

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 452 350**

51 Int. Cl.:

A61P 31/04 (2006.01)

A61K 38/40 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.05.2008 E 08759848 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.12.2013 EP 2162146**

54 Título: **Apotransferrina para su uso en el tratamiento de infecciones bacterianas como coadyuvantes en terapia con antibióticos**

30 Prioridad:

21.05.2007 IT LU20070009

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

01.04.2014

73 Titular/es:

KEDRION S.P.A. (100.0%)

Localita' ai Conti 5

55051 Castelvecchio Pascoli - Barga, IT

72 Inventor/es:

SELAN, LAURA;

ARTINI, MARCO;

SCOARUGHI, GIAN LUCA;

MARINIELLO, RENATO;

ASCIONE, ESTER;

FARINA, CLAUDIO y

MENCONI, MARIA CARLA

74 Agente/Representante:

RUO, Alessandro

ES 2 452 350 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

Apotransferrina para su uso en el tratamiento de infecciones bacterianas como coadyuvantes en terapia con antibióticos.

5

Campo de la invención

[0001] La presente invención se refiere al campo de composiciones farmacéuticas útiles para el tratamiento de infecciones bacterianas como coadyuvantes en terapia con antibióticos.

10

Estado de la técnica

[0002] Muchas infecciones bacterianas siguen un patrón crónico y son resistentes a terapias con antibióticos comunes debido a la capacidad de las bacterias que las mantienen para adherirse a sustratos abióticos o bióticos; de este modo, las bacterias pueden asumir un fenotipo sésil (biopelícula) o invadir las células eucariotas del huésped. Ambas estrategias hacen que las bacterias sean resistentes a las terapias con antibióticos.

15

[0003] Se ha atribuido durante mucho tiempo un conocimiento adquirido sobre biopelículas al crecimiento de bacterias únicamente en el ambiente.

20

[0004] Las biopelículas se observaron inicialmente al principio de 1980 sobre las superficies de instrumentos artificiales introducidos en el cuerpo humano. Las manifestaciones clínicas de estas infecciones han intrigado durante mucho tiempo a los médicos y microbiólogos debido a la naturaleza escasa, inespecífica e indolente del cuadro sintomatológico, así como a su falta de respuesta a los tratamientos administrados, incluso a largo plazo y en dosis altas y también, en algunos casos, a un empeoramiento repentino que conduce a la muerte. En muchos de estos casos, la terapia con antibióticos administrada en las dosis recomendadas proporciona una mejora temporal de los síntomas, pero después de suspender el fármaco, la infección vuelve invariablemente con características indolentes, hasta el momento en que se retira el dispositivo médico artificial (prótesis, marcapasos, catéter, etc.). A partir de las observaciones recientes se deduce que las mismas biopelículas bacterianas que se forman sobre las superficies de dispositivos protésicos artificiales también pueden crecer sobre las superficies de tejidos u órganos cuya integridad se ve comprometida. Se deduce que las mismas leyes que regulan el crecimiento preferencial de bacterias en las superficies son ciertas para todos los ecosistemas, incluyendo el cuerpo humano.

25

30

[0005] El fenómeno de la resistencia bacteriana a la terapia con antibióticos siempre se ha conocido y, hasta hace unos años, se explicó a través de diversos mecanismos, siendo los principales bombas de eflujo, inactivación enzimática y mutaciones genéticas. Estos mecanismos no parecen ser responsables de la protección de las bacterias en las biopelículas. Las pruebas de susceptibilidad con modelos de biopelículas han demostrado que las bacterias sobreviven después del tratamiento con antibióticos en concentraciones de cientos o incluso miles de veces mayores que la concentración inhibitoria mínima eficaz sobre las mismas bacterias mantenidas suspendidas en medio de cultivo.

35

40

[0006] Hasta ahora se han descrito diversas patologías humanas que se relacionan con la presencia de biopelículas en el cuerpo humano. Exclusivamente con fines de clasificación, puede hacerse una distinción entre las patologías relacionadas con la inserción de materiales artificiales en el cuerpo y las patologías relacionadas con el crecimiento de biopelícula en tejido humano.

