

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 881 149**

21 Número de solicitud: 202030487

51 Int. Cl.:

G01N 33/483 (2006.01)

G01N 30/00 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

26.05.2020

43 Fecha de publicación de la solicitud:

26.11.2021

71 Solicitantes:

**UNIVERSIDAD DE ALICANTE (50.0%)
Carretera San Vicente del Raspeig s/n
03690 San Vicente del Raspeig (Alicante) ES y
FUNDACIÓN DE LA COMUNITAT VALENCIANA
PARA LA GESTIÓN DEL INSTITUTO DE
INVESTIGACIÓN SANITARIA Y BIOMÉDICA DE
ALICANTE (ISABIAL) (50.0%)**

72 Inventor/es:

**ALUSTIZA FERNÁNDEZ, Miren;
JOVER MARTÍNEZ, Rodrigo;
VIDAL MARTÍNEZ, Lorena y
CANALS HERNÁNDEZ, Antonio**

74 Agente/Representante:

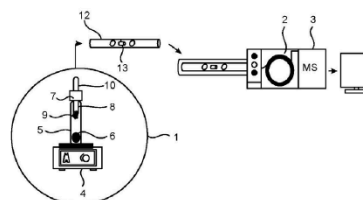
ISERN JARA, Nuria

54 Título: **Aparatos y métodos para el diagnóstico de cáncer colorrectal**

57 Resumen:

La presente invención está relacionada con un aparato de extracción y análisis preciso, simple, sensible y eficaz de compuestos orgánicos volátiles (COVs) y de biomarcadores del cáncer colorrectal (CCR) en muestras sólidas y/o semisólidas, más concretamente en muestras de heces. Así mismo, la presente invención está relacionada con un método de diagnóstico y pronóstico de CCR ex vivo que comprende el análisis de COVs que son biomarcadores relacionados con el CCR en muestras de heces, mediante el uso de dicho aparato.

Fig 1



DESCRIPCIÓN

Aparatos y métodos para el diagnóstico de cáncer colorrectal

5 OBJETO DE LA INVENCION

La presente invención está relacionada con métodos de diagnóstico y prevención del cáncer colorrectal (CCR). Más concretamente, la invención se refiere a aparatos y métodos de extracción y análisis preciso, simple, sensible y eficaz de compuestos orgánicos volátiles
10 (COVs) para su aplicación como test de cribado no-invasivo del CCR.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El cáncer colorrectal es una de las principales causas de muerte por cáncer en todo el
15 mundo. Los métodos de detección de CCR que se utilizan actualmente pueden ser invasivos, como las colonoscopias, o no invasivos como el test de sangre oculta en heces (TSOH). Aunque estos test de cribado hayan ayudado a disminuir la mortalidad, su rendimiento no es óptimo. El TSOH presenta un número substancial de falsos negativos y como consecuencia un número importante de diagnósticos perdidos del CCR. Además, un
20 porcentaje significativo de los participantes sanos sometidos a cribado poblacional reciben un resultado de falso positivo, lo que a su vez conlleva un uso innecesario de colonoscopias. Las colonoscopias son una técnica invasiva, con riesgo de complicaciones (sangrado o perforación), así como un elevado coste.

25 Hoy en día existen dos tipos de técnicas centradas en el estudio de los compuestos orgánicos volátiles “volatoloma” para su futura aplicación en la detección del CCR; las técnicas analíticas y las tecnologías de reconocimiento de patrones. Las técnicas analíticas permiten detectar alteraciones en la presencia y concentración de moléculas específicas, mientras que las tecnologías de reconocimiento de patrones no son específicas, lo que
30 significa que no son selectivos a un compuesto dado, sino a un grupo de compuestos.

Una de las técnicas analíticas utilizadas para la detección de COVs usadas en estudios de búsqueda de biomarcadores en pacientes con CCR es la microextracción en fase sólida (SPME) seguida de cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS) o seguida
35 de tubo de selección de iones con flujo-espectrometría de Masas (SIFT-MS).

La técnica de microextracción en fase sólida (SPME), utiliza fibras para la detección de COVs. Las fibras actualmente utilizadas y comercializadas para SPME presentan ciertas desventajas; son frágiles, se rompen con facilidad; presentan una preferente absorción de materiales más pesados provocando un “desplazamiento”; inexistencia de buenos sorbentes para detectar materiales ligeros, y; tienen un coste elevado.

La determinación de COVs para la detección de CCR, otros cánceres e infecciones utilizando estas y otras técnicas analíticas ha sido divulgada en varias publicaciones y patentes.

La patente EP3210013 describe un sistema de diagnóstico del CCR mediante la detección de COVs, tales como benceno o tolueno en muestras de heces en forma gaseosa y mediante el uso de un conjunto de sensores de diferentes óxidos metálicos. Este tipo de sensores determinan perfiles de COVs específicos de pacientes para compararlos con un perfil de COVs de referencia y poder confirmar la presencia de CCR en el paciente. El método aquí descrito presenta la desventaja en tanto a que una combinación de diferentes sensores es necesaria para reaccionar e identificar las diferentes COVs y para poder así obtener un diagnóstico o pronóstico fiable.

Shusuke Toden et al. *Nutrition and cancer*, 51(1), 45–51, 27 Jan 2010, divulgaron la implicación de compuestos tales como, fenol y p-cresol, en carcinogénesis colorrectal. La concentración de dichos compuestos, medida por cromatografía líquida de alta resolución, aparecía elevada en heces y en orina, en sujetos que consumían una dieta alta en proteína animal, lo que les llevo a concluir que un alto nivel de p-cresol fecal en humanos podía estar relacionado con un incremento del riesgo de padecer cáncer de colon.

Con posterioridad, Patel et al. *Plos ONE*, 14 (4), 1-15, 15 April 2019, estudiaron un grupo de biomarcadores volátiles fecales y su uso en el diagnóstico de *clostridium difficile*. Entre los marcadores relacionados con *clostridium difficile* que se identificaron en muestras de heces, se incluyen COVs tales como el p-cresol y el indol. La detección de los COVs se llevó a cabo mediante el método TD-GC-ToFMS (desorción térmica seguida de cromatografía de gases y de espectroscopia de masas). Las muestras de heces se depositaron en el aparato de desorción térmica (TD), en viales abiertos dentro de botellas de 100 ml de tamaño, sin presencia de sorbentes. La extracción de los COVs de la muestra se produjo mediante el

uso de una corriente de aire, que arrastró los COVs hasta un tubo de desorción térmica. Sin embargo, los resultados obtenidos a partir de esta técnica y aparato no proporcionaron una especificidad adecuada, ya que muchos de los COVs, particularmente el p-cresol y también en el caso del indol, fueron detectados en las muestras de control, tales como en las
5 muestras de aire de laboratorio (IAQ), en las muestras con la botella vacía y/o en las muestras estándar. De todas las muestras control ninguna contenía la presencia de COVs. En el caso de las muestras de IAQ y en las de la botella vacía, estas ni siquiera contenían la presencia de ningún otro componente. Consecuentemente, el aparato y la metodología utilizada no fueron adecuados para identificación de COVs o biomarcadores de clostridium
10 difficile en muestras de heces, ni pudieron proporcionar un método con alta especificidad y sensibilidad adecuada.

