de nuevos antibióticos y alternativas para el tratamiento de la RAM, aumentando los incentivos económicos para desarrollar urgentemente los antibióticos necesarios, además de diferentes reglamentos a diferentes niveles, tanto en el sector de la sanidad humana como animal, para preservar la eficacia de los antibióticos.

55

Además, son comunes en la práctica médica actual las infecciones crónicas difíciles de tratar asociadas a los dispositivos médicos, tales como prótesis articulares y otros tipos de instrumentación ortopédica, válvulas del corazón prostéticas, marcapasos, desfibriladores implantables, catéteres urinarios y prótesis endovasculares, catéteres de diálisis peritoneal, catéteres intravasculares, derivaciones de líquido cefalorraquídeo, prótesis mamarias e injertos vasculares y prótesis endovasculares. Cuando estos dispositivos se infectan, frecuentemente se deben retirar para curar satisfactoriamente la infección asociada. La retirada de los dispositivos está asociada con una significativa morbilidad, coste y, en algunos casos, mortalidad. Se ha mostrado que dispositivos tales como las prótesis

60

65

endovasculares, las derivaciones, las prótesis, los implantes, los tubos endotraqueales, los marcapasos y los diversos tipos de catéteres, por nombrar algunos, soportan la colonización y formación de biopelículas por diferentes especies bacterianas o *Candida spp.* Estas especies bacterianas o biopelículas de *Candida* son 30 a 2.000 veces más resistentes que las células planctónicas a los agentes antimicrobianos.

5

Se conoce en la técnica el valor de la nanotecnología que ha proporcionado la posibilidad de suministrar fármacos a células específicas usando nanopartículas. La nanotecnología se define como el "diseño intencionado, la caracterización, la producción y las aplicaciones de materiales, estructuras, dispositivos y sistemas que controlan su tamaño y forma en el intervalo nanométrico (1 a 100 nm). Debido a que los nanomateriales son similares en escala a las moléculas biológicas y todavía se pueden manipular sistemas para tener diversas funciones, la nanotecnología es posiblemente útil para aplicaciones médicas. El campo de la nanomedicina tiene como objetivo usar las propiedades y características físicas de los nanomateriales para el diagnóstico y el tratamiento de enfermedades al nivel molecular. Ahora se están diseñando nanomateriales para ayudar en el transporte de agentes terapéuticos a través de las barreras biológicas; para acceder a las moléculas; para mediar en las interacciones moleculares; y para detectar cambios moleculares en un modo sensible de alto rendimiento. A diferencia de los átomos y materiales macroscópicos, los nanomateriales tienen una alta relación entre el área superficial y el volumen, así como propiedades ópticas, electrónicas, magnéticas y biológicas ajustables, y se pueden manipular para tener diferentes tamaños, formas, composiciones químicas, características químicas superficiales y estructuras huecas o sólidas. Estas propiedades están siendo incorporadas en las nuevas generaciones de vehículos de administración de fármaco, algunos de los cuales están actualmente en investigación clínica o han sido autorizados por la Agencia Estadounidense del Medicamento (FDA) para su uso en seres humanos.

Se conoce también en la técnica el valor de las nanopartículas de oro y de plata que ayudan en la obtención de imágenes, el diagnóstico y el tratamiento de enfermedades oncológicas e infecciosas. Además, en el diseño de este objeto, también se planea su disgregación programada, por lo que el dispositivo se desmantela en especies iónicas seguras después de uso, una vez han hecho su trabajo, finalmente son eliminadas por el cuerpo. Se conocen NP de Ag pequeñas, el tamaño de proteínas, por ser corroídas y disueltas *in vivo* dando iones Ag⁺ que inducen ROS e interfieren con los mecanismos de respiración de las bacterias, dando como resultado un antibiótico de espectro muy amplio. Entonces, habría una destrucción de sinergia bacteriana persistente debido a Ag⁺ más los antibióticos.

30

Ha aumentado en las dos últimas décadas el interés en la hipertermia como complemento a los tratamientos de oncología convencionales. La hipertermia se refiere ahora a calentar tumores, tejidos o sistemas hasta temperaturas de hasta 42 °C, para sensibilizar tejido a los tratamientos convencionales, o para inducir la regresión tumoral. Sin embargo, la hipertermia como terapia se remonta milenios atrás: los egipcios, griegos y romanos usaron líquidos calentados hasta vapor sobre piedras o ladrillos para tratar lo que era probablemente cáncer de mama. La hipertermia en la medicina moderna se usó por primera vez por el ginecólogo Frans Westermarck en 1898, que logró una excelente respuesta en carcinomas cervicales localmente avanzados haciendo circular agua caliente por un tubo en espiral intracavitario. Posteriormente, se ha usado la hipertermia en diversos ámbitos médicos.

La hipertermia moderada (≤ 42 °C) aumenta la circulación sanguínea tumoral con oxigenación, y así puede actuar como radiosensibilizador aumentando la oxigenación y como quimiosensibilizador en el lecho tumoral; esto es posiblemente cómo la hipertermia modifica la angiogénesis. La hipertermia también afecta los procesos celulares mediante la desnaturalización de proteínas, el plegamiento de proteínas, la agregación y la reticulación de ADN que conduce a la rotura de los ensamblajes biomoleculares, la inducción de proteínas de choque térmico y también la rotura de mecanismos celulares que promueven la aparición de acidosis o apoptosis. El calor se puede suministrar por diferentes mecanismos dependiendo del grado de aplicación; por ejemplo, las fuentes de energía pueden incluir ultrasonidos, cámaras térmicas, luz láser, luz de infrarrojo cercano o radioterapia.

La hipertermia usando nanopartículas es un concepto novedoso que permite el calentamiento controlado de tejido tumoral. La hipertermia basada en nanopartículas puede tener efectos terapéuticos directos y potenciar la administración de fármacos en una única terapia, que hace que sea una terapia con dos ventajas para el tratamiento del cáncer. Las nanopartículas proporcionan un modo de aplicación interesante de la hipertermia, debido a que por concentración de la fuente de calor local (las nanopartículas) dentro del tumor, en teoría, se puede minimizar el daño inducido por el calor a las células sanas. Además, las nanopartículas proporcionan un vehículo para administrar fármacos quimioterapéuticos al tumor al mismo tiempo que se induce la hipertermia; dichas nanopartículas de material compuesto podrían aprovecharse de los efectos de la quimiosensibilización. Entonces, ha avanzado la eficiencia de la hipertermia usando tecnologías a escala nanométrica. Específicamente, las nanopartículas basadas en oro (AuNP), las nanopartículas basadas en carbono (CNP) y las nanopartículas de óxido de hierro (IONP) parecen ser las construcciones de tamaño nanométrico más prometedoras para mejorar la hipertermia. Se ha mostrado que los nanomateriales metálicos que incluyen nanocristales de oro y de plata y nanovarillas generan un calentamiento hipertérmico localizado mediante la absorción de radiación óptica incidente y la relajación de plasmones superficiales. También se ha demostrado el calentamiento de nanopartículas de oro bajo campos de radiofrecuencia (RF); sin embargo, se han propuesto múltiples mecanismos de calentamiento y es incierto el grado al que las partículas de oro se calientan en el campo de RF. El documento de patente WO2015148726A1 desvela un recubrimiento que se puede proporcionar para liberar agentes microbicidas para tanto garantizar la prevención de infecciones como para evitar el

65

- desarrollo de resistencia a antibióticos. Se usan iones plata para características antimicrobianas. Además, la electrólisis inversa permite que los iones sean liberados durante un periodo de tiempo sostenido, y entonces se recogen de nuevo sobre el implante para evitar el envenenamiento de la plata. Un sistema de electrólisis inversa inalámbrica libera una cantidad suficiente de iones plata para degradar la biopelícula que rodea un implante de articulación. Aplicando una forma de onda de corriente modulada que tiene un valor negativo neto a una tira de cobre conductora, la corriente del espejo inducida sobre la superficie de recubrimiento de plata tiene un flujo positivo neto, que permite que los iones sean liberados en el tejido circundante. Se puede usar la capacidad de inducir la electrólisis de iones plata para matar bacterias para evitar la infección posoperatoria.
- 10 El documento de patente WO2017025104A1 se refiere a un dispositivo de administración adecuado para administrar una sustancia química, por ejemplo un dispositivo médico en forma de microcápsulas que comprenden antiincrustante para pintura marina. El dispositivo de administración comprende una cavidad cerrada, la cavidad se define por una superficie de pared más interna, en donde al menos una sección de la superficie de la pared interna constituye una superficie interna de una membrana de administración en donde la membrana de administración comprende un sustrato de red de polímero interpenetrante que comprende un polímero hospedador y un polímero huésped, donde el polímero huésped está interpenetrando el polímero hospedador para formar vías sustancialmente continuas dentro de dicho polímero hospedador.

Se hace referencia adicional al documento de patente US2009/181101 A1.

- 20 Ninguno de los documentos del estado de la técnica desvela un ensamblaje de nanopartículas suministrado sobre un soporte (por ejemplo, un hidrogel, armazón, etc.) previsto para ser colocado en un área localizada de un paciente infectado o en riesgo de infectarse por microorganismos y activado por uno o más disparos térmicos. Además, ninguno de los documentos del estado de la técnica desvela la asociación de un agente antimicrobiano unido a la superficie de la nanopartícula, para actuar de aptámero del área localizada cuando se aplica un disparo térmico.

Descripción de la invención

- 30 La invención se define en el conjunto adjunto de reivindicaciones. Los métodos mencionados en lo sucesivo no forman parte de la invención. La presente invención se refiere a un sistema de nanopartículas (NP) teranósticas antibióticas para termoterapia dirigida avanzada y método para RAM e infecciones por biopelículas.

- 35 La presente invención aplica algunos de los principios explicados anteriormente para tratar o prevenir infecciones bacterianas multirresistentes (MDR)/resistencia extrema (XDR) o muy difíciles para tratar o prevenir infecciones por biopelículas.

- 40 Para ese fin, las realizaciones de la presente invención proporcionan según un primer aspecto un sistema para el tratamiento por termoterapia o la prevención de infecciones resistentes a antimicrobianos o por biopelículas, comprendiendo el sistema un soporte (por ejemplo una malla, un catéter vascular o urinario, un hidrogel, una prótesis, una prótesis endovascular, suturas, un hilo, un alambre, electrodos o un tubo endotraqueal) configurado para recibir un ensamblaje de nanopartículas y para ser transportado hacia un área localizada de un organismo infectado o en riesgo de infectarse por microorganismos; comprendiendo dicho ensamblaje de nanopartículas una pluralidad de nanopartículas que tiene cada una un núcleo de metal y una superficie que rodea dicho núcleo metálico, en donde el núcleo metálico puede reaccionar con energía térmica; y una unidad de energía configurada para aplicar al menos un disparo térmico (suministro de energía térmica en, en general, un corto periodo de tiempo) sobre dicha área localizada expuesta al ensamblaje de nanopartículas, aumentando la temperatura de dicha área localizada hasta un valor dado por el ensamblaje de nanopartículas, por lo que se permite una terapia antimicrobiana multimodal nanoteranóstica.

- 50 El núcleo metálico se puede fabricar de plata (Au), oro (Ag), una mezcla de los mismos (Au/Ag), o incluso fabricado de hierro.

Según una realización, al menos un agente antimicrobiano está fijado a la superficie de la nanopartícula, estando dicho al menos un agente antimicrobiano en sí mismo configurado para actuar de aptámero del área localizada.

- 55 Según una realización, la superficie de cada nanopartícula comprende una cubierta de mPEG con el fin de que la nanopartícula no sea reconocida por el organismo como un cuerpo extraño.

- 60 Según una realización, el sistema también incluye una unidad de control configurada para controlar que dicho aumento de temperatura del área localizada después de que se aplique al menos un disparo térmico no supere los 40 °C. Se debe observar que la unidad de control puede ser una unidad independiente o se puede integrar en la unidad de energía.

Según otra realización más, las nanopartículas comprenden el núcleo metálico unido a al menos un agente antimicrobiano.

65

El disparo térmico puede comprender cualquiera de energía de infrarrojo cercano, energía de ultrasonidos pulsada de baja intensidad, energía de ultrasonidos baja, fototerapia, calentamiento eléctrico de baja tensión, calentamiento eléctrico de baja tensión con electrólisis o radioterapia.