45

[0007] Todos los tipos de dispositivos médicos implantables son sitios potenciales de infección de las biopelículas, en cualquier sitio en el cuerpo que se coloquen y sin perjuicio del tipo de biomaterial utilizado: prótesis vasculares, válvulas cardíacas artificiales, marcapasos, prótesis ortopédicas y implantes endoóseos, implantes dentales, catéteres venosos centrales, catéteres urinarios.

50

[0008] El agente etiológico responsable de la mayoría de colonizaciones pertenece a la especie *Staphylococcus* (70-80% de los casos) y en particular estafilococos coagulasa negativa (90%).

55

[0009] Desde el momento en el que la adhesión de la biopelícula a dispositivos médicos implantables artificiales se describió por primera vez, se han hecho muchos intentos por prevenir las infecciones por biopelículas o por erradicar las ya iniciadas. Cabe mencionar en este punto que, con respecto a artículos protésicos, las infecciones se han clasificado como perioperatoria (desde el primer día de la implantación hasta 30 días), media distancia (uno o dos años desde la implantación) y larga distancia (incluso después de 10 años desde la primera implantación protésica). Las infecciones perioperatorias pueden compararse con una infección séptica normal en el momento de la cirugía, mientras que las otras dos se contraen a través de sangre por una bacteriemia transitoria y, por lo tanto, no pueden prevenirse mediante profilaxis antibiótica en el momento de la cirugía. Se han hecho muchos intentos por prevenir o tratar estas infecciones:

60

- Profilaxis antibiótica perioperatoria;
- Terapia con antibióticos a largo plazo;
- Uso de moléculas antibióticas con poco impedimento estérico, potencialmente capaces de impregnar la matriz de la biopelícula;
- Prótesis impregnadas con un antibiótico (válvulas cardíacas, catéteres urinarios, etc.);
- Uso de terapia con antibióticos combinada;
- Prótesis impregnadas con sustancias anti-biopelícula (sales de plata).

5
10 **[0010]** Sin embargo, ninguno de estos intentos ha conseguido aún el objetivo; en este sentido todas estas estrategias preventivas y terapéuticas son eficaces en el control de infecciones de biopelículas sin lograr jamás erradicarlas, ni disminuir la prevalencia de casos fatales.

15 **[0011]** Normalmente, la colonización bacteriana de una mucosa conduce a la destrucción localizada del epitelio y permite que se forme una apertura a través de la cual las bacterias pueden alcanzar la sub-mucosa altamente vascularizada. Algunas bacterias cruzan muy pronto la mucosa epitelial usando mecanismos invasivos específicos permitiéndoles penetrar en las células epiteliales directamente a pesar de no ser fagocitos especializados. La capacidad de las bacterias para invadir células huésped les permite utilizar diversos metabolitos y nutrientes en la célula, para evitar la respuesta inmune del huésped y resistir todos los antibióticos que no atraviesan las membranas celulares eucariotas (por ejemplo cefalosporina). Muchas infecciones crónicas/recurrentes se sostienen por cepas y especies capaces de adherirse a las células huésped y de invadirlas; las infecciones recurrentes en realidad son causadas por bacteriemias que resurgen tras el cese de la terapia con ciclos de antibióticos (tales como infecciones urinarias).

25 **[0012]** Una vez ancladas a la superficie de la célula eucariota, las bacterias están en un ambiente extremadamente favorable para su multiplicación debido a la riqueza de fuentes de nutrientes, el alto contenido en agua y un control preciso del pH, la temperatura y otros parámetros físico-químicos. Sin embargo, las bacterias también deben lidiar con la necesidad de contrarrestar las defensas antimicrobianas del huésped y la necesidad de proveerse de elementos esenciales, que normalmente se secuestran o no son fácilmente accesibles, para sus necesidades metabólicas.