Con posterioridad Harrisham Kaur et al. *Frontiers in microbiology*, Nov 2017, Volume 8, Article 2166, realizaron un estudio del microbioma intestinal de pacientes con CCR. El
15 estudio divulga la presencia de productos y subproductos generados por la putrefacción bacteriana, como los fenoles, p-cresol e 1H-indol analizados usando entre otros métodos secuenciado de ADN de microbioma. Dichos productos, serían inofensivos para el cuerpo humano cuando están presentes dentro de un cierto nivel; sin embargo, estos estarían implicados en la alteración de la homeostasis intestinal y también en la progresión tumoral
20 colorrectal, especialmente en individuos con un sistema inmunitario comprometido y exposición previa a infecciones/enfermedades intestinales. Esta observación, en combinación con los conocimientos obtenidos en Harrisham Kaur et al. (que indica la probabilidad de producción de los productos mencionados en cantidades más altas en pacientes con CCR) sugiere la posible implicación de las vías de putrefacción en la
25 patogénesis de la enfermedad. Asimismo, el análisis del microbioma intestinal de pacientes con CCR indicó una probable implicación de las vías de putrefacción seleccionadas en la etiología de la enfermedad de CCR.

Todas estas publicaciones proporcionaron estudios que relacionan determinados
30 biomarcadores, algunos de ellos COVs con la probabilidad de que un sujeto sufra de cáncer colorrectal a través de diferentes métodos, sin embargo, ninguna de ellas ha proporcionado hasta el momento un método, rápido, fiable, económico y con alta sensibilidad para detectar y cuantificar COVs que puedan ser útiles como biomarcadores y a la vez permita desarrollar un método de cribado que permita reducir o eliminar los falsos positivos y los falsos
35 negativos en la detección de CCR.

Por otro lado, Vidal et al. *Analytica Chimica Acta* 971 (2017) 40-47, divulgó el uso de un aparato de cromatografía de gases por desorción térmica y espectroscopia de masas, para la detección de COVs. El aparato divulgado se encuentra adaptado a sistema de extracción
5 en fase sólida magnética. El conjunto, se usó para evaluar su aplicabilidad en la identificación de compuestos orgánicos volátiles de clorobenceno en muestras líquidas acuosas. El aparato del artículo proporcionó buenas eficiencias de extracción que a su vez proporcionaban buenos valores de límite de detección (LOD); sin embargo, los resultados en la determinación de estos COVs variaron dependiendo del tipo de estructura y peso
10 molecular de compuesto volátil a determinar. El aparato y el método utilizado proporcionaron una sensibilidad diferente dependiendo del compuesto. Los compuestos de alto peso molecular proporcionaron una sensibilidad más baja mientras que los clorobencenos de bajo peso molecular mostraron menor eficiencia de extracción

15 Posteriormente, Dos Reis Cruz. L. et al. 2018 “Metodologías analíticas respetuosas con el medioambiente”, tesis doctoral de la Universidad de Alicante, divulgó metodologías analíticas para la determinación de microcontaminantes, tales como siloxanos, en muestras líquidas acuosas mediante la técnica de extracción en fase sólida magnética (MSPE) seguida de cromatografía líquida o cromatografía de gases. El aparato de extracción en fase
20 sólida magnética utilizado comprende una fase magnética compuesta por minerales de hierro, como magnetita (Fe_3O_4) y una fase extractante que comprende materiales de grafeno, entre ellos el nanocomposite magnético de óxido de grafeno (GO)/ Fe_3O_4 . El aparato de extracción en fase sólida magnética no dispone de un espacio de cabeza sobre la muestra.

25 El aparato de extracción en fase sólida magnética de Dos Reis Cruz. L. presenta las siguientes desventajas: la extracción no se hace directamente sobre la muestra, ya que inicialmente se realiza una etapa de tratamiento de la muestra y el proceso en general se realiza en varias etapas. Después de mezclar la muestra con el sorbente, la separación de
30 los COVs se realiza o bien por centrifugación o mediante un campo magnético externo, seguido de una posterior separación de fases manual, lo que supone una elevada manipulación que conlleva una pérdida de precisión y/o exactitud. Consecuentemente, el aparato no resultó ser adecuada para la extracción de COVs en muestras sólidas.

Por lo tanto, existe la necesidad de desarrollar aparatos y métodos de análisis de COVs con alta sensibilidad que puedan además cuantificar dichos COVs de muestras complejas como muestras sólidas, semisólidas o directamente de muestras de heces y que además sean rápidos, fiables, sensibles y económicos. Preferiblemente estos COVs son biomarcadores relacionados con el cribado y diagnóstico de CCR en sujetos. Sorprendentemente, los inventores de la presente invención han desarrollado un aparato adaptado para el análisis cualitativo y cuantitativo de COVs. De manera particular para el análisis de biomarcadores relacionados con el CCR en muestras sólidas y/o semisólidas (6), preferiblemente en muestras de heces. Así mismo han desarrollado un método de diagnóstico y pronóstico de CCR ex vivo que comprende el análisis de COVs que son biomarcadores relacionados con el CCR en muestras sólidas y/o semisólidas, preferiblemente en heces. Dicho método es no invasivo, rápido, fiable, económico, con alta sensibilidad y de uso en un rango de pacientes muy amplio, de modo que se puede también eliminar o reducir el número de falsos positivos y los falsos negativos.

15

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

El primer aspecto de la presente invención está relacionado con un aparato adaptado para el análisis cualitativo y cuantitativo de COVs en muestras sólida y/o semisólidas (6), dicho aparato comprende los siguientes elementos:

20

- a. un dispositivo de extracción magnética adsortiva de espacio de cabeza (1);
- b. un aparato de cromatografía de gases (2);
- c. un aparato de espectrometría de masas (3);

25

donde el dispositivo de extracción magnética adsortiva de espacio de cabeza (1) comprende un recipiente inerte (5) adecuado para depositar la muestra (6), donde el recipiente comprende:

30

- una tapa (7);
- un imán (8) situado en la parte inferior de la tapa, el cual comprende un sorbente magnético (9);
- un imán (10) situado en la parte superior de la tapa sobre el recipiente;

estando el dispositivo de extracción (1) configurado para acoplarse al aparato de cromatografía de gases (GC) (2) y al aparato de espectrometría de masas (3).

35

El aparato del primer aspecto de la invención también puede ser referido de forma indistinta como sistema del primer aspecto de la invención.

5 El aparato del primer aspecto permite extraer, identificar y cuantificar COVs de muestras sólidas y/o semisólidas (6), preferiblemente de heces. Específicamente, el aparato del primer aspecto permite extraer, identificar y cuantificar COVs que son conocidos como biomarcadores en sujetos que sufren de CCR, o en sujetos que están predispuestos a sufrir de CCR, para proporcionar un pronóstico de la condición del sujeto o para proporcionar un pronóstico negativo. Estos biomarcadores pueden ser seleccionados de la lista; P-cresol,
10 1H-indol, 3(4H)-dibenzofuranona o tetrahidrofolato. Hasta el momento la 3(4H)-dibenzofuranona, no había sido identificado como posible biomarcador relacionado con el CCR o como biomarcador en sujetos que sufren de CCR.

Por lo tanto, el aparato del primer aspecto permite un análisis de COVs fiable, reproducible,
15 y rápido en muestras sólidas y/o semisólidas (6). También permite un análisis de biomarcadores del CCR reproducible, con buena sensibilidad, rápido y de una manera fiable para el diagnóstico del cáncer colorrectal (CCR) en sujetos que sufran de cáncer, o para la predisposición al mismo, o proporciona un pronóstico negativo de la condición del sujeto. El aparato del primer aspecto puede ser usado en un método de diagnóstico ex vivo de cáncer
20 colorrectal (CCR) de manera rápida, eficaz, selectiva y no invasiva en número muy amplio de sujetos.