- 5 Las realizaciones de la presente invención también proporcionan según un segundo aspecto un método de tratamiento por termoterapia o la prevención de infecciones resistentes a antimicrobianos o por biopelículas, que comprende transportar un soporte hacia un área localizada de un organismo infectado o en riesgo de infectarse por microorganismos, incluyendo dicho soporte un ensamblaje de nanopartículas que comprende una pluralidad de nanopartículas que tiene cada una un núcleo metálico (por ejemplo, de plata, u oro, o combinaciones de los mismos, entre otros) y una superficie que rodea dicho núcleo metálico, siendo el núcleo metálico reaccionable con energía
10 térmica, y aplicando, por una unidad de energía, al menos un disparo térmico sobre dicha área localizada expuesta al ensamblaje de nanopartículas, aumentando la temperatura de dicha área localizada hasta un valor dado por el ensamblaje de nanopartículas, permitiendo así una terapia antimicrobiana multimodal nanoteranóstica.
- 15 Según una realización del método, se controla el citado aumento de temperatura del área localizada después de aplicar el disparo térmico para que no supere 40 °C.

La energía se puede proporcionar al área local por diferentes medios: fotónico, conductor térmico, corriente eléctrica, ultrasonidos, etc.

- 20 Según una realización, al menos un agente antimicrobiano se fija a dicha superficie de la nanopartícula que actúa como aptámero de dicha área localizada que se va a tratar. Las nanopartículas pueden comprender el núcleo metálico unido al agente antimicrobiano fijado.
- 25 Además, la superficie de cada nanopartícula también puede comprender una cubierta de mPEG con el fin de que la nanopartícula no sea reconocida por el organismo como un cuerpo extraño.

En la mayoría de los casos, un tratamiento que implica el citado disparo térmico incluirá varios disparos térmicos, que se repiten después de un periodo de tiempo de una duración predeterminada (normalmente que comprende entre 15
30 minutos y 8 horas) dependiendo de la actividad de la infección que se va a tratar que se mantiene bajo control para la detección del crecimiento microbiano. Preferentemente, la repetición del (de los) disparo(s) térmico(s) se maneja por la unidad de control que está operativamente conectada a la unidad de energía, ya sea formando parte de la última o siendo una unidad independiente. El tratamiento se puede aplicar en días diferentes, preferentemente seguidos.

- 35 El (Los) agente(s) antimicrobiano(s) que se pueden fijar a la superficie de la nanopartícula pueden tener diferentes efectos frente a cocos Gram-positivos, bacilos Gram-negativos o agentes antibacterianos, y se pueden seleccionar entre los siguientes fármacos micobacterianos: aztreonam antimicrobiano, aminoglucósidos (amikacina, gentamicina, neomicina, netilmicina, estreptomycin, tobramicina), carbapenémicos (doripenem, ertapenem, imipenem-cilastatina, meropenem), cefalosporinas (cefepima, cefazolina, cefoxitina, cefixima, cefoperazona-sulbactam, cefotaxima,
40 ceftazidima, ceftriaxona, cefuroxima, ceftalorina, ceftizoxima), clindamicina, fluoroquinolonas (ciprofloxacino, levofloxacino, moxifloxacino, ofloxacino), ácido fusídico, gluco-, glucolipo-lipopéptidos (dalbavancina, daptomicina, telavancina, teicoplanina, vancomicina), linezolid, macrólidos (azitromicina, claritromicina), penicilinas (amoxicilina, amoxicilina clavulanato, ampicilina, ampicilina-sulbactam, piperacilina, piperacilina-tazobactam, ticarcilina, ticarcilina-clavulanato, temocilina, cloxacilina, dicloxacilina, metilicina, nafcilina, oxacilina, penicilina G), polimixinas (colistina,
45 polimixina B), tetraciclinas (doxiciclina, minociclina), sulfadiazina, trimetoprim + sulmetoxazol, tigeciclina, fosfomicina, quinupristina + dalfopristina, cloranfenicol.

- Según una realización particular del método propuesto, se incluyen adicionalmente agentes antimicobacterianos como amikacina, capreomicina, clofazimina, etambutol, etionamida, isoniazida, kanamicina, ácido para-aminosalicílico,
50 pirazinamida, rifabutina, rifapentina o estreptomycin en el ensamblaje de nanopartículas.

El método desvelado se puede usar para tratar o prevenir o usar como terapia adyuvante de terapia antimicrobiana/quirúrgica de infecciones difíciles de tratar como abscesos (cerebral, empiema subdural, epidural, pulmonar, pleural, hepático, esplénico, nefrítico o perinefrítico, ginecológico, intraperitoneal, muscular, subcutánea),
55 mediastinitis, osteomielitis aguda y crónica, infecciones por pie diabético, infección prostética (por ejemplo, infecciones asociadas a implante ortopédico, infección por injerto vascular, infección por prótesis endovascular traqueal), terapia de bloqueo de infecciones de la circulación sanguínea relacionadas con catéteres a largo plazo, prostatitis crónica, descolonización o desinfección de tubo endotraqueal infectado o colonizado o catéteres urinarios, infecciones de las derivaciones y el drenaje de líquido cefalorraquídeo, celulitis, fascitis necrotizante e infecciones de tejido subcutáneo.

- 60 Según otra realización, el método también es adecuado para ser usado para tratar o prevenir infecciones bacterianas por bacilos Gram-negativos (GNR) provocadas por *Pseudomonas aeruginosa* MDR/XDR, *Klebsiella pneumoniae* MDR/XDR, *Acinetobacter baumannii* MDR/XDR, *Escherichia coli* y otros GNR resistentes a más de dos clases de antimicrobianos. Las infecciones bacterianas por cocos Gram-positivos MDR provocadas por *Staphylococcus aureus*
65 resistentes a metilicina. Además, el método se puede usar para tratar infecciones debido al crecimiento de bacterias

en biopelículas, especialmente estafilococos negativos para coagulasa, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*. Además, el método se puede usar para tratar MDR o *Mycobacterium tuberculosis* resistente extrema u otras micobacterias atípicas difíciles de tratar.

5 El método propuesto se puede usar como tratamiento único o prevención o sería un adyuvante o complemento del tratamiento antimicrobiano o quirúrgico de elección de estas infecciones RAM o por biopelícula que son muy difíciles de curar.

Por tanto, la presente invención se basa en crear una nanopartícula teranóstica antibiótica para termoterapia dirigida
10 para tratar infecciones RAM o por biopelícula. La invención es capaz de diagnosticar y tratar diferentes infecciones RAM en unos pocos disparos.

La invención proporciona un método multifuncional previsto para llevar cantidades suficientes de fármacos, que tienen efectos antimicrobianos por sí mismas, administrar termoterapia y servir de agente de diagnóstico de contraste para
15 la obtención de imágenes (rayos X, TAC, IRM). El núcleo de la nanopartícula consiste preferentemente en mezclas de NC de Au-Ag (aleaciones, núcleo-corteza y heterodímeros) de tamaño diferente para ajustar la estabilidad química (y, por tanto, controlar la corrosión de la plata) y la biodistribución, en función de las necesidades del tratamiento. Estas nanopartículas permiten la fijación de diferentes antibióticos en la superficie de la nanopartícula, actuando como aptámeros, para "dirigirlos" hacia los microorganismos deseados, y permiten múltiples efectos antimicrobianos y
20 térmicos simultáneos. Las nanopartículas funcionalizadas con Au-Ag que llevan vancomicina se dirigirán a infecciones MDR/XDR por Gram-positivas, Gram-negativas MDR que llevan colistina o amikacina y tuberculosis XDR que se fija a amikacina. Se conoce el valor de las nanopartículas de oro en ayudar a la obtención de imágenes, el diagnóstico y el tratamiento de enfermedades oncológicas. Además, en el diseño de este objeto, también se planea su disgregación programada, por lo que se desmantela el soporte en especies iónicas seguras después de uso, una vez se ha hecho
25 su trabajo, finalmente se elimina por el cuerpo. Se conoce que NP de Au pequeñas, del tamaño de proteínas, son corroídas y se disuelven *in vivo* dando iones Ag⁺ que interfieren con los mecanismos de respiración de las bacterias dando como resultado un antibiótico de espectro muy amplio. Entonces, habría una destrucción por sinergia bacteriana persistente debido a Ag⁺, los antibióticos y los efectos de la hipertermia

30 En presencia de hipertermia, Au, Ag o Au-Ag, de la propia nanopartícula, absorben calor. En el caso de la hipertermia, las NP de Au, Ag o NP de Au-Ag concentrarán la fuente de calor, intensificando los efectos beneficiosos de la hipertermia, como aumentando la oxigenación, angiogénesis, inducción de proteínas de choque térmico y finalmente la producción de ROS que induciría el daño y la muerte bacteriana del ADN.

35 La invención es capaz de diagnosticar y tratar diferentes infecciones RAM o infecciones bacterianas muy difíciles de tratar en algunos disparos (es decir, energía térmica transmitida a las nanopartículas en varios disparos térmicos (dependiendo el número de disparos térmicos del tipo de infección) separados por un intervalo de tiempo dado).

La invención puede llevar cantidades suficientes de fármacos que tienen efectos antimicrobianos, que administran y
40 activables por termoterapia y sirviendo el núcleo metálico de agente de contraste diagnóstico para la obtención de imágenes (rayos X, TAC, IRM).

En una realización particular, se incuban nanopartículas de oro (10 nm) y plata (15 y 40 nm) con diferentes antibióticos (amikacina y colistina). Se usan diferentes tampones para controlar la carga superficial y de la molécula de antibiótico
45 para controlar su interacción electrostática. La conjugación se monitoriza con espectroscopia UV-VIS y potencial Z.

Además, por medio de la estrategia citada, la invención proporciona una evaluación de la eficacia de una nanopartícula multifuncional de una mezcla de NP de Au-Ag o Np de Au solas con antibióticos o Au/en diferentes modelos murinos de infección bacteriana XDR que intentan mostrar que; el primer termonanoantibiótico mejora el direccionamiento de
50 fármacos y el segundo direccionamiento de fármaco mejora la terapia con termonanoantibióticos.

Breve descripción de los dibujos

Las ventajas y características previas y otras serán más completamente entendidas a partir de la siguiente descripción
55 detallada de las realizaciones, con referencia a las figuras adjuntas, que se deben considerar en un modo ilustrativo y no limitante, en las que:

La Fig. 1 es un dibujo esquemático que muestra una realización del principio de operación de la presente invención, es decir, estrategias de termoterapia nanoteranóstica para tratar infecciones resistentes a
60 antimicrobianos o infecciones por biopelícula. La nanopartícula según esta realización particular comprende un núcleo metálico de Au-Ag que permite la fijación de diferentes antibióticos en la superficie, que actúan de aptámeros.

La Fig. 2 es una ilustración esquemática de una realización de la metodología propuesta para la aplicación del
65 disparo térmico, en este caso, usando fototerapia.

La Fig. 3 ilustra los ensayos de la curva de tiempo-destrucción de AK, AgNP, AgNP_AK a las 4, 8 y 24 h. (a) Cepas de *P. aeruginosa* (b) cepas de *K. pneumoniae* y (c) cepas de *A. baumannii*.

5 La Fig. 4 ilustra la eficacia de AgNP_AK usando hipertermia por fototerapia (luz) para la aplicación de disparo térmico evaluada en un clon de alto riesgo (ST175) de *P. aeruginosa*.

La Fig. 5 ilustra la eficacia de AgNP_AK usando hipertermia por calor para la aplicación de la presente invención evaluada en un clon de alto riesgo (ST175) de *P. aeruginosa*.

10

La Fig. 6 ilustra la eficacia de AgNP_AK usando hipertermia por corriente eléctrica continua de bajo amperaje más baño de arena que se evaluó en cepas de a) *P. aeruginosa* XDR (Pa 1016), b) *A. baumannii* XDR (Abl4), y c) *K. pneumoniae* XDR (Kp1). En todas las imágenes, la primera figura representa el gráfico ampliado (1° hasta 3EC y 2° es hasta 24 h).