30 **[0013]** Uno de los elementos necesarios para el crecimiento bacteriano es el hierro, contenidas en grandes cantidades en el cuerpo humano pero que no puede usarse libremente para las necesidades metabólicas de la mayor parte de las bacterias patógenas y no patógenas, ya que se encuentra en su mayoría quelado por lactoferrina, transferrina, ferritina y hemina.

35 **[0014]** Las bacterias han desarrollado diversos mecanismos para la captura de hierro y cada cepa generalmente puede emplear más de uno de ellos. Muchas especies sintetizan moléculas especializadas (sideróforos) que son capaces de quelar hierro muy eficazmente y competir con la transferrina y la lactoferrina para la movilización de iones; algunas bacterias poseen receptores de superficie que se unen a la transferrina, con el fin de separar el hierro en su superficie, y otras son capaces de usar hemo como fuente de hierro, mientras que todavía otras pueden utilizar el hierro presente en los complejos de la hemoglobina o haptoglobina, etc.

40 **[0015]** Por otro lado, la transferrina también es conocida por poseer actividad antimicrobiana, en la medida en que aumentan las concentraciones sanguíneas de la misma durante la inflamación y durante el choque endotóxico.

45 **[0016]** La transferrina humana forma parte de una gran familia de glicoproteínas que son componentes importantes del sistema inmune innato y están presentes en diversos fluidos secretores, tales como el suero y la leche. Consiste en una cadena polipeptídica única que contiene 679 residuos aminoacídicos y dos cadenas N-glicosídicas de tipo complejo; el peso molecular total se calcula que es de aproximadamente 80.000 Da siendo el 5,9% hidratos de carbono. En condiciones fisiológicas, la saturación de transferrina con hierro es aproximadamente del 30%. Por consiguiente, coexisten 4 formas diferentes de transferrina en el plasma en cuanto a su contenido en hierro, que pueden separarse y aislarse por medio de técnicas electroforéticas:

- 50
1. apotransferrina (apoTf; sin iones férricos);
 2. transferrina monoférrica (hierro en el dominio N-terminal);
 3. transferrina monoférrica (hierro en el dominio C-terminal);
 4. transferrina diférrica (hierro en dos sitios de unión).

55
60 **[0017]** La transferrina monoférrica o diférrica generalmente también se conoce como holotransferrina (holoTf). Uno de los mecanismos a través de los cuales la transferrina podría ejercer su acción antimicrobiana comprende la interacción directa con las adhesinas bacterianas. De la bibliografía científica se deduce que existe una variabilidad entre diferentes cepas de estafilococos en la expresión de adhesina y proteínas de superficie; estas se expresan a

menudo en formas truncadas (véase, por ejemplo Grundmeier y col. 2004). Esto conduce a la creencia de que las sustancias que interfieren con la adherencia, la invasión de las células eucariotas y la formación de biopelícula pueden tener un efecto heterogéneo en las diversas cepas.

5 **[0018]** La actividad antimicrobiana de la transferrina también depende de su capacidad para recuperar y unirse a hierro, siendo su capacidad de unirse al hierro evidentemente mayor en la apoTf que en la holoTf: al igual que con la apolactoferrina (apoLf) (véase: Nature 2002 vol. 417 págs. 552-5), la apoTf también es un quelante del hierro potente. Se ha demostrado que la apoLf daña las bacterias Gram-negativas adheridas a la membrana externa de las células eucariotas; de esta manera, podría prevenir la invasión celular en las infecciones agudas pero inducir la liberación de lipopolisacáridos bacterianos en el microambiente.

10 **[0019]** A partir de lo anterior, es evidente la importancia de ser capaz de proporcionar un medio eficaz para contrarrestar las infecciones bacterianas que se han indicado anteriormente.