El segundo aspecto de la presente invención está relacionado con el uso del aparato del primer aspecto para extraer, identificar y cuantificar COVs en muestras sólidas y/o
25 semisólida (6), preferiblemente en heces. En una realización preferida, los COVs son biomarcadores relevantes para diagnosticar a un sujeto que sufre de CCR, o que esta predispuesto a sufrir de CCR, o para proporcionar un pronóstico de la condición del sujeto o un pronóstico negativo de la condición del sujeto. Los COVs pueden ser seleccionados de la lista; P-cresol, 1H-indol, 3(4H)-dibenzofuranona o tetrahidrofolato.

30

El tercer aspecto de la presente invención está relacionado con el uso del aparato del primer aspecto en el diagnóstico y el pronóstico ex vivo de cáncer colorrectal (CCR) en un sujeto.

El cuarto aspecto de la presente invención está relacionado con un método ex vivo para
35 diagnosticar a un sujeto que sufre de cáncer colorrectal (también referido como CCR), o que

esta predispuesto a sufrir de CCR, o para proporcionar un pronóstico de la condición del sujeto, donde el método comprende las etapas:

- (I) Obtener una muestra corporal sólida y/o semisólida (6) del sujeto;
- 5 (II) Extraer por lo menos un COV comprendido en la muestra (6) e identificar y cuantificar la concentración de dicho COV con el aparato según el primer aspecto de la invención;
- (III) Comparar la concentración de por lo menos un COV con la concentración de
10 una referencia del compuesto característico en un individuo que no sufre de cáncer, donde el incremento o decremento de la concentración del biomarcador en comparación con la referencia, es indicativo que el sujeto está sufriendo de cáncer, o tiene una predisposición al mismo, o proporciona un pronóstico negativo de la condición del sujeto.

15 El método del cuarto aspecto se realiza in vitro y por lo tanto no es invasivo, ya que la muestra del paciente se ha obtenido previamente y en el momento de la ejecución del análisis de las etapas II) y III) no es necesaria la presencia del paciente. La recogida de una muestra sólidas y/o semisólida (6) y/o de muestras de heces puede ser realizada por el mismo paciente que, por ejemplo, pidiendo al médico, recibirá un contenedor, sin complicar
20 el procedimiento utilizado actualmente para las pruebas (TSOH). El dispositivo permite obtener los resultados de la prueba rápidamente.

Se entiende por diagnóstico el procedimiento por el cual se identifica una enfermedad, entidad nosológica, síndrome, o cualquier estado de salud o enfermedad. Se entiende por
25 pronóstico de la enfermedad a la predicción acerca de la evolución de un enfermo y del resultado final de la enfermedad.

Por lo tanto, el método del cuarto aspecto permite un análisis de COVs que son biomarcadores del CCR en muestras sólidas y/o semisólidas (6) de una manera fiable,
30 buena sensibilidad, reproducible, rápido y útil para disminuir el número de falsos negativos, para el diagnóstico del cáncer colorrectal (CCR) en un sujeto que sufra de cáncer, o para la predisposición al mismo, o proporciona un pronóstico de la condición del sujeto y/o de los biomarcadores del CCR o un pronóstico negativo de dicha condición.

El quinto aspecto de la invención esta relacionado con el COV, 3(4H)-dibenzofuranona, y su uso como biomarcador del CCR y/o como biomarcador en el pronóstico y diagnóstico del CCR.

- 5 El sexto aspecto de la invención está relacionado con el uso de 3(4H)-dibenzofuranona, en un método ex vivo para diagnosticar a un sujeto que sufre de CCR, o que esta predispuesto a sufrir de CCR o para proporcionar un pronóstico de la condición del sujeto

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

10

Figura 1.- Es una vista esquemática del aparato y del dispositivo de extracción magnética adsortiva de espacio de cabeza (1) del primer aspecto de la presente invención.

Figura 2.- Es un cromatograma de una muestra de heces de un sujeto sano frente a un sujeto enfermo o que sufre de CCR.

- 15 Figura 3.- Es un cromatograma de una muestra de heces de un sujeto sano frente a un sujeto enfermo o que sufre de CCR.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

- 20 El primer aspecto de la presente invención está relacionado con un aparato adaptado para el análisis cualitativo y cuantitativo de COVs en muestras sólidas y/o semisólidas (6), dicho aparato comprende los siguientes elementos:

- a. un dispositivo de extracción magnética adsortiva de espacio de cabeza (1);
b. un aparato de cromatografía de gases (2);
25 c. un aparato de espectrometría de masas (3);

donde el dispositivo de extracción magnética adsortiva de espacio de cabeza (1) comprende un recipiente inerte (5) adecuado para depositar la muestra (6), donde el recipiente comprende:

- 30 - una tapa (7);
- un imán (8) situado en la parte inferior de la tapa, el cual comprende un sorbente magnético (9);
- un imán (10) situado en la parte superior de la tapa sobre el recipiente;

estando el dispositivo de extracción magnética adsortiva de espacio de cabeza (1) configurado para acoplarse al aparato de cromatografía de gases (GC).

5 El dispositivo de extracción magnética adsortiva de espacio de cabeza, permite la volatilización de los COVs de una muestra, sometida a una temperatura determinada. Los compuestos volátiles en el espacio de cabeza son retenidos posteriormente en una trampa adsorbente, que a continuación se somete a desorción y se inyecta para su separación por cromatografía de gases.

10 El aparato del primer aspecto permite extraer, identificar y cuantificar COVs de muestras sólidas y/o semisólidas (6), muestras complejas, y COVs que son conocidos como biomarcadores en sujetos que sufren de CCR, o en sujetos que están predispuesto a sufrir de CCR, o para proporcionar un pronóstico de la condición del sujeto. Los COVs pueden ser seleccionados de la lista; P-cresol, 1H-indol, 3(4H)-dibenzofuranona o tetrahidrofolato. Por lo
15 tanto, aparato del primer aspecto permite extraer, identificar y cuantificar biomarcadores que se usaran en un método para cribar sujetos sanos de sujetos que sufran CCR.

En una realización particular del primer aspecto el aparato de cromatografía de gases (2) es un aparato de desorción térmica de cromatografía de gases acoplado a un espectrómetro de
20 masas (3). El aparato de cromatografía de gases (2) proporciona análisis cualitativo de los COVs, relacionando la posición de los picos y su tiempo de retención con la identificación del COVs y el análisis cuantitativo evaluando y calculando el área de cada pico. El aparato de espectrómetro de masas (3) proporciona análisis cualitativo y cuantitativo de los COVs en función de la relación masa/carga/de los COVs. En una realización preferida del aparato del
25 primer aspecto los COVs son biomarcadores resultantes del metabolismo de un microorganismo asociado al CCR. Más preferiblemente, los COVs pueden ser seleccionados de la lista; P-cresol, 1H-indol, 3(4H)-dibenzofuranona o tetrahidrofolato. En una realización preferida del aparato del primer aspecto, la muestra sólida y/o semisólida (6) son heces.