15

La Fig. 7 ilustra la eficacia de AgNP_AK usando hipertermia por corriente eléctrica continua de bajo amperaje más baño de arena que se evaluó en la cepa PAO1. a) Grupos de tratamiento en uno de los grupos de control (placa a 37 °C) y b) grupos de tratamiento en la placa ThermoShot; hipertermia con EC más baño de arena.

20

La Fig. 8 ilustra la eficacia de AgNP_AK usando hipertermia por corriente eléctrica continua de bajo amperaje más electrólisis que se evaluó en la cepa Kp3.

Descripción detallada de la invención

25 La presente invención proporciona un sistema multimodal terapéutico y método de tratamiento o prevención de infecciones bacterianas RAM/XDR o por biopelícula.

Según una realización, el sistema propuesto comprende un soporte (no ilustrado en las figuras) configurado para recibir un ensamblaje de nanopartículas NPA y para ser transportado hacia un área localizada de un organismo de un ser vivo infectado o en riesgo de infectarse por microorganismos. El ensamblaje de nanopartículas NPA comprende una pluralidad de nanopartículas NP, teniendo cada NP un núcleo metálico y una superficie que rodea dicho núcleo metálico, siendo el núcleo metálico reaccionable con energía térmica. Una unidad de energía 15 (véase un ejemplo de la misma en la Fig. 2) está configurada para aplicar al menos un disparo térmico (suministro de energía térmica en un corto periodo de tiempo) sobre dicha área localizada expuesta al ensamblaje de nanopartículas NPA, aumentando la temperatura de dicha área localizada, por lo que se permite la terapia antimicrobiana multimodal nanoteranóstica.

35

Según la realización de la Fig. 1, el núcleo metálico se fabrica de una mezcla de oro y plata. Según otras realizaciones, en este caso no ilustradas, los núcleos metálicos se fabrican de plata, oro o hierro.

40 El sistema propuesto también comprende preferentemente una unidad de control (no ilustrada), al menos conectada a la unidad de energía 15, y siendo independiente de la última o estando integrada en ella. La unidad de control está configurada para controlar que el aumento de temperatura del área localizada después de que se aplique el al menos un disparo térmico no supere 40 °C. Además, la unidad de control también se puede configurar para controlar la repetición de los disparos térmicos separados por intervalos de una duración dada.

45

Según la realización de la Fig. 1, las nanopartículas NP también comprenden fijadas a la superficie uno o más agentes antimicrobianos (antibióticos, Ab como se ilustra en la Fig. 1). Los diferentes antibióticos tienen la propiedad de que actúan de aptámeros. En realizaciones alternativas, no ilustradas, las nanopartículas no incluyen ningún antibiótico.

50 La superficie de cada nanopartícula NP también puede comprender una cubierta de mPEG con el fin de que la nanopartícula NP no sea reconocida por el organismo como un cuerpo extraño.

El (Los) disparo(s) térmico(s) se pueden aplicar por diferentes estrategias. Por ejemplo, por fototerapia (luz) usando una lámpara o por calor (por ejemplo, una placa caliente) (como se muestra en la Fig. 2). También se puede usar una corriente eléctrica continua de bajo amperaje que usa una fuente de alimentación de corriente más baño de arena. En este último caso, se usan electrodos de platino.

55

El soporte sobre el que se puede disponer el ensamblaje de nanopartículas de NPA puede incluir cualquiera de una malla, un catéter vascular o urinario, un hidrogel, prótesis, una prótesis endovascular, suturas, un hilo, un alambre, electrodos o un tubo endotraqueal, entre otros.

60

A continuación se hará una descripción detallada de las diferentes realizaciones del método propuesto y el proceso de preparación de las nanopartículas:

i) La invención desarrolla una estrategia multimodal terapéutica contra infecciones resistentes antimicrobianas e infecciones difíciles de tratar debido a biopelículas bacterianas usando una dispositivo de termoterapia nanoteranóstica

65

antimicrobiano dirigida. Con esta estrategia se obtiene un efecto terapéutico directo en una terapia multimodal.

ii) Síntesis y caracterización de nanopartículas de plata y conjugación con antibióticos

- 5 - Síntesis de nanopartículas de plata (AgNP): Se prepararon AgNP por la técnica de crecimiento de semillas. Se prepararon 100 ml de disolución acuosa que contenía citrato de sodio 5 mM (SC) y ácido tánico 0,025 mM (TA) en un matraz redondo de tres bocas. La disolución se calentó con una manta calefactora con agitación vigorosa y un condensador para evitar la evaporación del disolvente. Después de 5 min de ebullición, se inyectó 1 ml de nitrato de plata (AgNO_3) a 25 mM; la disolución se volvió inmediatamente amarilla brillante. Se extrajo una alícuota de 1 ml para la caracterización después de 10 min de agitación vigorosa (g00).
- 10 - Crecimiento de nanopartículas de plata: Para el crecimiento de AgNP desde 10 nm hasta 20 nm (g01 y g02), se enfrió la temperatura de la disolución hasta 90 °C. Entonces se inyectaron (retraso de tiempo aproximadamente 1 min) dos ciclos de 0,1 ml de SC (25 mM), 0,25 ml de TA (2,5 mM) y 0,25 ml de AgNO_3 (25 mM). Después de 15 min, se extrajeron alícuotas de 1 ml para la caracterización adicional. En todo el proceso (síntesis y crecimiento), se almacenaron las AgNP bajo protección contra la luz y en la disolución original de la síntesis.
- 15 - Conjugación de nanopartículas con mPEG y antibióticos: Se usó amikacina o colistina para la conjugación. Se usó hidróxido de tetrametilamonio (TMAOH) (10 mM) como tensioactivo catiónico; se requirió para evitar la agregación de AgNP. Las nanopartículas resultantes se purificaron por 2 ciclos de centrifugación (20000 g durante 20 min) a temperatura ambiente. El primer sedimento se resuspendió con agua destilada y el segundo sedimento se resuspendió en el mismo volumen de TMAOH (10 mM). La disolución se transfirió a un vial de vidrio y se agitó empleando un agitador magnético. Entonces, se añadió un bajo volumen de amikacina o colistina para lograr una concentración final de 12,8 mg/l mezclada con AgNP. Después de 1 h con agitación vigorosa a temperatura ambiente, se añadió una disolución mixta de mercapto-polietilenglicol (mPEG) y amikacina o colistina. La concentración final de mPEG fue 0,3 μM , mientras que la concentración final de antibiótico fue 25,6 mg/l. Después de 30 min de agitación vigorosa, se purificó la disolución preparada (20000 g durante 20 min) y el sedimento se resuspendió hasta el volumen original con agua destilada.
- 20 - Técnicas: Se analizó por espectrofotometría UV-Vis la caracterización de cada etapa de nanopartículas conjugadas con amikacina o colistina, la disolución de AgNP se dispuso en una célula, y se realizó el análisis espectral en el intervalo de 300-800 nm a temperatura ambiente. Se usó dispersión dinámica de la luz (DLS) para medir el tamaño de AgNP. Se dispuso 1 ml de AgNP en una célula, y se realizaron el análisis de DLS y de potencial Z. Se visualizaron las imágenes de AgNP usando microscopía electrónica de transmisión (TEM). Se usaron AgNP coloidales preparadas para las mediciones de la distribución de tamaño.
- 25 -
- 30 -
- 35 -

iii) Síntesis y caracterización de nanopartículas de oro y conjugación con antibióticos

- 40 - Síntesis de nanopartículas de oro: Se prepararon nanopartículas de oro (AuNP) por el método de crecimiento de semillas. Se añadió una disolución acuosa de 150 ml de SC (2,2 mM), 0,1 ml de TA 2,5 mM y 1 ml de carbonato de potasio (K_2CO_3 , 150 mM) a un matraz redondo de tres bocas de 250 ml. La disolución se calentó con una manta calefactora con agitación vigorosa. Se utilizó un condensador para prevenir la evaporación del disolvente. Se inyectó 1 ml de precursor, ácido tetracloroaurico (HAuCl_4 , 25 mM), después de lo cual la temperatura siguió estable a 70 °C. El color de la disolución cambió en menos de 10 segundos a negro-grisáceo y luego en los siguientes 1-2 minutos a naranja-rojizo. La disolución se agitó durante 5 min a 70 °C más para completar la reacción. Las partículas resultantes (-3,5 nm, $7 \cdot 10^{13}$ NP/mL) se recubrieron con carga negativa y estable durante semanas.
- 45 - Crecimiento de nanopartículas de oro: Inmediatamente después de la síntesis de las semillas de Au y en el mismo recipiente, la muestra se diluyó extrayendo 55 ml y luego añadiendo 55 ml de SC 2,2 mM. Entonces, cuando la temperatura permaneció estable a 70 °C, se hicieron 2 adiciones de 0,5 ml de HAuCl_4 (25 mM) una detrás de la otra inyectadas en un intervalo de tiempo de 10 min. Esta etapa de crecimiento que comprende la dilución de muestra más 2 inyecciones de HAuCl_4 se repitió hasta que las partículas alcanzaron el tamaño deseado.
- 50 - Conjugación de nanopartículas con mPEG y antibióticos: se purificaron por centrifugación las nanopartículas resultantes (15000 g durante 15 min) a temperatura ambiente en eppendorfs de 1 ml. El sedimento se resuspendió hasta el volumen original con TMAOH 10 mM. La disolución se transfirió a un vial de vidrio y se agitó empleando un agitador magnético. Entonces, se añadió un pequeño volumen de colistina/amikacina para lograr la concentración final de 12,8 mg/l mezclada con AuNP. Después de 1 h con agitación vigorosa a temperatura ambiente, se añadió una disolución mixta de mPEG y antibiótico. La concentración final de mPEG se estableció a 0,3 μM mientras que la concentración final de antibiótico era 25,6 mg/l. Después 30 min de agitación, se centrifugó (20000 g, 20 min) la disolución preparada y se resuspendió el sedimento hasta el volumen original con agua destilada.
- 55 -
- 60 -
- 65 - Técnicas: Se caracterizaron las alícuotas en cada etapa por espectrofotometría de UV-Vis.

iv) Cepa bacteriana y condiciones de crecimiento

- Para los estudios de susceptibilidad planctónica, se usaron tres cepas clínicas ampliamente resistentes a fármacos (XDR) de *P. aeruginosa* (Pa 1016; cepa XDR que tiene una hiperproducción de AmpC, OprD, inactivación (Q142X), solo susceptible a colistina y amikacina y cepa aislada diseminada en hospitales españoles (ST175), Pa46; cepa XDR que tiene un VIM-2, solo susceptible a colistina y amikacina (ST111) y Pa54; cepa XDR que tiene un VIM-2, solo susceptible a colistina y amikacina (ST111)) (Tabla 1), cuatro cepas clínicas XDR de *K. pneumoniae* (Kp1; cepa XDR que produce CTX-M y OXA-48, solo susceptible a colistina, fosfomicina y amikacina, Kp2; cepa XDR que produce CTX-M y NDM, solo susceptible a fosfomicina y colistina, Kp3; cepa XDR que produce una KPC carbapenemasa, solo susceptible a gentamicina y colistina y Kp4; cepa XDR que produce AmpC, solo susceptible a colistina y amikacina) (Tabla 2) y tres cepas clínicas XDR de *A. baumannii* (Ab4256; cepa aislada que tiene OXA-51 y OXA-24, solo susceptible a XXX (ST38), Abl1; cepa aislada que tiene OXA-51, solo susceptible a colistina, y tigeciclina (ST103) y Abl4; cepa aislada que tiene OXA-51, solo susceptible a colistina, amikacina y tigeciclina (ST2)) (Tabla 3), dos *S. epidermidis* (SE14 y SE94) y dos *S. aureus* resistentes a metilicina (MRSA 15 y MRSA 16).
- 15 Para estudios de susceptibilidad a biopelículas, se usó una cepa de referencia productora de biopelículas de laboratorio de *P. aeruginosa* (PAO1).

Todas las cepas se almacenaron en leche desnatada a -80 °C en recipientes de almacenamiento para crioviales. Antes de cada experimento, las cepas se subcultivaron en agar de soja Trypticase durante 24 h a 37 °C. Entonces, se suspendieron las células del subcultivo en caldo de soja triptico (TSB) o caldo Mueller-Hinton (MHB) para alcanzar una turbidez en la escala de McFarland y posteriormente se ajustó el inóculo a la concentración deseada.