15 **Breve descripción de los dibujos**

[0020]

20 La figura 1 describe la formación de biopelículas por *S. aureus 6538*, en presencia de Inóculo de apoTf = 10^6 células. La concentración de apoTf en las hileras 1 a 12 disminuye de 40 mg/ml a 19,5 µg/ml, como se muestra por las etiquetas del eje X del gráfico. Muestras no tratadas: TBS + glucosa al 10%.

La figura 2 describe la formación de biopelículas por *S. epidermidis 0-47*, en presencia de inóculo de apoTf = 10^6 células. La concentración de apoTf en las hileras 1 a 12 disminuye de 40 mg/ml a 19,5 µg/ml, como se muestra por las etiquetas del eje X del gráfico. Muestras no tratadas: TBS + glucosa al 10%.

25 La figura 3 describe la formación de biopelículas por *S. epidermidis RP62A*, en presencia de inóculo de apoTf = 10^6 células. La concentración de apoTf en las hileras 1 a 12 disminuye de 40 mg/ml a 19,5 µg/ml, como se muestra por las etiquetas del eje X del gráfico. Muestras no tratadas: TBS + glucosa al 10%.

30 **Descripción detallada de la invención**

[0021] Sorprendentemente se ha descubierto, y representa un aspecto de la presente divulgación que, en contraste con las indicaciones surgidas de estudios previos (véase, por ejemplo "The inhibitory activity of serum to prevent bacterial adhesion is mainly due to apotransferrin.", J Biomed Mater Res A. 1 de julio de 2003; 66(1): 21-8. Ardehali R, Shi L, Janatova J, Mohammad SF, Burns GL. "The effect of apo-transferrin on bacterial adhesion to biomaterials". Artif Organs. junio de 2002; 26(6): 512-20), la apoTf es eficaz como una molécula anti-biopelícula tanto en las fases tempranas como tardías de su formación.

35 **[0022]** Por lo tanto, es posible usar apoTf para preparar composiciones farmacéuticas útiles para el tratamiento de infecciones bacterianas como coadyuvantes en terapia con antibióticos. Preferiblemente, son soluciones fisiológicas que contienen apoTf en una cantidad comprendida entre 2 y 40 mg/ml.

Parte experimental

45 **[0023]** Ejemplo: Se usaron cepas de referencia y clínicas del género *Staphylococcus* para evaluar el efecto ejercido por la apoTf sobre la producción de biopelículas. Como se indica, el género *Staphylococcus* es responsable de aproximadamente el 70% de todas las infecciones humanas sostenidas por biopelículas de prótesis vasculares y ortopédicas.

50 **[0024]** Se han utilizado técnicas para la evaluación cuantitativa de la formación de biopelículas usando tinción de cloruro de metilrosanilina en presencia y ausencia de apoTf.

[0025] En particular, se han reunido datos relativos a las siguientes:

- 55 - *Staphylococcus aureus* ATCC6538P (cepa de referencia para producción de biopelículas);
- *S. epidermidis* 0-47 (aislado clínico, usado como cepa de referencia para la producción de biopelículas: Heilmann y col. 1996). Esta cepa se obtuvo con permiso del Profesor Friedrich Gotz;
- *S. epidermidis* RP62A (ATCC 35984, Christensen y col. 1987).

60 **[0026]** Los experimentos con el objetivo de determinar una posible interferencia de la apoTf en la formación de biopelículas por bacterias gram-positivas *in vitro* se realizaron reconstituyendo apoTf liofilizada en agua estéril hasta que se obtuvo una concentración madre de 5,8 mg/ml. Después, la apoTf se usó en concentraciones graduadas partiendo de una concentración final máxima de 2,32 mg/ml a una concentración final mínima de 0,9 µg/ml. En los

experimentos no hubo una diferencia sustancial entre las muestras tratadas con apoTf y los controles no tratados.

[0027] Por lo tanto, se decidió aumentar la concentración final máxima de apoTf hasta 40 mg/ml y así incluir el intervalo fisiológico de concentración de transferrina humana en plasma (2,4-3,2 mg/ml).