30 En una realización preferida del primer aspecto de la invención, el aparato comprende un medio (4), que puede ser un aparato, configurado para proporcionar una temperatura determinada y agitación magnética a la muestra sólida y/o semisólida (6). El medio (4) puede ser un aparato que proporcione agitación magnética en un rango desde 200 RPM
35 hasta 2000 RPM y que proporcione temperatura desde un rango de 25 °C hasta 200 °C. En

una realización preferida, el aparato del primer aspecto comprende un medio (4) configurado para proporcionar una temperatura en un rango entre 40 °C hasta 80 °C y agitación magnética, a la muestra sólidas y/o semisólidas (6). De manera más preferida, el medio (4) está configurado para proporcionar una temperatura en un rango entre 50 °C hasta 70 °C.

5 Esta configuración proporciona una mejora en la extracción de los COVs en la muestra sólida y/o semisólida o de la muestra de heces.

El recipiente (5) se puede cerrar con la tapa (7) una vez introducida la muestra. La tapa (7) facilita un cierre seguro y mejora la extracción, disminuyendo la pérdida de volátiles.

10

En una realización preferida, el aparato del primer aspecto comprende los imanes (8) y (11), donde dichos imanes tienen las mismas dimensiones. Preferiblemente, los imanes (8) y (11) son de neodimio. Los imanes de neodimio comprenden una aleación de neodimio, hierro y boro. Preferiblemente, los imanes (8) y (11) son circulares lo que proporciona una mejora de la extracción en fase sólida de los COVs de la muestra sólida y/o semisólida o de la muestra de heces.

15

El sorbente (9) es un material adaptado para adsorber los COVs emitidos o evaporados de la muestra sólida y/o semisólida (6) y donde quedan retenidos, preferiblemente la muestra sólida y/o semisólida (6) es una muestra de heces. El sorbente (9) está soportado en el imán (8). En una realización preferida, el sorbente (9) comprende un material que contiene óxido de grafeno y de óxido de hierro (Fe_3O_4), preferiblemente un nanomaterial magnético que comprende nanopartículas de óxido de grafeno y de óxido de hierro (Fe_3O_4). El óxido de grafeno tiene propiedades magnéticas por la presencia del óxido de hierro. Se entiende por nanomaterial como materiales con propiedades morfológicas más pequeñas que 1 μm en al menos una dimensión, más preferiblemente nanomaterial como materiales con propiedades morfológicas entre 0,2 nm y 100 nm. El uso del sorbente (9) aporta también la ventaja de que se puede usar con muestras sólidas y/o semisólidas (6) e incluso con muestras que contengan COVs con alto peso molecular y con mezclas de estos con los de bajo peso molecular, así como con muestras complejas, consiguiendo una muy buena y eficaz extracción y separación de los COVs en estas muestras.

20

25

30

35

Sorprendentemente, el sorbente (9) proporciona una buena eficacia en la separación de los COVs y/o biomarcadores a pesar de que este no se disperse en la muestra sólida y/o semisólida, tal como ocurre si se usan muestras líquidas.

- En una realización preferida el aparato del primer aspecto comprende un recipiente inerte (5) que puede tener un volumen de entre 1 ml hasta 15 ml, más preferiblemente, el volumen del recipiente inerte (5) es entre 2 ml hasta 10 ml ya que proporciona una mejora y una muy
- 5 buena extracción de los COVs, particularmente cuando estos están contenidos en muestras sólidas, y/o semisólidas y/o de heces. El recipiente inerte (5), con un volumen superior a 20 ml proporciona una peor extracción de los COVs en muestras sólidas y peor sensibilidad y fiabilidad en la detección y cuantificación COVs y/o biomarcadores del CCR.
- 10 En una realización preferida del aparato del primer aspecto, el recipiente (5) tiene forma circular o esencialmente circular y un diámetro de entre 0.5 a 3 cm, más preferiblemente el diámetro del recipiente (5) está entre 0.5 a 2 cm. De este modo se mejora la extracción de los COVs de la muestra sólida y/o semisólida o de la muestra de heces.
- 15 En una realización más preferida del aparato del primer aspecto, el recipiente (5) tiene forma circular o esencialmente circular, un diámetro de entre 0.5 a 3 cm y un volumen de entre 1 y 10 ml. Más preferiblemente, recipiente (5) tiene forma circular o esencialmente circular, un diámetro de entre 0.5 a 2 cm y un volumen de entre 1 y 10 ml. Esto lleva a una mejora en la extracción de COVs en muestras sólidas y/o semisólidas o en muestras de heces y a la
- 20 obtención de una buena sensibilidad en la detección y cuantificación de los COVs en muestras solidas/semisólidas y/o en muestras de heces en el aparato del primer aspecto de la invención.

De forma general, el aparato del primer aspecto, el recipiente (5) puede ser de vidrio o de

25 plástico. Preferiblemente el recipiente es de un solo uso, lo que ayuda a disminuir o eliminar contaminación cruzada y facilita la recogida de muestras.

La figura 1 representa el dispositivo del primer aspecto de la invención.

- 30 El aparato del primer aspecto de la invención proporciona muy buenos resultados usando cantidades bajas de sorbente (9), permitiendo a la vez obtener buenos resultados cuando se usan diferentes cantidades de muestra. El sorbente (9) puede estar presente en una cantidad de hasta 15 mg. En una realización preferida el sorbente (9) está presente en un rango entre 1 mg hasta 8 mg, más preferiblemente entre 2 mg hasta 6 mg, proporcionando
- 35 una buena eficiencia en la extracción de COVs de la muestra, así como una buena sensibilidad y fiabilidad en la identificación y cuantificación de los COVs. El sorbente (9)

puede ser reutilizado después de una etapa tras una adecuada limpieza lo que mejora su rentabilidad económica y su uso a nivel comercial, haciendo así un uso respetuoso con el medioambiente.

5 En una realización más preferida, el sorbente (9), es nanomaterial que comprende óxido de grafeno y óxido de hierro soportado sobre el imán (8) y más preferiblemente el imán (8) es de neodimio. El sorbente (9), los imanes (8) y (11) y la colocación del sorbente (9) referente al imán (8) facilita el manejo de los COVs, permitiendo una separación rápida y evitando etapas adicionales.

10

Una vez los COVs han sido extraídos y adsorbidos en el sorbente (9) situado sobre el imán (8) este se desmonta y se coloca en un tubo (12) que se cierra por cada extremo con lana de vidrio (11). El tubo (12) se incorpora al aparato de cromatografía de gases, preferiblemente el aparato de cromatografía de gases es un aparato de cromatografía de gases por desorción térmica. Los elementos 11 y 12, son elementos que forman parte del

15

Los COVs pueden ser biomarcadores relevantes para diagnosticar a un sujeto que sufre de CCR, o que está predispuesto a sufrir de CCR, o para proporcionar un pronóstico de la

20

El segundo aspecto de la presente invención está relacionado con el uso del aparato del primer aspecto para extraer, identificar y cuantificar COVs en muestras sólidas y/o

25

El tercer aspecto de la presente invención está relacionado con el uso del aparato del primer aspecto en el diagnóstico o pronóstico ex vivo de cáncer colorrectal (CCR) en un sujeto. Preferiblemente, el uso del aparato del primer aspecto en el diagnóstico ex vivo de cáncer colorrectal (CCR) se realiza en muestras sólidas y/o semisólidas (6); más preferiblemente en

35

El cuarto aspecto de la presente invención está relacionado con un método para diagnosticar ex vivo a un sujeto que sufre de CCR, o que esta predispuesto a sufrir de CCR, o para proporcionar un pronóstico de la condición del sujeto, donde el método comprende
5 las etapas:

- (I) Obtener una muestra corporal sólida y/o semisólida (6) del sujeto;
- (II) Extraer por lo menos un COV comprendido en la muestra (6) e identificar
10 y cuantificar la concentración de dicho COV con el aparato según el primer aspecto de la invención;
- (III) Comparar la concentración de por lo menos un COV con la concentración de una referencia del compuesto característico en un individuo que no sufre de cáncer, donde el incremento o decremento de la concentración del biomarcador en comparación con la referencia, es indicativo de que el sujeto
15 está sufriendo de cáncer, o tiene una predisposición al mismo, o proporciona un pronóstico de la condición del sujeto o proporciona un pronóstico negativo de la condición del sujeto;

20 donde el COV es un biomarcador resultante del metabolismo de un microorganismo asociado al CCR;

donde la muestra corporal sólida y/o semisólida (6) es una muestra de heces.