Tabla 1. Susceptibilidad de cepas de *Pseudomonas aeruginosa*.

ID ^a	ST ^c	Perfil	Mecanismo resistente a β-lactama	MIC (mg/l) y categoría clínica (punto de rotura de CLSI) ^b					
				CST	AMK	TOB	LVX	ATM	IP
Pa1016	175	XDR	Hiperproducción AmpC, OprD, inactivación (Q142X)	1 (S)	2 (S)	16 (R)	128 (R)	32 (R)	16 (
Pa46	111	XDR	VIM-2	0,5 (S)	16 (S)	64 (R)	32 (R)	16 (I)	256
Pa54	111	XDR	VIM-2	0,5 (S)	16 (S)	128 (R)	32 (R)	32 (R)	256

^a ID, número de identificación de la cepa, ^b CST, colistina; AMK, amikacina; TOB, tobramicina; LVX, levofloxacino; ATM, aztreonam; IPM, imipenem. ^cST, tipo de secuencia; S, susceptible; R, resistente; I, producto intermedio.

Tabla 2. Susceptibilidad de cepas de *Klebsiella pneumoniae*.

Susceptibilidad a antibióticos y categoría clínica (punto de rotura CLSI) ^a													
Cepa	Perfil	Mecanismo resistente a β-lactama	AMP	CAZ	FEP	IMP	MEM	CIP	GEN	AK	T/S	FOS	CST
Kp1	XDR	CTX-M (Grupo 1) OXA-48	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S	S
Kp2	XDR	CTX-M (Grupo 1) NDM	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S
Kp3	XDR	KPC	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S
Kp4	XDR	AmpC	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S

^aS, susceptible; R, resistente; AMP, ampicilina; CAZ, ceftazidima; FEP, cefepima; IMP, imipenem; MEM, meropenem; CIP, ciprofloxacino; GEN, gentamicina; AK, amikacina; T/S, trimetoprim/sulfametoxazol; FOS, fosfomicina; CST, colistina.

Tabla 3. Características fenotípicas y genotípicas de cepas isogénicas de *Acinetobacter baumannii*

Cepa	País	Clon	Tipificación			Valores de MIC (mg/l)										Cambios de aminoácidos						
			ST	SG	CAZ	FEF	IMP	MEM	CIP	LEV	GEN	AK	PIP	T/S	CO	TIG	gyrA	parC	CHDL	MBLs	Otro	AGLR
Abi4256	Barcelona	B-R	38	5	<8	16	64	>16	0,5	<=1	>8	8	>64	<=2/38	0,25	0,5	.	.	OXA-51 OXA-24		AmpC	aacA4
Abi1	Israel	A	103	12	>=64	>=64	>=16	>=16	>=4	4	>=16	21	>=128	>=320	<=0,5	2	S-83-L	normal	OXA-51	NDM-2	AmpC /S AmpC	aph6A
Abi4	Israel	C	2	2	>=64	>=64	>=16	>=16	>=4	4	4	<=2	>=128	40	<=0,5	4	S-83-L	S-80-L	OXA-51 /S OXA-23	.	AmpC /S AmpC	aph6A

ST: tipo de secuencia; SG: grupo de secuencia; CAZ, ceftazidima; FEP, cefepima; IMP, imipenem; MEM, meropenem; CIP, ciprofloxacino; LEV: levofloxacino; GEN, gentamicina; AK, amikacina; T/S, trimetoprim/sulfametoxazol; TIG: tigeciclina; CO: colistina. Cambios de aminoácidos implicados en la resistencia de alto nivel a fluoroquinolonas; AGLR, resistencia a aminoglucósidos por aacA4/aph6A; CHDL, β-lactamasa hidrolizante de carbapenémicos de clase D.

v) Estudios de susceptibilidad

Se determinaron valores de la concentración inhibidora mínima (MIC) por el método de microdilución de caldo según *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically: Approved Standard M7-A7.*

10 *CLSI, Wayne, PA, USA, 2006*". Se evaluaron los fármacos libres de colistina y amikacina para comparar la eficacia de nanopartículas. Se evaluó MIC en las cepas Pa46, Pa1016, Kp1, Kp4, Abi4, Ab4256, MRSA 15, MRSA 16, SE14 y SE94. Se usaron ATCC *P. aeruginosa* 27853, ATCC *E. coli* 25922 y ATCC *A. baumannii* 19606 como control de calidad.

vi) Ensayo de la curva de tiempo-destrucción

15 Se evaluó la eficacia de nanopartículas de plata conjugadas con amikacina sobre planctónicos en las cepas Pa46, Pa1016, Kp1, Kp4, Abi4 y Ab4256. Se realizaron ensayos de la curva de tiempo-destrucción como se describe previamente en ("Pillai Sea. Antimicrobial combinations. In V. Lorian (ed.), *Antibiotics in laboratory medicine*, 5th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, MD. p.365-440, 2005"). Las concentraciones de cada agente antimicrobiano probadas solas fueron MIC, y se añadieron nanopartículas a diferentes volúmenes; 1 ml de nanopartícula y 2 ml de nanopartícula. Se usó un tubo de crecimiento positivo sin antibióticos como control. Se inocularon tubos de ensayo (concentración final, 5×10^5 unidades formadoras de colonias (ufc)/ml) y se incubaron a 37 °C.

20 Se determinó el número de ufc/ml a las 4, 8 y 24 h de la incubación. Después de 24 h a 37 °C, entonces se determinó el recuento viable. Se consideró que el tratamiento tenía una actividad bactericida positiva cuando se alcanzó una reducción $\geq 3 \log_{10}$ en los inóculos iniciales.

25 vii) Aplicación de disparos térmicos

vii.i) Disparo térmico: Hipertermia por fototerapia (luz) con AgNP

Normalización:

30 El principal objetivo era encontrar cuánto tiempo se requirió para alcanzar 40 °C en el medio de una placa de 12 pocillos usando una luz (unidad de energía) 15 como hipertermia. Se evaluó la temperatura del medio usando la unidad de control. En su ejemplo más simple, se puede usar un termómetro de sensor como unidad de control.

35 En la placa de 12 pocillos se probaron diferentes volúmenes y medios/tratamientos: 2 ml de caldo Mueller Hinton (MHB) como control, 1 ml de MHB más 1 ml de AgNP y 1 ml de MHB más 1 ml de AgNP_AK como tratamientos. En primer lugar, la placa se atemperó 45 min a 37 °C y luego se dispuso bajo luz a una distancia D dada (preferentemente a aproximadamente 45 cm de altura). Fueron necesarios 15 min para alcanzar 40-41 °C en cada placa de pocillos, independientemente del medio que se usara (Fig. 2).

Aplicación:

Se evaluó la eficacia de AgNP conjugadas con amikacina sobre planctónicos usando hipertermia con fototerapia (luz) para la aplicación de disparos térmicos en un clon de alto riesgo (ST175) de *P. aeruginosa* (Pa1016).

40 Se evaluaron dos placas; una estuvo a 37 °C (sin fototerapia), y en la otra se aplicó fototerapia en diferentes momentos de tiempo (T); T 1 h, T 1,5 h, T 2 h, T 2,5 h y T 3 h durante 15 min. Después de la fototerapia, se tomó una alícuota de las dos placas para determinar células viables y luego se dispusieron las placas a 37 °C mientras se esperaba el siguiente golpe de calor.

El inóculo inicial fue $1,0 \times 10^8$ ufc/ml y el medio usado para los experimentos fue MHB. En ambas placas (con o sin fototerapia), existen los siguientes grupos: Control de crecimiento, amikacina (a MIC) y AgNP_AK.

45 Se consideró que el tratamiento tenía una actividad bactericida positiva cuando se alcanzó una reducción $\geq 3 \log_{10}$ en los inóculos iniciales.

vii.ii) Disparo térmico: Hipertermia por calor con AgNP

Normalización:

50 El principal objetivo era encontrar cuánto tiempo se requirió para alcanzar 40 °C en el medio de una placa de 12 pocillos usando un calentador como fuente de calor (unidad de energía). Se evaluó la temperatura del medio usando la unidad de control. En su ejemplo más simple, se puede usar un termómetro de sensor como unidad de control.

En la placa de 12 pocillos se probaron diferentes volúmenes y medios/tratamientos: 2 ml de caldo Mueller Hinton (MHB) como control, 1 ml de MHB más 1 ml de AgNP y 1 ml de MHB más 1 ml de AgNP_AK como tratamientos. En primer lugar, la placa se atemperó 45 min a 37 °C y luego se dispuso sobre un calentador (\bar{a} 60 °C). Fueron necesarios

15 min para alcanzar 40-41 °C en cada placa de pocillos, independiente del medio que se usara.

Aplicación:

Se evaluó la eficacia de AgNP conjugadas con amikacina sobre planctónicos usando hipertermia por calor para la aplicación de disparos térmicos en un clon de alto riesgo (ST175) de *P. aeruginosa* (Pa1016).

- 5 Se evaluaron dos placas; una estuvo a 37 °C (sin calor), y en la otra se aplicó en diferentes momentos de tiempo (T); T 1 h, T 1,5 h, T 2 h, T 2,5 h y T 3 h durante 15 min. Después del golpe de calor, se retiró una alícuota de las dos placas para determinar las células viables y luego se dispusieron las placas a 37 °C mientras se esperaba el siguiente golpe de calor.

- 10 El inóculo inicial fue $1,0 \times 10^8$ ufc/ml y el medio usado para los experimentos fue MHB. En ambas placas (con o sin fototerapia), existen los siguientes grupos: Control de crecimiento, amikacina (a MIC) y AgNP_AK.

Se consideró que el tratamiento tenía una actividad bactericida positiva cuando se alcanzó una reducción $\geq 3 \log_{10}$ en los inóculos iniciales.

vii.iii) Disparo térmico: Hipertermia por corriente eléctrica continua de bajo amperaje más baño de arena con normalización de AgNP

- 15 Normalización:

El principal objetivo era encontrar el amperaje y cuánto tiempo se requirió para alcanzar 40 °C en el medio de una placa de 12 pocillos usando corriente eléctrica para lograr una fuente de calor rápida. También se controló la temperatura del medio.

- 20 Se añadió diferente volumen (uno, 1 ml (V); doble, 2 ml (2V); y triple, 3 mL (3V)) de AgNP o AgNP_AK) en cada placa de pocillos. Para el control se usaron 2 ml de TSB.

- Primero, se atemperó 30 min a 37 °C la placa de 12 pocillos que contenía diferentes volúmenes de medio/nanopartículas NP. La placa se dispuso en un baño de arena atemperado a 75 °C y a través de dos electrodos, se probó una baja corriente eléctrica (1-10 mA) hasta que la temperatura alcanzó 40 °C. Entonces se transfirió la placa a otro baño de arena (baño de arena atemperado a 43 °C), manteniendo así la temperatura de la placa a 40 °C durante un periodo de tiempo. Fueron necesarios 10 mA y 1:30 minutos para alcanzar 40-41 °C en cada placa de pocillos en el primer baño de arena y, cuando la placa se puso en el otro baño de arena, mantuvo los 40 °C del medio durante 4 min.

Aplicación:

- 30 vii.iii.i) Disparo térmico: Hipertermia por corriente eléctrica continua de bajo amperaje más baño de arena con AgNP en crecimiento planctónico.

Se evaluó la eficacia de AgNP conjugadas con amikacina sobre planctónicos usando hipertermia por corriente eléctrica continua de bajo amperaje más baño de arena para la aplicación de disparo térmico en una *P. aeruginosa* XDR (Pa1016), *A. baumannii* XDR (Ab14) y en una *K. pneumoniae* XDR (Kp1).

- 35 En una placa de 12 pocillos se añadió al mismo tiempo 1 ml de inóculo (preparado con TSB para alcanzar la concentración final de $1,0 \times 10^8$ ufc/ml) más 1 ml de AK solo, AgNP o AgNP_AK (volumen final de 2 ml). La placa se incubó a 37 °C durante 30 min (mientras que el medio del pocillo se atemperó a 37 °C), después de eso, la placa se dispuso en el primer baño de arena atemperado (a 75 °C), y se aplicaron 10 mA de corriente eléctrica durante 1:30 min en cada pocillo (corriente eléctrica y tiempo normalizado para alcanzar 40 °C en el medio (véase el párrafo vii.iii)). Entonces se transfirió la placa a un segundo baño de arena (atemperado a 60 °C) durante 4 min; tiempo que se mantuvo la temperatura a 40 °C.