[0028] Los experimentos sobre la posible interferencia de la apoTf en la formación de biopelículas *in vitro* se realizaron mediante los siguientes procedimientos:

- formación de biopelículas por cepas bacterianas seleccionadas sobre microplacas de poliestireno de 96 pocillos (Falcon) durante 24 horas a 37 °C en medio de cultivo de caldo TSB (Oxoid) suplementado con glucosa al 0,25%.
- para no alterar la composición del medio de cultivo para la formación de biopelículas, la apoTf se reconstituyó directamente en el medio de cultivo para la formación de biopelículas, es decir, en TSB (Oxoid)/glucosa al 0,25%. Se añadió apoTf a los cultivos bacterianos (concentración del inóculo inicial: 10⁸ células/ml) al comienzo de la incubación, es decir, antes de la formación de biopelículas, en concentraciones graduadas, usando una dilución 1:2 partiendo de una concentración máxima de 4 mg por pocillo (40 mg/ml) a una concentración mínima de 1,95 µg por pocillo (19,5 µg/ml).

[0029] Al final del tiempo de incubación de 24 horas permitido para la formación de biopelículas, el medio y cualquier célula en fase planctónica se aspiraron ligeramente de todos los pocillos, después se lavaron dos veces con 100 µl de una solución de PBS estéril x 1. Después, las placas se dejaron secar a temperatura ambiente. Las células bacterianas que se adherían al poliestireno se tiñeron usando el procedimiento descrito por C. Heilmann (Heilmann C. y col. 1996) con algunas modificaciones: los pocillos que contenían biopelícula se incubaron con una solución de cloruro de metilrosanilina al 0,5% durante 1 minuto, reemplazando la solución de safranina al 0,1% durante 30 segundos. Después, se realizaron tres lavados en 100 µl de PBS, los multipocillos se invirtieron y se dejaron secar sobre papel 3M durante 15 minutos.

[0030] Las figuras adjuntas muestran los resultados típicos obtenidos para las tres cepas usadas, concretamente *S. aureus* 6538P, *S. epidermidis* 0-47 y *S. epidermidis* RP62A. El cloruro de metilrosanilina penetra en la matriz extracelular formando las biopelículas: para cuantificar la formación de biopelículas en los pocillos después del secado, el tinte se suspendió de nuevo con una solución 80/20 vol/vol de etanol/acetona. La cantidad de cloruro de metilrosanilina presente en cada pocillo es proporcional a la cantidad de biopelícula cultivada en el mismo, cuantificándose midiendo la absorbancia de los pocillos con un lector de microplaca para absorbancia ELx800™ (BioTek) a una longitud de onda de 590 nm. El control usado fue un pocillo con medio estéril TSB solo, restándose su valor de las lecturas de absorbancia para todas las muestras. Cada resultado experimental se obtiene a partir de las lecturas medias de cuatro pocillos, realizándose cada experimento por duplicado. Los resultados obtenidos se tradujeron en los gráficos de las figuras adjuntas.

[0031] El análisis de los efectos de la apoTf en biopelículas de cepas de estafilococos ha demostrado claramente que la molécula posee una actividad biológica sobre las biopelículas de todas las cepas de estafilococos analizadas dentro del intervalo de concentración usado.

[0032] Por lo tanto, la apoTf es una molécula eficaz para reducir la adhesión e invasión de bacterias patógenas en células humanas cultivadas.

Parte experimental

[0033] Ejemplo: Se ha descubierto que la invasión de células eucariotas por *S. aureus* 6538P se vio influenciada por concentraciones de apoTf de entre 100 y 400 µg/ml. Específicamente, la capacidad invasiva de la cepa bajo estudio se redujo (30%-50%) por la presencia de apoTf a concentraciones ≥200 µg/ml. El tratamiento con apoTf no modificó el número de bacterias adheridas a las células eucariotas, pero redujo el número de bacterias intracelulares y redujo la invasividad en hasta el 50%.