En una realización preferida del cuarto aspecto el COV es un biomarcador resultante del metabolismo de un microorganismo asociado al CCR que se selecciona de la lista que
25 consiste en; P-cresol, 1H-indol, 3(4H)-dibenzofuranona o tetrahidrofolato. Por ejemplo, cuando el biomarcador es, 1H-indol, la concentración del biomarcador sufre un decremento en comparación con la referencia. Cuando el biomarcador es p-cresol, 3(4H)-dibenzofuranona, o tetrahidrofolato la concentración del biomarcador sufre un incremento en comparación con la referencia. Los investigadores han identificado por primera vez, la
30 presencia de la 3(4H)-dibenzofuranona en heces como posible biomarcador para el pronóstico y diagnóstico del CCR.

Por lo tanto, el quinto aspecto de la invención está relacionado con el uso del COV, 3(4H)-dibenzofuranona, como biomarcador del CCR y/o como biomarcador en el pronóstico y
35 diagnóstico del CCR.

El sexto aspecto de la invención está relacionado con el uso de 3(4H)-dibenzofuranona, en un método ex vivo para diagnosticar a un sujeto que sufre de CCR, o que esta predispuesto a sufrir de CCR o para proporcionar un pronóstico de la condición del sujeto.

- 5 En otra realización preferida del método del cuarto aspecto, se caracteriza por que los COVs son identificados en la etapa II por su tiempo de retención. Mas preferiblemente, cuando el COV es P-cresol el tiempo de retención es 7,92 min ($\pm 0,076$). Preferiblemente, cuando el COV es 1H-indol el tiempo de retención es 9,84min ($\pm 0,062$). Preferiblemente, cuando el COV es 3(4H)-dibenzofuranona el tiempo de retención es 13,77 min ($\pm 0,13$).

10

Un cromatograma típico de una muestra ex vivo de un sujeto puede contener los 4 compuestos biomarcadores investigados, tanto en pacientes con CCR como en pacientes sanos de control. Un ejemplo de un cromatograma típico corresponde por ejemplo a los que se muestran en las figuras 2 y 3. El incremento de la concentración de estos 3 biomarcadores, 3(4H)-dibenzofuranona, p-cresol o tetrahidrofolato, en una muestra de un sujeto a valorar comparada con la muestra de un sujeto sano nos indica la presencia o el comienzo de la enfermedad o la probabilidad de que la padezca o proporciona un pronóstico negativo de la condición del sujeto. El decremento de la concentración del biomarcador 1H-indol en una muestra de un sujeto a valorar comparada con la muestra de un sujeto sano nos indica la presencia o el comienzo de la enfermedad o la probabilidad de que la padezca o proporciona un pronóstico negativo de la condición del sujeto.

20

Los detalles, las formas, las dimensiones y demás elementos accesorios, así como los materiales empleados en la fabricación del aparato del primer aspecto de la invención, podrán ser convenientemente sustituidos por otros que sean técnicamente equivalentes y no se aparten de la esencialidad de la invención ni del ámbito definido por las reivindicaciones que se incluyen a continuación.

25

30 **Ejemplo 1: Extracción y separación y análisis cuantitativo de COVs en muestras de heces.**

En un vial (recipiente inerte (5)), de 2 mL, se añaden 400-500 mg de heces (6) y se cierra el sistema para evitar la pérdida de COVs. Previamente, se prepara el imán (8) con 4.3 mg de un nanomaterial magnético de óxido de grafeno y óxido de hierro (sorbente (9)) (también referido como GO/Fe₃O₄ o nano absorbente) el cual comprende nanopartículas de óxido de grafeno y óxido de hierro. El imán (8) es un imán de neodimio. El sorbente (9), GO/Fe₃O₄, se

35

puede preparar tal como se describe en L. Vidal et al. Analytica Chimica Acta 971 (2017) 40-47. También se puede preparar mediante la simple interacción electrostática de las nanopartículas magnéticas de Fe_3O_4 (con carga superficial positiva) con el material carbonoso (óxido de grafeno o GO), el cual posee una carga superficial negativa consecuencia de la ionización de grupos carboxílicos y fenólicos. La modificación del óxido de grafeno (GO) con nanomateriales de Fe_3O_4 permite obtener sorbentes en los que se combinan sinérgicamente las excelentes propiedades extractantes del material carbonoso con las ventajas que proporciona el magnetismo para su manipulación. El nanosorbente (9) usado presenta una muy buena capacidad adsorptiva.

10

El vial con la muestra se calienta durante 30 minutos a 60°C . En estas condiciones la muestra se descongela y pasa a estar en estado líquido. A continuación, la muestra se agita a 1500 rpm durante 20 minutos en los cuales el sorbente (9) GO/ Fe_3O_4 adsorbe los COVs emitidos a la parte superior del vial donde se sitúa el imán de neodimio (8) y el sorbente (9).

15

Las condiciones de extracción se controlan estrictamente para asegurar la reproducibilidad del análisis. Finalizada la extracción, el imán de neodimio (8) con el sorbente (9) se coloca en un tubo comercial de vidrio (12) el cual es colocado a continuación en el horno de desorción térmica acoplado a un aparato de cromatografía de gases (2) (también referido como (GC)) que está acoplado a continuación a un aparato de espectrometría de masas (3)

20

(también referido como (MS)).

En los aparatos de GC y MS es donde se realiza la desorción, separación y detección de los COVs. Los resultados obtenidos se analizaron con el programa "MSD ChemStation" de Agilent technologies. Dicho programa proporciona los tiempos de retención de los COVs a analizar. El tiempo de retención es medido en el máximo del pico. Los COVs de interés presentan los siguientes tiempos de retención: P-cresol 7,92 min ($\pm 0,076$), 1H-indol: 9,84min ($\pm 0,062$), y 3(4H)-dibenzofuranona 13,77 min ($\pm 0,13$).

25

Método de diagnóstico de CCR

30

Cromatogramas típicos de una muestra que contiene los compuestos investigados en un paciente con CCR y en un control sano corresponde por ejemplo a los que se muestran en las fig 2 y 3. El incremento de la concentración de estos biomarcadores (medidos usando el área del pico) en una muestra de un sujeto a valorar comparada con la muestra de un sujeto sano nos indica la presencia o el comienzo de la enfermedad o la probabilidad de que la padezca o proporciona un pronóstico negativo de la condición del sujeto.