- 40 Se evaluaron cuatro placas; una estaba solo a 37 °C, otra solo con aplicación de corriente eléctrica, otra solo en el baño de arena y la última con aplicación de corriente eléctrica en el baño de arena. Se aplicó corriente eléctrica en diferentes momentos de tiempo (T); T 1 h, T 2 h y T 3 h. Después del golpe de calor, se retiró una alícuota de las cuatro placas para determinar las células viables y entonces las placas se pusieron a 37 °C mientras se esperaba el siguiente golpe de calor (el tiempo entre cada golpe de calor fue 30 min).

- 45 Se consideró que el tratamiento tenía una actividad bactericida positiva cuando se alcanzó una reducción de $\geq 3 \log_{10}$ en los inóculos iniciales.

vii.iii.ii) Disparo térmico: Hipertermia por corriente eléctrica continua de bajo amperaje más baño de arena con AgNP en crecimiento en biopelícula.

- 50 Se evaluó la eficacia de AgNP conjugadas con amikacina sobre discos de biopelículas de silicona usando hipertermia por corriente eléctrica continua de bajo amperaje más baño de arena para la aplicación de disparos térmicos en una cepa productora de biopelículas de referencia (PAO1).

- 55 Para el experimento de los discos de silicona, se siguió el protocolo descrito por Chandra et al. "In vitro growth and analysis of Candida biofilms" con algunas pequeñas modificaciones. Las bacterias se cultivaron durante la noche en TSB a 37 °C. Los cultivos se centrifugaron, se lavaron dos veces con disolución de tampón fosfato estéril (PBS) y luego se resuspendieron hasta una concentración final de 0,5 McFarland para ajustar a la concentración final de $1,0 \times 10^7$ ufc/ml. En cada pocillo de la placa de 12 pocillos se dispusieron 4 ml de inóculo y se añadieron discos de silicona. Después de 90 min a 37 °C de incubación (etapa de adhesión), se transfirieron los discos a una nueva placa de 12 pocillos con 4 ml de TSB fresco y entonces las placas se incubaron otra vez 24 a 37 °C y se agitaron a 60 rpm para el crecimiento de biopelículas.

- 60 Se transfirieron los discos de silicona a una nueva placa de 12 pocillos con tratamiento (volumen final de 4 ml) 4: Amikacina, AgNP o AgNP_AK (3V). Se usó TSB para alcanzar 4 ml en todos los pocillos. Entonces se dispuso la placa en un baño de arena atemperado a 75 °C y se aplicó la corriente eléctrica (10 mA) durante 1:30 min. Después se transfirió la placa a un segundo baño de arena durante 4 min. Este proceso se repite hasta tres cada 30 min, entre choques térmicos, las placas estuvieron a 37 °C.

65

Finalmente, después de los tres disparos de calor y después de 24 horas, los discos se transfirieron a una nueva placa con 4 ml de TSB y se rasparon los discos. Se contaron recuentos de colonias después de 24 h a 37 °C.

vii.iv) Disparo térmico: Hipertermia por corriente eléctrica continua de bajo amperaje más electrólisis con AuNP.

Se evaluó la eficacia del disparo térmico por electrólisis con nanopartículas de oro (AuNP) para realizar en células planctónicas en la cepa Kp3. Este experimento se realizó para evaluar el efecto de electrólisis antimicrobiana con AuNP de activación en solución salina.

En una placa de 12 pocillos se ajustaron $5 \cdot 10^5$ ufc/ml con NSS (0,9 % de NaCl) y se añadió 1 mL de AuNP. Se usó NSS como control. El volumen final en cada placa de pocillos fue 4 ml. Antes de la corriente eléctrica, la placa se atemperó 30 min a 37 °C. Los ensayos realizados fueron a 2 mA durante 1 min, 3 veces en cada placa de pocillos con el retraso de tiempo 30 min entre disparos. Se probaron las mismas condiciones sin corriente eléctrica.

RESULTADOS

15 ii) Síntesis y caracterización de nanopartículas de plata y conjugación con amikacina

El tamaño de las nanopartículas NP usando el método de crecimiento de semillas empezó a 10 nm, y aumentó hasta 20 nm mediante las etapas de crecimiento. Por medio del espectro de UV-Vis de 300-800 nm se observó que la AgNP tenía una longitud de onda inicial alrededor de 400 nm y aumentó ligeramente cuando aumentó el tamaño.

20 Las nanopartículas de control, que solo se conjugaron con mPEG (AgNP_mPEG), tuvieron un mayor tamaño de aproximadamente 25 nm.

25 Las nanopartículas conjugadas con amikacina (AgNP_AK) fueron mayores de 25 nm. Se observó una absorbancia máxima de 409 nm en el intervalo del espectro de UV-Vis de 300-800 nm. El potencial Z presentó un valor de -46,6mV.

iii) Síntesis y caracterización de nanopartículas de oro y conjugación con antibióticos

30 El tamaño de las nanopartículas NP usando el método de crecimiento de semillas empezó a 3,5 nm, y aumentó hasta 20 nm mediante las etapas de crecimiento. Por medio del espectro de UV-Vis de 300-800 nm se observó que la AuNP tenía una longitud de onda inicial alrededor de 500 nm y aumentó ligeramente cuando aumentó el tamaño.

35 Las nanopartículas de control, que solo se conjugaron con mPEG (AuNP_mPEG), tuvieron un mayor tamaño de aproximadamente 5 nm. El espectro de UV-Vis mostró una longitud de onda de 522 nm, así como el potencial Z con un valor de -43,1 mV.

40 AuNP_AK tuvo un gran tamaño, y se observó el intervalo del espectro de UV-Vis de 300-800 nm con una absorbancia máxima de 523 nm. El potencial Z fue -46,6mV. Con respecto a las características de AuNP_colistina, tuvo un gran tamaño, y se observó el intervalo del espectro de UV-Vis de 300-800 nm con una absorbancia máxima de 523 nm. El potencial Z fue -29 mV.

v) Estudios de susceptibilidad

45 En la Tabla 4 se muestran los resultados de estudios de susceptibilidad a MIC. La MIC de amikacina disminuyó más de 3 concentraciones cuando la nanopartícula NP se conjuga con amikacina (AgNP_AK) en una cepa XDR de *P. aeruginosa* (Pa46) y en *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA 15 y MRSA 16). Las otras cepas disminuyeron una o más concentraciones frente a la amikacina sola. La AgNP_colistina obtuvo la misma MIC de colistina sola en todas las cepas, con excepción de las cepas de *S. epidermidis* (SE14 y SE94), que disminuyeron más de 3 concentraciones con respecto a la colistina sola. Las nanopartículas NP sin antibiótico (amikacina o colistina) no fueron capaces de 50 inhibir el crecimiento bacteriano (con excepción de cepas de *S. epidermidis*, que se redujo 3 concentraciones).

Tabla 4. Determinación *in vitro* de las MIC en diferentes cepas clínicas usando el método de dilución del caldo. Nanopartículas de plata conjugadas con amikacina (AgNP_AK).

	MIC (mg/l)				
	Amikacina	AgNP_AK	Colistina	AgNP_Coli	AgNP
Pa46	8	0,25	0,5-1	0,25-0,5	>128
Pa1016	0,5	0,25	0,5-1	0,25-0,5	>128
Kp1	2	0,25-0,5	1	0,25-0,5	>128
Kp4	1-2	0,25	0,125-0,25	0,25-0,5	>128
Abl4	1	0,5	1	0,5	>128
Ab4256	8	0,5	0,25	0,25-0,5	>128
MRSA15	8-16	0,5	>128	>128	>128
MRSA16	8-16	0,5	128->128	>128	>128
SE14	1-2	0,25-0,5	32-64	0,06-0,125	32
SE94	1	0,125	32	0,125	32

MIC (mg/l)				
Amikacina	AgNP AK	Colistina	AgNP Coli	AgNP
MIC, concentración mínima inhibidora; Pa, <i>P. aeruginosa</i> ; Kp, <i>K. pneumoniae</i> ; Ab, <i>A. baumannii</i> ; MRSA, <i>S. aureus</i> resistente a metilicina; SE, <i>S. epidermidis</i> .				

vi) Ensayo de la curva tiempo-destrucción

El ensayo de la curva de tiempo-destrucción (Fig. 3) mostró un efecto bactericida para el clon de alto riesgo (ST175) 5
diseminado en hospitales españoles (Pa1016) y se trataron cepas de *K. pneumoniae* con AgNP_AK en un volumen y
volumen doble a las 4, 8 y 24 h. Estas cepas también disminuyeron más de 2 logaritmos en recuentos variables con
respecto a los otros tratamientos. Ninguna de las dos cepas clínicas de *A. baumannii* probadas proporcionó un
resultado favorable en ningún momento con la nanopartícula a diferentes volúmenes. Las nanopartículas libres de
fármaco (AgNP) no tuvieron ningún efecto en ninguna de las cepas, incluso a uno o dos volúmenes.

10

vii) Aplicación de disparos térmicos

vii.i) Disparo térmico: Hipertermia por fototerapia (light) con AgNP

15 Se evaluó la eficacia de AgNP conjugada con amikacina sobre planctónicos usando hipertermia por fototerapia (luz)
para la aplicación de disparos térmicos en un clon de alto riesgo (ST175) de *P. aeruginosa* (Pa1016) (Fig. 4). A T 1,5
h, se observó una fuerte disminución de \log_{10} ufc/ml de bacterias viables de tratamientos con AgNP_AK y ambos
tratamientos tuvieron un efecto bactericida, sin embargo, AgNP_AK con fototerapia, alcanzó más rápido un cultivo
negativo en comparación con AgNP_AK.

20

Los otros grupos (con o sin fototerapia) no disminuyeron el recuento bacteriano frente al control de crecimiento.

vii.ii) Disparo térmico: Hipertermia por calor con AgNP

25 Se evaluó la eficacia de AgNP conjugadas con amikacina sobre planctónicos usando hipertermia por calor para la
aplicación de disparos térmicos en un clon de alto riesgo (ST175) de *P. aeruginosa* (Pa1016) (Fig. 5). A T 1,5 h, se
observó una fuerte disminución de \log_{10} ufc/ml de bacterias viables de tratamientos con AgNP y AgNP_AK usando
hipertermia y ambos tratamientos tuvieron un efecto bactericida, sin embargo, AgNP_AK con calor, erradicó los
recuentos bacterianos hasta 24 h, mientras que el recrecimiento de AgNP entre el 3º golpe calor y las 24 h.

30

vii.iii) Disparo térmico: Hipertermia por corriente eléctrica continua de bajo amperaje más baño de arena con AgNP

vii.iii.i) Disparo térmico: Hipertermia por corriente eléctrica continua de bajo amperaje más baño de arena con AgNP
en crecimiento planctónico.

35

Se evaluó la eficacia de AgNP conjugadas con amikacina sobre planctónicos usando hipertermia por corriente eléctrica
continua de bajo amperaje más baño de arena en una cepa de *P. aeruginosa* XDR (Pa 1016), *A. baumannii* XDR
(Abl4) y *K. pneumoniae* XDR (Kp1) (Fig. 6). En Pa1016 y Kp1, se necesitaron dos choques térmicos para negativizar
el recuento bacteriano (mantenido a 24 h), y en Abl4, con el primer choque térmico el recuento bacteriano fue negativo.

40

En las placas de control con solo a 37 °C, solo cebo de arena y, solo corriente eléctrica, no se observaron diferencias
entre moléculas y el efecto de los diferentes grupos.

vii.iii.ii) Disparo térmico: Hipertermia por corriente eléctrica continua de bajo amperaje más baño de arena con AgNP
en crecimiento en biopelícula.

45

Se evaluó la eficacia de AgNP conjugadas con amikacina sobre discos de biopelículas de silicona usando hipertermia
por corriente eléctrica continua de bajo amperaje más baño de arena para la aplicación de disparos térmicos en una
cepa productora de biopelículas de referencia (PAO1) (Fig. 7). Los primeros 18 representaron la placa sin choque
térmico (es la placa de control atemperada a 37 °C), no hubo diferencias entre las moléculas y el efecto de los grupos
diferentes. Sin embargo, los mismos tratamientos en la placa aplicando corriente eléctrica más baño de arena lograron
cultivos negativos a las 8 h y los mantuvieron durante 24h.

50

vii.iv) Disparo térmico: Hipertermia por corriente eléctrica continua de bajo amperaje más electrólisis con AuNP.

55 Se evaluó la eficacia de AgNP conjugadas con amikacina sobre discos de biopelículas de silicona usando hipertermia
por corriente eléctrica continua de bajo amperaje más electrólisis la aplicación de disparos térmicos en la cepa Kp3
(Fig. 8). AuNP con NSS y aplicando una corriente eléctrica de 2 mA durante 1 min, fue capaz de lograr cultivos
negativos después de la primera corriente eléctrica, y se mantuvo durante las siguientes 24 h.

60 Mientras que la descripción anteriormente descrita de la invención permite que un experto en la técnica haga y use lo
que se considera actualmente que es el mejor modo del mismo, aquellos expertos habituales entenderán y apreciarán

la existencia de variaciones, combinaciones y equivalentes de la realización específica, método y ejemplos en el presente documento.

El alcance de protección de la presente invención se define en el siguiente conjunto de las reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Un sistema para el tratamiento por termoterapia o la prevención de infecciones resistentes a antimicrobianos o por biopelículas, comprendiendo el sistema:
 - 5 - un soporte configurado para recibir un ensamblaje de nanopartículas (NPA) y configurado para ser transportado hacia un área localizada de un organismo infectado o en riesgo de infectarse por microorganismos;
 - dicho ensamblaje de nanopartículas (NPA) que comprende una pluralidad de nanopartículas (NP), teniendo cada una (NP) un núcleo de plata y una superficie que rodea dicho núcleo de plata, en donde el núcleo de plata puede reaccionar con energía térmica; y en donde las nanopartículas tienen fijadas sobre la superficie al menos el agente antimicrobiano amikacina y en donde la superficie de cada nanopartícula (NP) comprende una cubierta de mPEG;
 - 10 - una unidad de energía (15) configurada para aplicar al menos un disparo térmico sobre dicha área localizada expuesta al ensamblaje de nanopartículas, aumentando la temperatura de dicha área localizada hasta un valor dado por el ensamblaje de nanopartículas (NPA), permitiendo así una terapia antimicrobiana multimodal nanoteranóstica.
2. El sistema, según la reivindicación 1, que comprende además una unidad de control configurada para controlar que dicho aumento de temperatura del área localizada después del al menos un disparo térmico aplicado no supere 40 °C.
- 20 3. El sistema, según la reivindicación 1, en donde dicho disparo térmico comprende uno de energía de infrarrojos cercano, energía de ultrasonidos pulsada de baja intensidad, energía de ultrasonidos baja, fototerapia, calentamiento eléctrico de baja tensión, calentamiento eléctrico de baja tensión con electrólisis o radioterapia.
4. El sistema, según la reivindicación 1, en donde el soporte incluye al menos uno de una malla, un catéter vascular o urinario, un hidrogel, una prótesis, una prótesis endovascular, suturas, un hilo, un alambre, electrodos o un tubo endotraqueal.
- 25 5. Un material compuesto que comprende un ensamblaje de nanopartículas que comprende una pluralidad de nanopartículas que tiene cada una un núcleo de plata y una superficie que rodea dicho núcleo de plata, en donde el núcleo de plata puede reaccionar con energía térmica; y en donde las nanopartículas tienen fijada sobre la superficie al menos el agente antimicrobiano amikacina y en donde la superficie de cada nanopartícula (NP) comprende una cubierta de mPEG, para su uso en un método para el tratamiento por termoterapia o la prevención de infecciones resistentes a antimicrobianos o por biopelículas.
- 30 6. El material compuesto para su uso, según la reivindicación 5, en donde el método para el tratamiento por termoterapia o la prevención de infecciones resistentes a antimicrobianos o por biopelículas comprende:
 - transportar un soporte hacia un área localizada de un organismo infectado o en riesgo de infectarse por microorganismos, incluyendo dicho soporte el material compuesto de la reivindicación 5, y
 - 40 - aplicar, por una unidad de energía, al menos un disparo térmico sobre dicha área localizada expuesta al ensamblaje de nanopartículas, aumentando la temperatura de dicha área localizada hasta un valor dado por el ensamblaje de nanopartículas, permitiendo así una terapia antimicrobiana multimodal nanoteranóstica.
7. El material compuesto para su uso, según la reivindicación 6, en donde se controla dicho aumento de temperatura del área localizada después de aplicar el disparo térmico para que no supere 40 °C.
- 45 8. El material compuesto para su uso, según la reivindicación 6, en donde dicho disparo térmico se repite después de un periodo de tiempo de una duración predeterminada dependiendo de la actividad de la infección que se va a tratar, que se mantiene bajo control para la detección del crecimiento microbiano.
- 50 9. El material compuesto para su uso, según la reivindicación 8, en donde dicha duración predeterminada comprende entre 15 minutos y 8 horas.
10. El material compuesto para su uso, según la reivindicación 6, en donde dicho disparo térmico comprende uno de energía de infrarrojo cercano, energía de ultrasonidos pulsada de baja intensidad, energía de ultrasonidos baja, fototerapia, calentamiento eléctrico de baja tensión, calentamiento eléctrico de baja tensión con electrólisis o radioterapia.
- 55 11. El material compuesto para su uso, según la reivindicación 6, en donde el soporte incluye al menos uno de una malla, un catéter vascular o urinario, un hidrogel, una prótesis, una prótesis endovascular, suturas, un hilo, un alambre, electrodos o un tubo endotraqueal.
- 60 12. El material compuesto para su uso, según la reivindicación 6, que comprende además incluir diferentes agentes antimicrobacterianos que incluyen capreomicina, clofazimina, etambutol, etionamida, isoniazida, kanamicina, ácido para-aminosalicílico, pirazinamida, rifabutina, rifampentina o estreptomycinina al ensamblaje de nanopartículas.
- 65