35

El análisis cromatográfico se lleva a cabo con un cromatógrafo de gases (modelo 7890) de la casa comercial Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA) equipado con un inyector automático. Se utiliza una columna capilar HP-5 (5% fenil-95% dimetilpolisiloxano, 30 m × 5 0,32 mm I.D., 0,25 μ-m de grosor) de Scientific (Folsom, CA, USA). La temperatura del inyector se mantiene a 200°C y el volumen de inyección es de 1 μL. La temperatura del horno (6890N de Agilent) inicialmente es de 40°C que incrementa su temperatura con un gradiente de 6°C por minuto hasta llegar a 100°C. El cromatógrafo de gases tiene acoplado un espectrómetro de masas (modelo 5973N) también de Agilent Technologies. La ionización 10 se realiza mediante impacto de electrones con una energía ionizante de 70 eV.

Las áreas de los picos obtenidos en los cromatogramas se analizaron utilizando la librería espectral de masas WILEY.275L, la cual identifica el COV correspondiente a cada pico y proporciona un valor de abundancia. El valor de la abundancia se obtiene mediante el 15 cálculo del área debajo de la curva que representa cada pico (cada compuesto) al cual se le asocia un valor de abundancia en el sujeto.

La abundancia de los biomarcadores como, p-cresol, 1H-indol, 3(4H)-dibenzofuranona y tetrahidrofolato, se comparó en pacientes con CCR frente a los pacientes sanos sin neoplasia (control). En el caso de, p-cresol, 3(4H)-dibenzofuranona y tetrahidrofolato la 20 abundancia se encuentra aumentada en caso de sujetos con CCR frente al control. Por el contrario, en el caso del 1H-indol la abundancia se encuentra disminuida en sujetos con CCR frente al control.

El análisis de datos se realizó mediante el paquete estadístico *Statistical Package for the* 25 *Social Sciences for Windows*, SPSS versión 19.0 (SPSS® *Statistical software*, an IBM Company, Chicago, IL, USA). Las abundancias de cada compuesto se obtuvieron mediante la librería WILEY.275L la cual proporciona una correspondencia entre COVs y los picos obtenidos en el cromatograma. Las abundancias de los COVs detectadas en el grupo de CCR y controles se compararon mediante la prueba U de Mann-Whitney y el análisis de 30 características del operador del receptor (ROC) se utilizó para estudiar su potencial como biomarcadores de enfermedad.

En el caso del p-cresol, la mediana de la abundancia (P25-P75) en el grupo de pacientes con CCR fue de 13×10^8 (90.4×10^7 - 26.5×10^8) y en los pacientes control de 35.7×10^7 35 (15.3×10^7 - 70.9×10^7); proporcionando una diferencia significativa, $P = < 0.001$.

En el caso del biomarcador, 3(4H)-dibenzofuranona (3(4H)-DBZ), la mediana (P25-P75) de la abundancia en el grupo de CCR fue de 37.5×10^6 (17×10^6 - 66.4×10^6) y en controles 12.4×10^6 (78.1×10^5 - 23.2×10^6); proporcionando diferencias significativas, $P = < 0.001$.

5

El método presenta muy buena especificidad y sensibilidad tal como se ve en la tabla 1. En el caso del p-cresol, presenta un área bajo la curva ROC (AUC) para predecir CCR de 0.81 (IC 95; 0.675-0.938) con una sensibilidad óptima del 83% y especificidad óptima del 80%, $P < 0.001$. EL metabolito 3(4H)-DBZ presenta un AUC para predecir CCR de 0.80 (IC 95; 0.675-0.930) con una sensibilidad del 83% y una especificidad del 74%, $P < 0.001$.

10

Biomarcador	Curva ROC AUC	Sensibilidad	Especificidad	Abundancia en sano	Abundancia en enfermo
p-cresol	0.81	83%	80%	75.3×10^7	20.8×10^8
3(4H)-DBZ	0.80	83 %	74 %	20.1×10^6	61.1×10^6

15

Tabla 1: resultados de COV, biomarcadores del CCR, en el método de la presente invención

20

REIVINDICACIONES

1. Aparato adaptado para el análisis cualitativo y cuantitativo de COVs en muestras
5 sólidas y/o semisólidas (6), dicho aparato comprende los siguientes elementos:
- a. un dispositivo de extracción magnética adsortiva de espacio de cabeza (1);
 - b. un aparato de cromatografía de gases (2);
 - c. un aparato de espectrometría de masas (3);
- 10 donde el dispositivo de extracción magnética adsortiva de espacio de cabeza (1) comprende un recipiente inerte (5) adecuado para depositar la muestra (6), donde el recipiente comprende:
- una tapa (7);
 - un imán (8) situado en la parte inferior de la tapa, el cual comprende un
15 sorbente magnético (9);
 - un imán (10) situado en la parte superior de la tapa sobre el recipiente;
- estando el dispositivo de extracción magnética adsortiva de espacio de cabeza (1) configurado para acoplarse al aparato de cromatografía de gases (GC).
- 20
2. Aparato según la reivindicación anterior, donde el recipiente inerte (5) tiene un volumen de entre 1 ml hasta 15 ml.
3. Aparato según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el recipiente
25 inerte de (5) tiene un volumen de entre 1 ml hasta 10 ml.
4. Aparato según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el dispositivo de extracción magnética adsortiva de espacio de cabeza (1) comprende, además:
- Un medio (4) configurado para proporcionar una temperatura en un rango entre
30 40 °C hasta 80 °C y agitación magnética, a la muestra sólidas y/o semisólidas (6).
5. Aparato según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el sorbente (9)
35 contiene un nanomaterial que comprende óxido de grafeno y óxido de hierro soportado sobre el imán (8).

6. Aparato según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el nanomaterial del sorbente (9) está comprendido en un rango entre 1 mg hasta 8 mg.
- 5 7. Aparato según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el nanomaterial del sorbente (9) está comprendido en un rango entre 2 mg hasta 6 mg.
8. Aparato según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde los imanes (8) y (10) tienen las mismas dimensiones.
- 10 9. Aparato según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde los imanes (8) y (10) son esféricos.
10. Aparato según cualquiera de las reivindicaciones 1-9 donde los imanes (8) y (10) son de neodimio.
- 15 11. Aparato según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el recipiente inerte (5) tiene forma circular o esencialmente circular y un diámetro de entre 0.5 a 3 cm.
- 20 12. Aparato según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el recipiente inerte es de un solo uso.
13. Aparato según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el recipiente inerte (5) es de plástico o de vidrio.
- 25 14. Aparato según cualquiera de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde COVs son biomarcadores resultantes del metabolismo de un microorganismo asociado al cáncer colorrectal rectal.
- 30 15. Aparato según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la muestra sólida y/o semisólida (6) son heces.
16. Uso del aparato según cualquiera de las reivindicaciones 1-15 para el análisis cualitativo y cuantitativo de COVs en muestras sólidas y/o semisólidas (6).