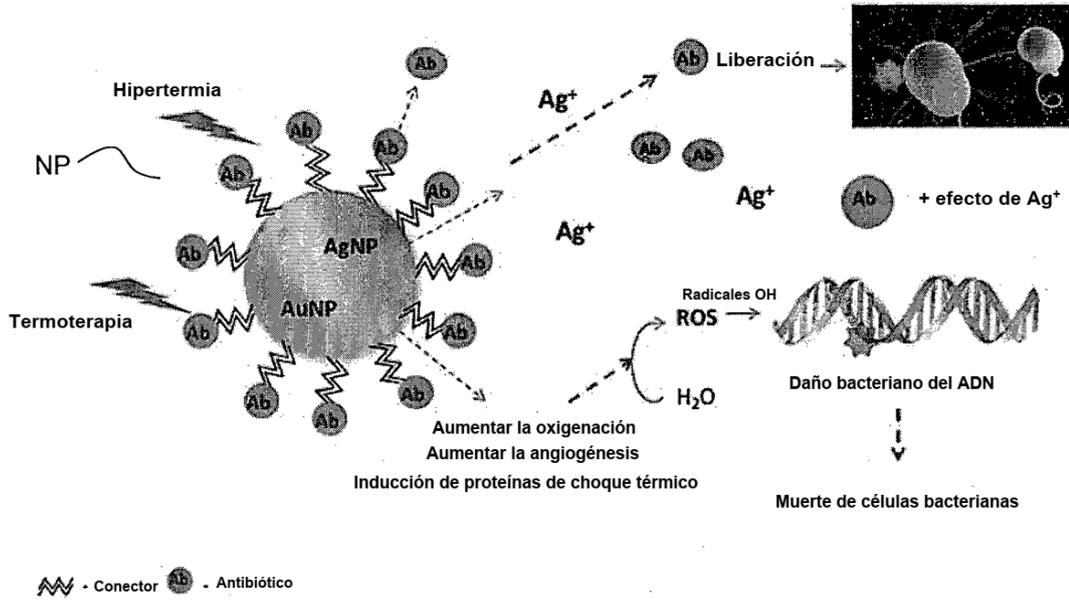


Fig. 1

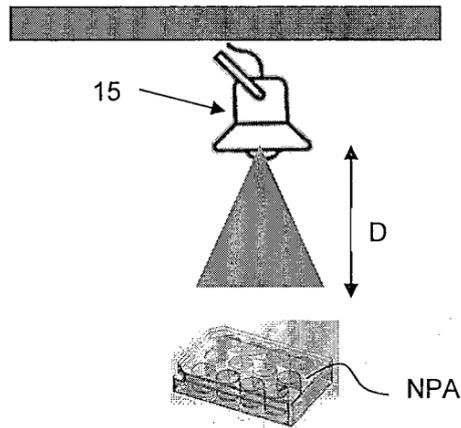


Fig. 2

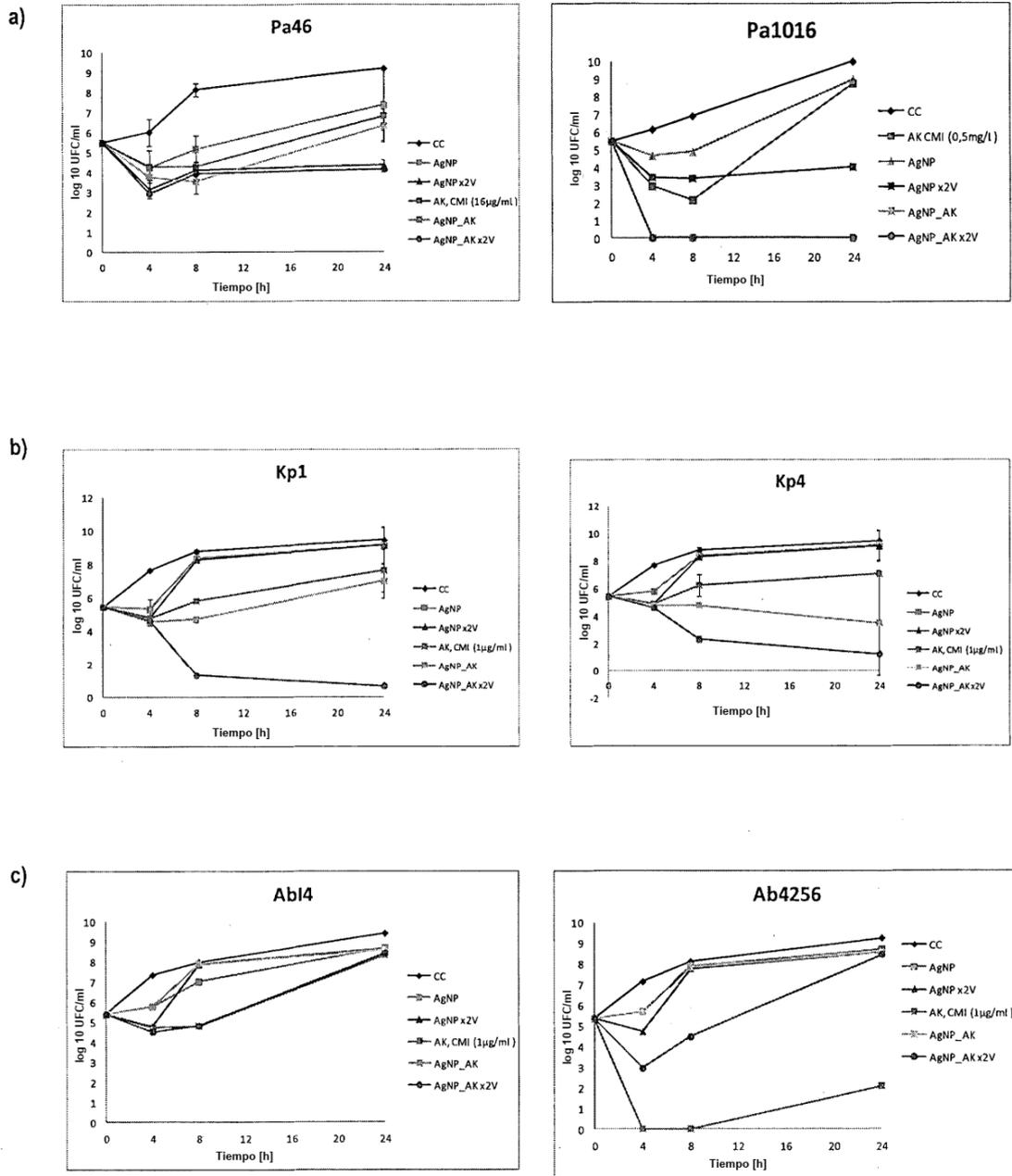


Fig. 3

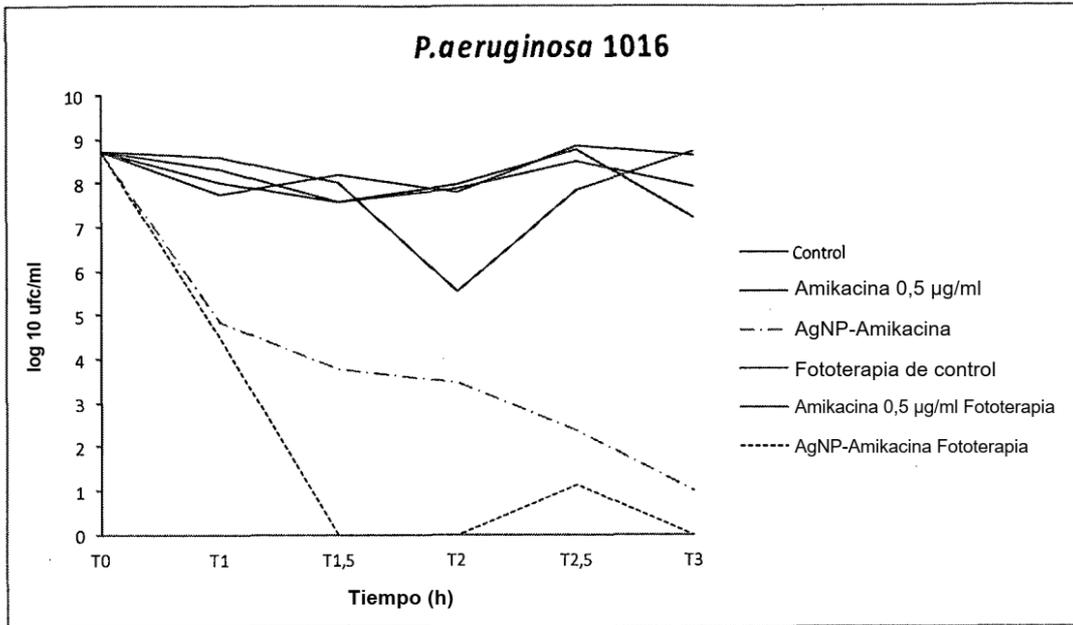


Fig. 4

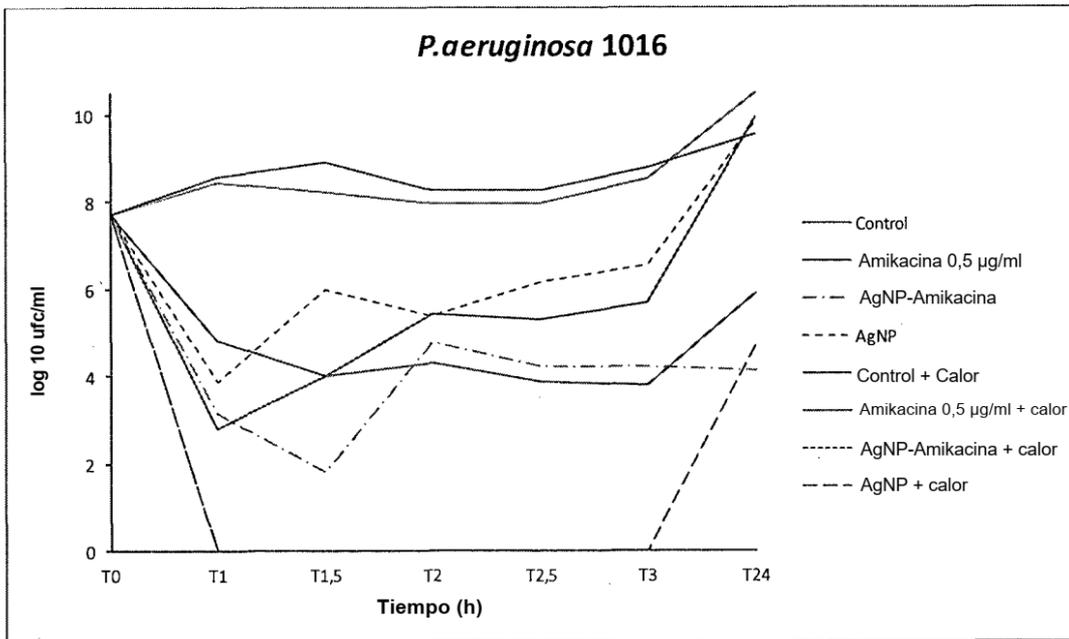
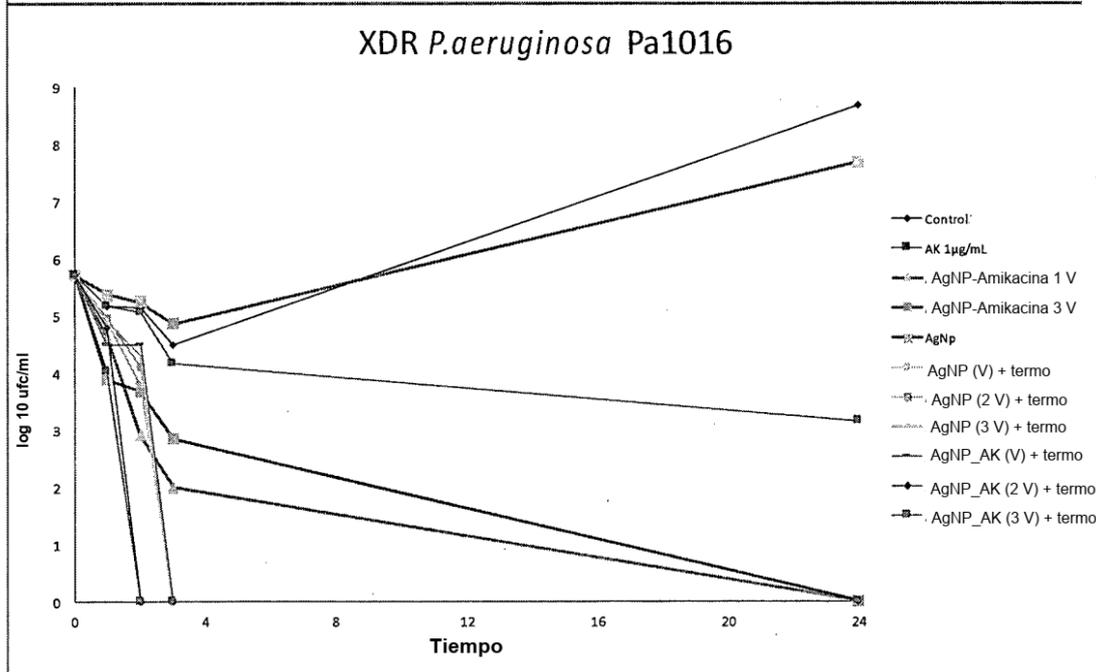
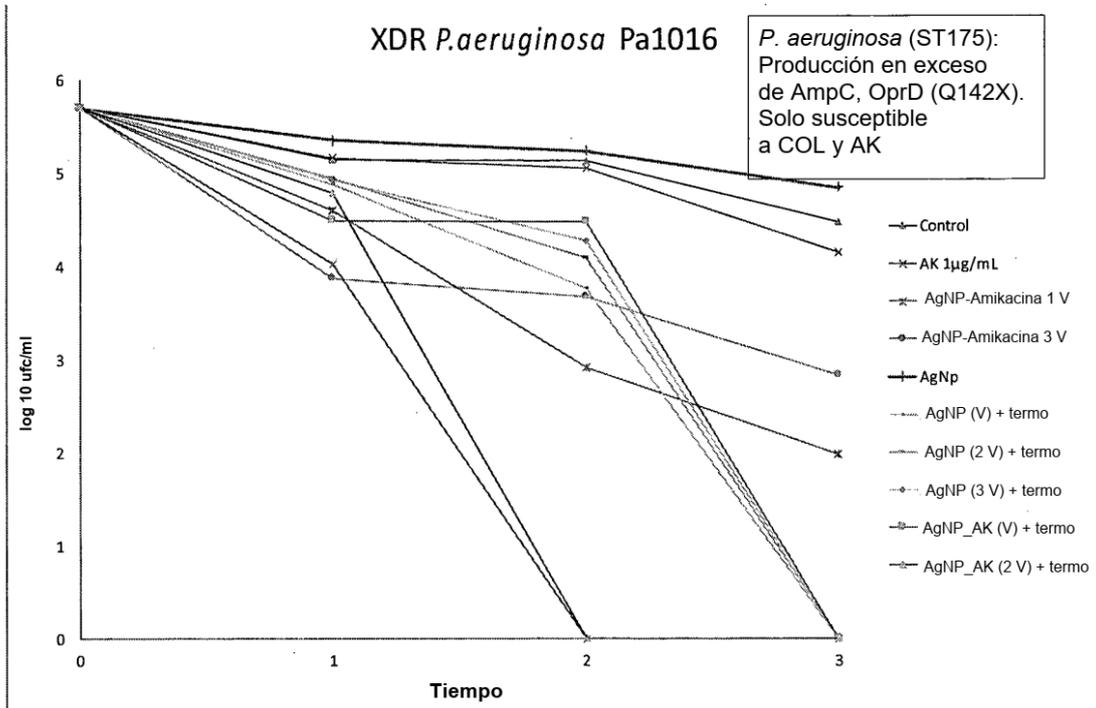
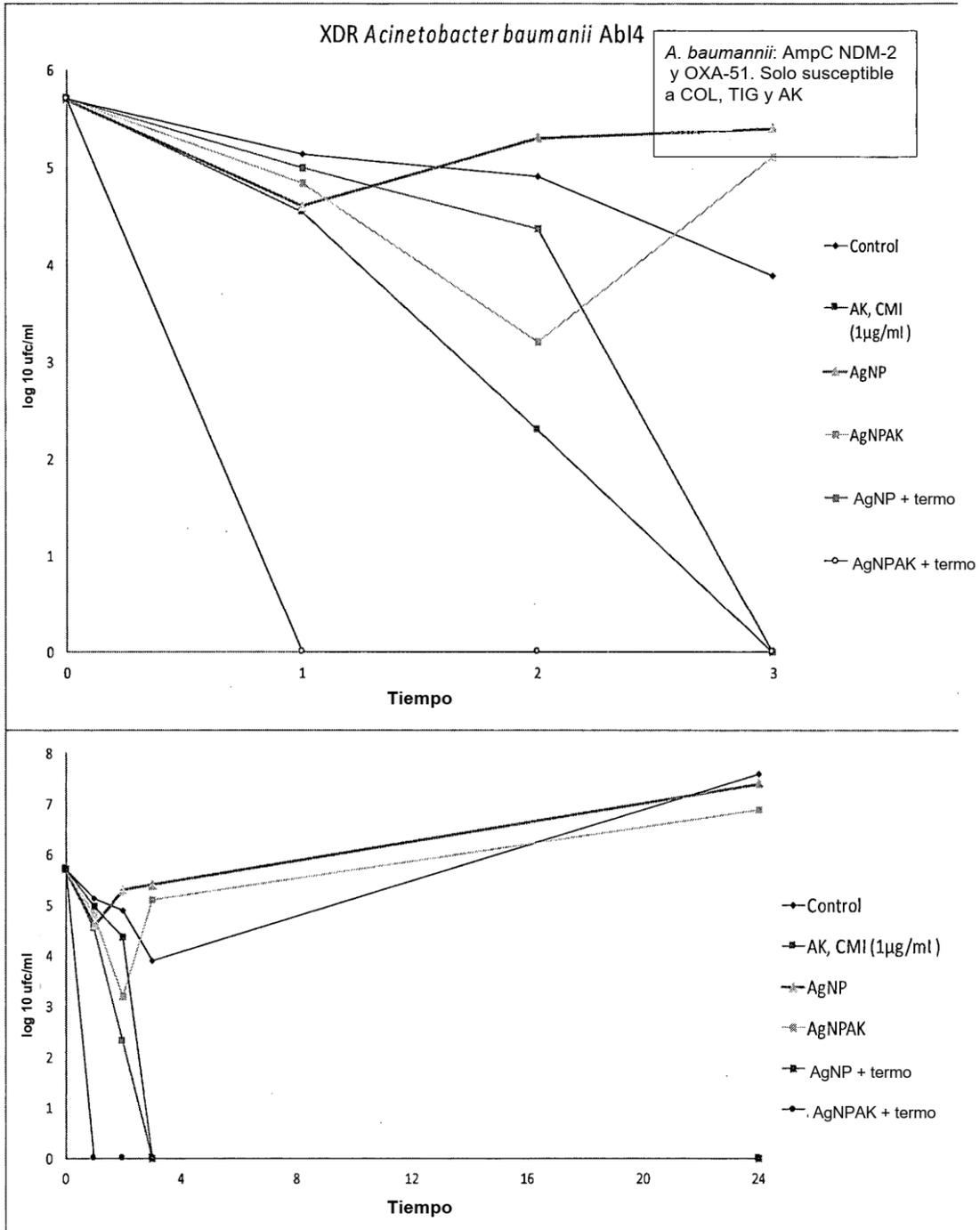


Fig. 5

a)



b)



c)

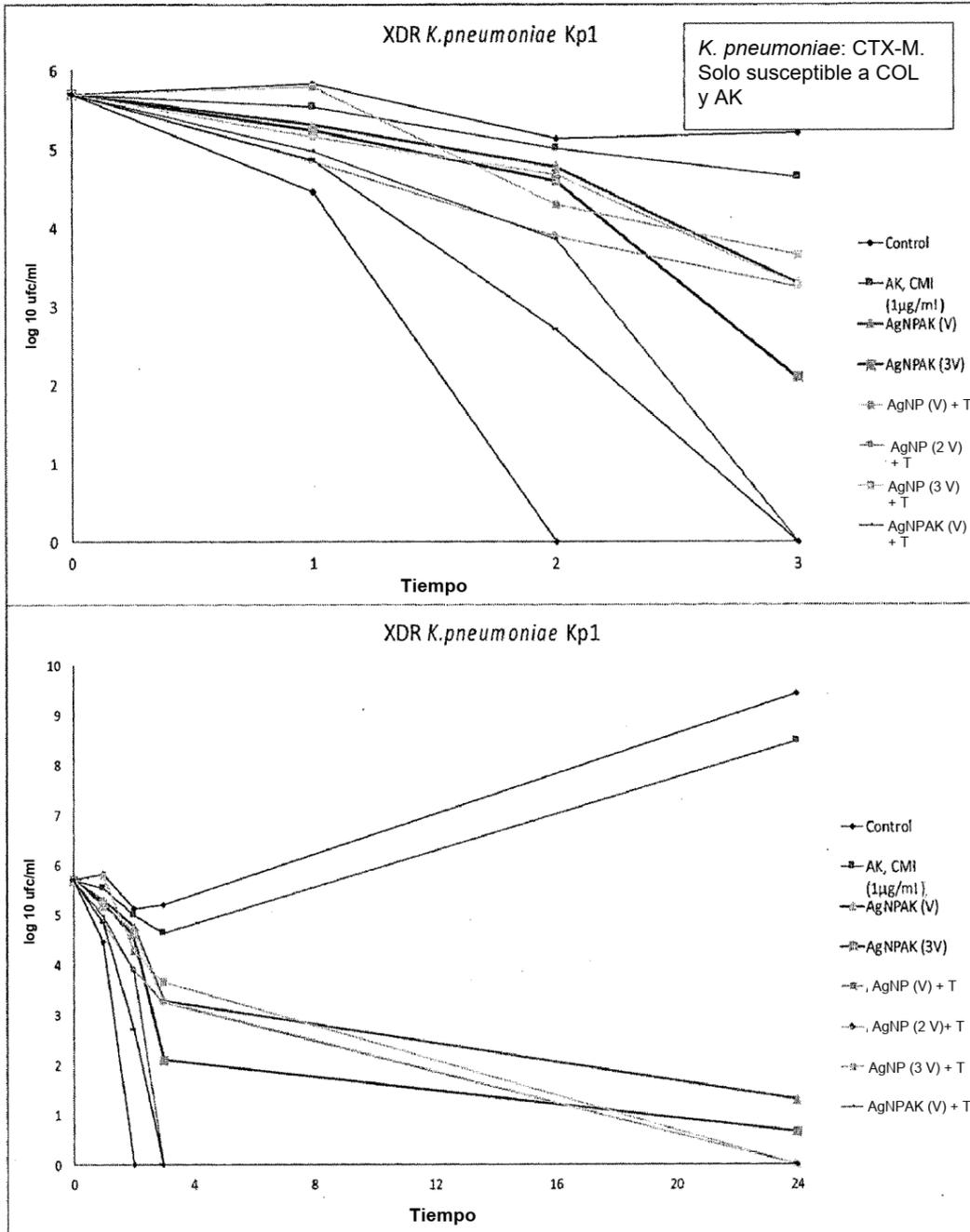
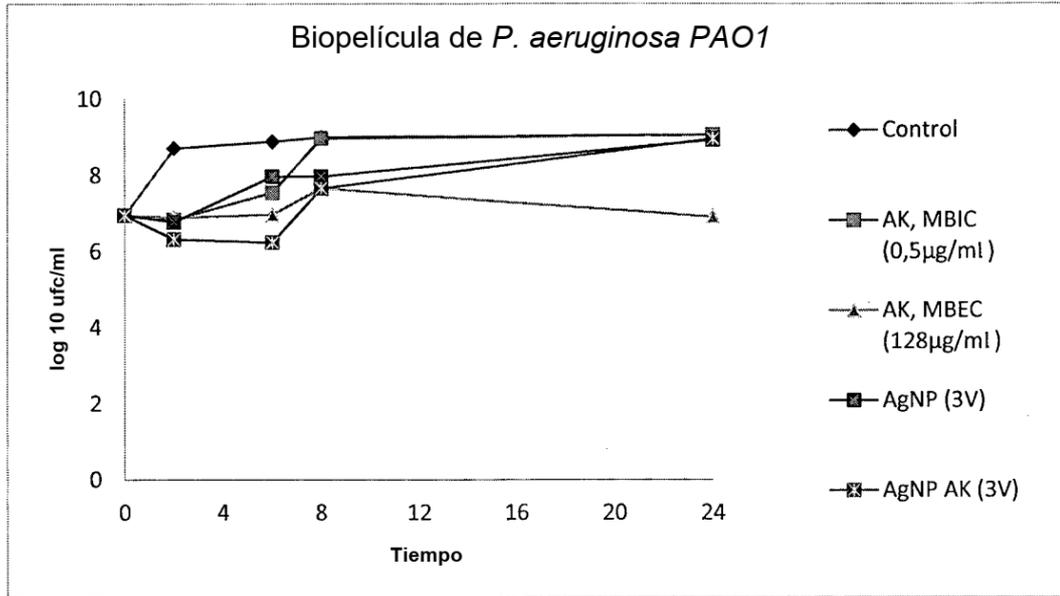


Fig. 6

a)



b)

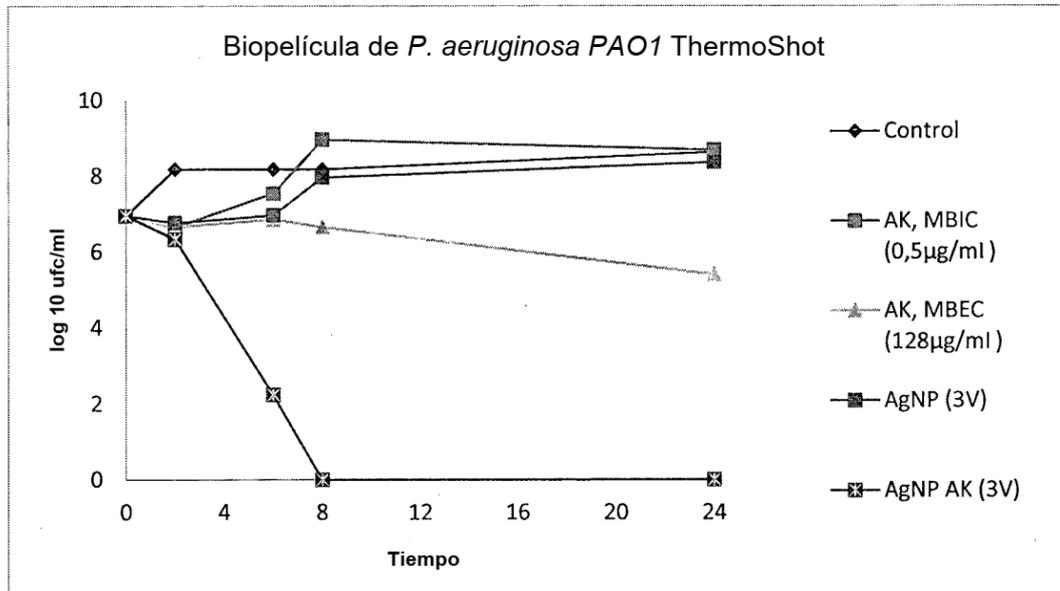


Fig. 7

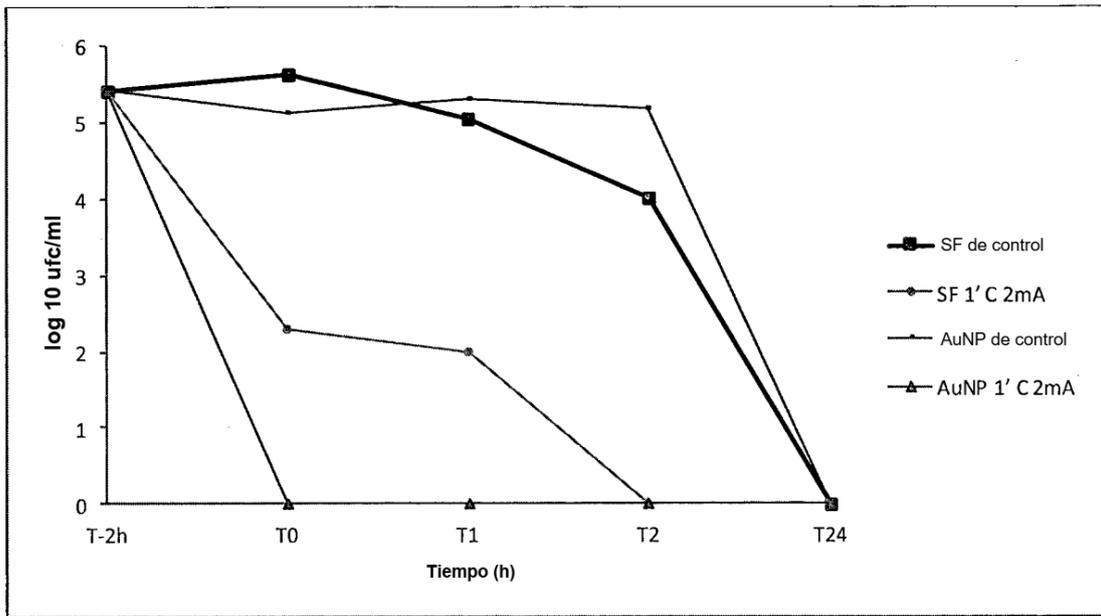


Fig. 8

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

Esta lista de referencias citadas por el solicitante es únicamente para la comodidad del lector. No forma parte del documento de la patente europea. A pesar del cuidado tenido en la recopilación de las referencias, no se pueden 5 excluir errores u omisiones y la EPO niega toda responsabilidad en este sentido.

Documentos de patentes citados en la descripción

- 10 • WO 2015148726 A1 [0012] • US 2009181101 A1 [0014]
• WO 2017025104 A1 [0013]

Literatura diferente de patentes citada en la descripción

- 15 • Pillai Sea. Antimicrobial combinations. Antibiotics in • **CHANDRA et al.** In vitro growth and analysis of
laboratory medicine. Lippincott Williams, 2005, Candida biofilms {0052}
365-440 [0052]

20