35

17. Uso del aparato según la reivindicación anterior, donde los COVs son biomarcadores resultantes del metabolismo de un microorganismo asociado al cáncer colorrectal rectal.
- 5 18. Uso del aparato según la reivindicación anterior donde lo biomarcadores se seleccionan de la lista que consiste en; P-cresol, 1H-indol, 3(4H)-dibenzofuranona o tetrahidrofolato.
- 10 19. Uso del aparato según la reivindicación 17-18 en el diagnóstico o pronóstico ex vivo de cáncer colorrectal rectal.
20. Uso del aparato según cualquiera de las reivindicaciones 17-19, donde la muestra (6) es una muestra de heces.
- 15 21. Método para diagnosticar a un sujeto que sufre de CCR, o que está predispuesto a sufrir de CCR, o para proporcionar un pronóstico de la condición del sujeto, donde el método comprende las etapas:
- (I) Obtener una muestra de heces (6) del sujeto;
 - (II) Extraer por lo menos un COV comprendido en la muestra (6) e identificar y cuantificar la concentración de dicho COV con el aparato según cualquiera de las reivindicaciones 1-16;
 - (III) Comparar la concentración de por lo menos un COV con la concentración de una referencia del compuesto característico en un individuo que no sufre de cáncer, donde el incremento o decremento de la concentración del biomarcador en comparación con la referencia, es indicativo de que el sujeto sufre de cáncer, o tiene una predisposición al mismo, proporciona un pronóstico de la condición del sujeto o proporcionar un pronóstico negativo de la condición del sujeto;
- 25
- 30 donde el COV es un biomarcador resultante del metabolismo de un microorganismo asociado al CCR, seleccionado de P-cresol, 1H-indol, 3(4H)-dibenzofuranona o tetrahidrofolato.
- 35 22. Método según la reivindicación 21, donde la concentración del biomarcador sufre un incremento en comparación con la referencia y donde el biomarcador es 3(4H)-dibenzofuranona y/ p-cresol.

23. Método según la reivindicación 21, donde la concentración del biomarcador sufre un decremento en comparación con la referencia y donde el biomarcador es 1H-indol.
- 5 24. Método según cualquiera de las reivindicaciones 21-23, donde los COVs son identificados en la etapa II por su tiempo de retención.
25. Método según cualquiera de las reivindicaciones 21-23, donde el COV es P-cresol y su tiempo de retención en la etapa II es 7,92 min ($\pm 0,076$),
- 10 26. Método según cualquiera de las reivindicaciones 21-23, donde el COV es 1H-indol y su tiempo de retención en la etapa II es 9,84min ($\pm 0,062$).
27. Método según cualquiera de las reivindicaciones 21-23, donde el COV es 3(4H)-dibenzofuranona y su tiempo de retención en la etapa II es 13,77 min ($\pm 0,13$).
- 15 28. Método según cualquiera de las reivindicaciones 21-24, donde la especificidad de los biomarcadores, p-cresol y/o 3(4H)-dibenzofuranona, es de por lo menos un 70%.
29. 3(4H)-dibenzofuranona como biomarcador del CCR y/o como biomarcador en el pronóstico y diagnóstico del CCR.
- 20 30. 3(4H)-dibenzofuranona para uso en un método ex vivo para diagnosticar a un sujeto que sufre de CCR o que esta predispuesto a sufrir de CCR o para proporcionar un pronóstico de la condición del sujeto.
- 25

Fig 1

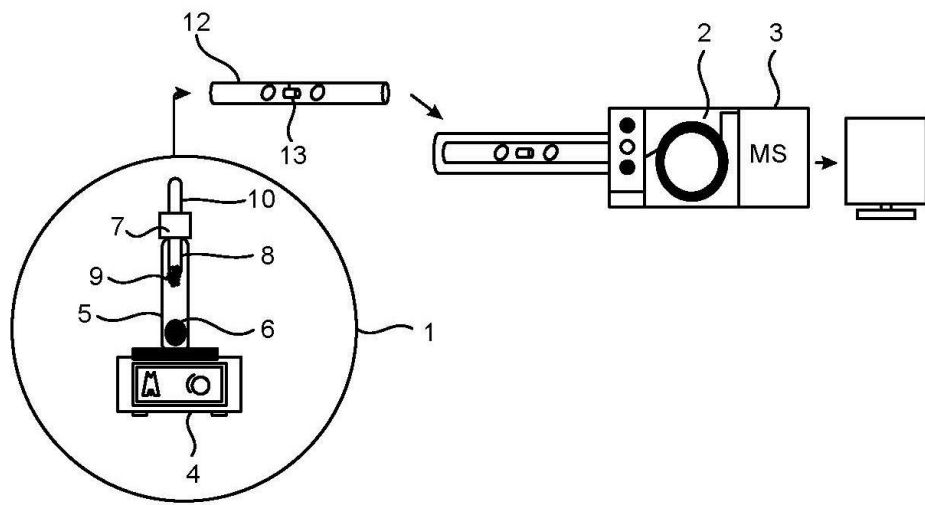


Fig 2

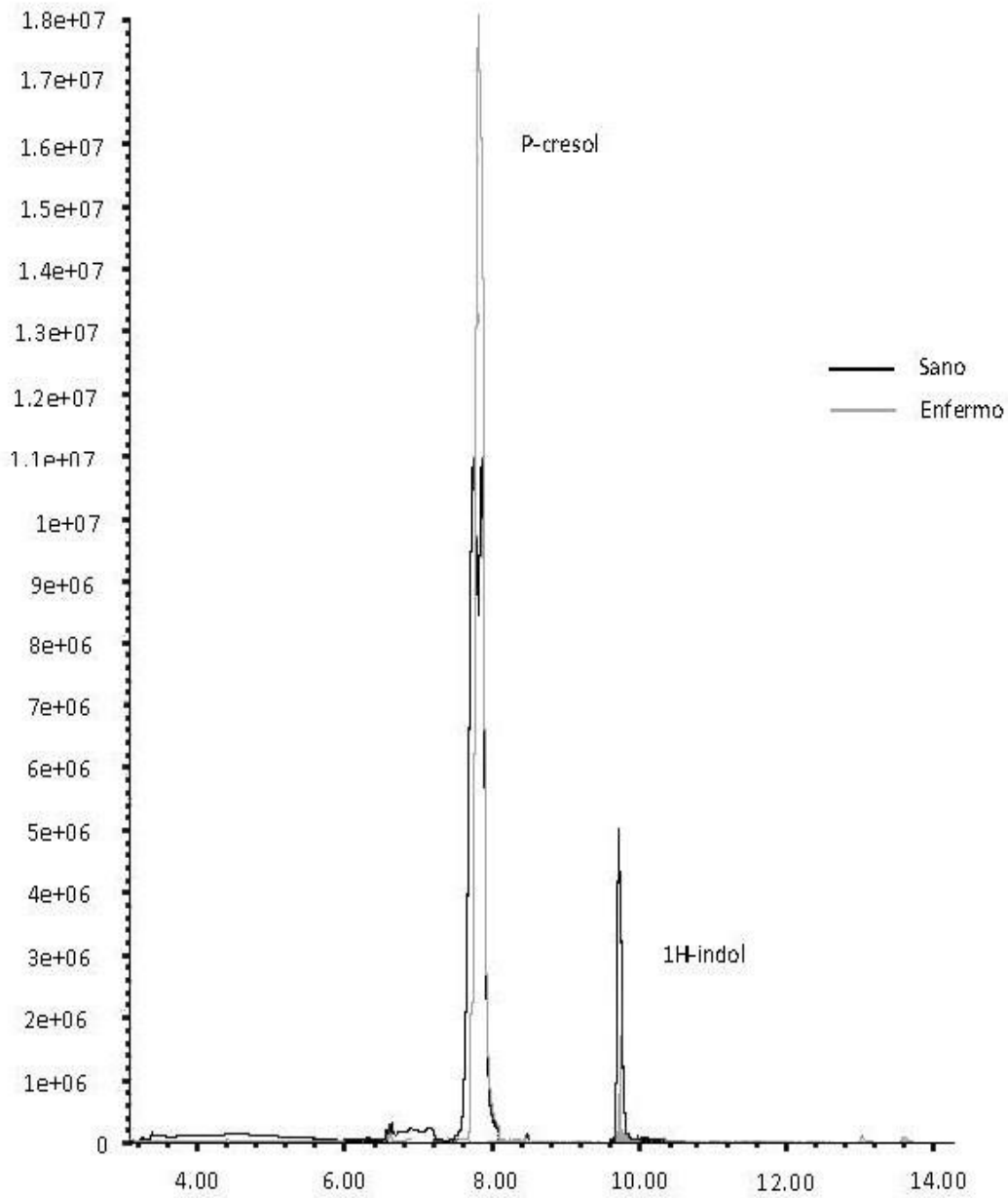
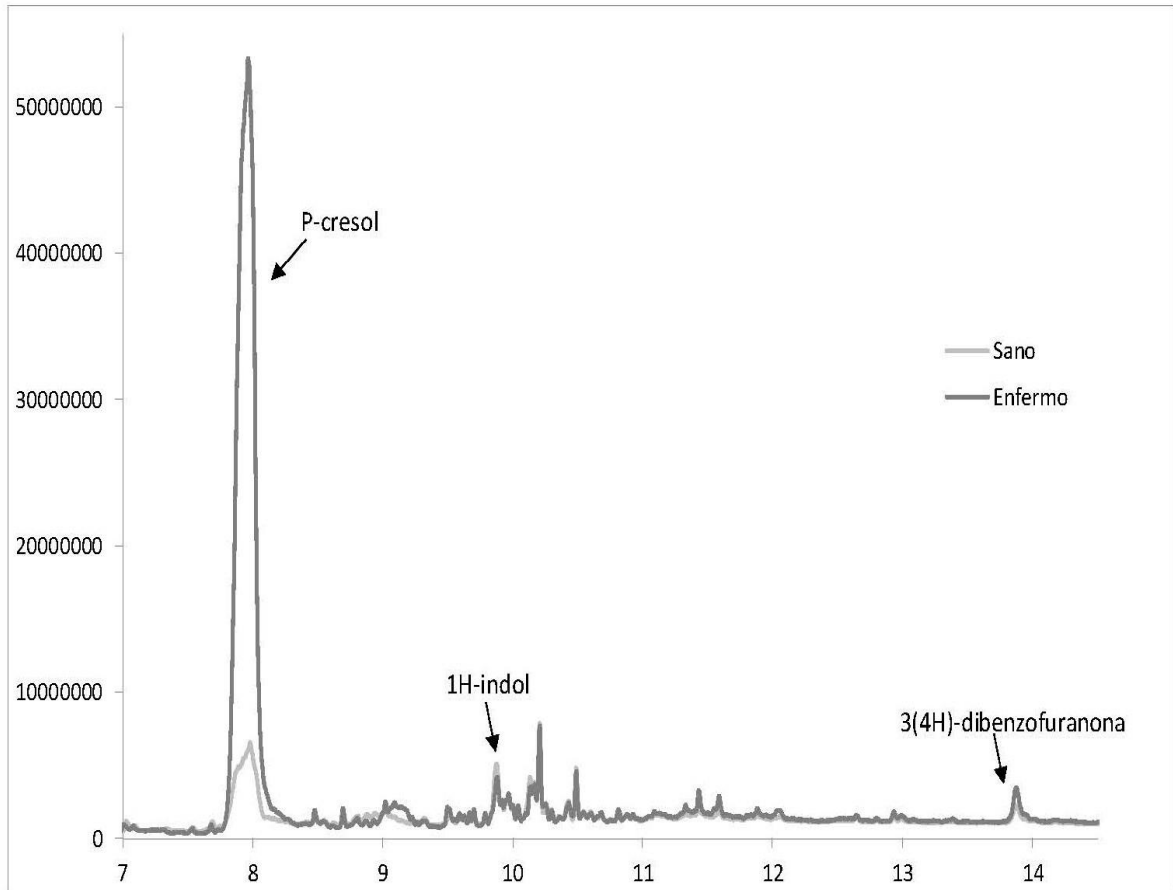


Fig 3





- ① N.º solicitud: 202030487
② Fecha de presentación de la solicitud: 26.05.2020
③ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤ Int. Cl.: **G01N33/483** (2006.01)
G01N30/00 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	VIDAL LORENA <i>et al.</i> "Magnetic headspace adsorptive extraction of chlorobenzenes prior to thermal desorption gas chromatography-mass spectrometry". <i>Analytica Chimica Acta</i> , 20170410 ELSEVIER, AMSTERDAM, NL. Xu Guowang; Wishart David; Li Liang, 10/04/2017, Vol. 971, páginas 40 - 47, ISSN 0003-2670, <DOI:10.1016/j.aca.2017.04.002>	1-16
Y	ELSEVIER, AMSTERDAM, NL. Xu Guowang; Wishart David; Li Liang, 10/04/2017, Vol. 971, páginas 40 - 47, ISSN 0003-2670, <DOI:10.1016/j.aca.2017.04.002>	17-28
Y	FIORI JESSICA <i>et al.</i> "Assessment of gut microbiota fecal metabolites by chromatographic targeted approaches". <i>Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis</i> , Elsevier B.V, AMSTERDAM, NL. 2019/09/08, Vol.177, N° 112867, páginas 2-5, <DOI: 10.1016/j.jpba.2019.112867 >	17-28
A	AMSTERDAM, NL. 2019/09/08, Vol.177, N° 112867, páginas 2-5, <DOI: 10.1016/j.jpba.2019.112867 >	30
A	PATEL MITESH <i>et al.</i> "Faecal volatile biomarkers of <i>Clostridium difficile</i> infection". <i>PLoS One</i> APR 15 2019. 15/04/2019, Vol. 14, Páginas Article No.: e0215256 [en línea][recuperado el 23/10/2020]. ISSN 1932-6203(print), <DOI: 10.1371/journal.pone.0215256>. Todo el documento	17-28, 30
A	COSTA DOS REIS, L. "Metodologías analíticas respetuosas con el medio ambiente para la determinación de microcontaminantes orgánicos en aguas", 00/09/2018 [en línea][recuperado el 23/10/2020]. Recuperado de Internet URL:< https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=177391&orden=0&info=link >. Páginas 193-223, sección 9.3.	21-28, 30
A	US 2017227429 A1 (KOO SOPHIA <i>et al.</i>) 10/08/2017 Ejemplo 1, párrafo [0062]	1-28, 30
A	WO 2019053414 A1 (IMPERIAL INNOVATIONS LTD) 21/03/2019 Reivindicación 18	21-28, 30
A	WO2019224542 A1 (UNIV LIVERPOOL) 28/11/2019 Todo el documento	21-28

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: 1-28, 30

Fecha de realización del informe
11.11.2020

Examinador
M. L. Serriá Ramírez

Página
1/2

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

G01N

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

INVENES, EPODOC, BIOSIS, EMBASE, MEDLINE, NPL, XPESP, XPESP2, GOOGLEPATENTS, GOOGLESCHOLAR