[0034] Con este objetivo, se usaron células epiteliales adherentes de adenocarcinoma humano (HeLa). Con el fin de no alterar la composición del medio de cultivo celular, la apoTf se reconstituyó en PBS hasta una concentración madre de 100 mg/ml. En un segundo grupo de experimentos se usó una única concentración final de apoTf comparable con su concentración en plasma e igual a 5 mg/ml (25 µl en 0,5 ml de cultivo celular). La apoTf se añadió a los cultivos celulares después de reemplazar el medio completo con medio libre de suero y antibióticos 10 minutos antes de añadir las bacterias para la infección. Ésta última se realizó 24 horas después de transferir las células HeLa en placas multipocillo de 24 pocillos.

[0035] El inóculo era igual a 10⁵ bacterias por 55.000 células eucariotas/pocillo. Para ensayar la capacidad

invasiva de las bacterias, se contaron las bacterias que sobrevivieron a un tratamiento con un antibiótico eficaz sobre la cepa usada pero no eficaz sobre las células eucariotas (dosis/CIM-CBM): después de una hora de incubación a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5%, se añadieron 50 µg/ml de gentamicina y las células se incubaron durante 1 hora. El lisado de células eucariotas que contenía las bacterias intracelulares que sobrevivieron al tratamiento con antibióticos se usó para el recuento de las bacterias que habían invadido las propias células.

[0036] Para ensayar la capacidad adhesiva de la cepa bacteriana analizada, se realizó una segunda serie de experimentos sin tratamiento con antibióticos. El número de bacterias adherentes se obtuvo restando el número de bacterias que habían invadido las células a partir del recuento bacteriano total (la suma de bacterias adheridas y bacterias que habían invadido las células eucariotas). Para evitar el recuento bacteriano incluyendo también las células bacterianas que no se adhirieron perfectamente o dispersas en el medio de cultivo celular, la mezcla de las células y las bacterias se lavó dos veces con PBS 1 x.

[0037] Para ambos conjuntos experimentales, las células se lisaron con H₂O + Triton X140 al 0,025%.

[0038] Después de la centrifugación, el lisado se suspendió de nuevo en 100 µl de PBS 1 x y se puso en placas sobre un medio sólido de TSA para permitir el recuento de las colonias bacterianas (incubación de 18 horas a 37 °C). Cada condición individual se realizó por triplicado para lograr la confirmación estadística de los resultados.

[0039] Además, en estos experimentos, a pesar de que la concentración de apoTf es de un orden de magnitud mayor que en el experimento anterior, se descubrió que la reducción de invasividad era de aproximadamente el 50%.

[0040] Ambos experimentos demostraron una reducción en la adhesión bacteriana de entre el 30 y el 50% en bacterias tratadas en comparación con las no tratadas.

[0041] La apoTf ejerce efectos bactericidas o bacteriostáticos. Por lo tanto, puede usarse como un producto sinérgico para una acción antibiótica bactericida o bacteriostática y opcionalmente sola en preparaciones de uso tópico.

Parte experimental

[0042] Ejemplo: Se evaluaron la CIM (Concentración Inhibitoria Mínima) y la CBM (Concentración Bactericida Mínima) de la apoTf y la holoTf. En esta fase de los experimentos, se usó *aureus* 6538P. Las transferrinas en nuestra posesión se suspendieron de nuevo directamente en ICC para no cambiar la composición del medio usado en los diversos experimentos.

[0043] Las CIM se realizaron en tubos de bacteriología que contenían 1 ml de medio de ICC (Infusión Cerebro Corazón) con concentraciones graduadas de apoTf y holoTf a partir de un máximo de 20 mg/ml, a un mínimo de 39 µg/ml. Se usó el medio de ICC en lugar del medio ICC convencional, concretamente el caldo MHB (*Mueller Hinton Broth*), ya que es el medio usado para la extracción de proteínas de superficie. En todos los tubos, excepto el control negativo, se introdujo un inóculo igual a 5 x 10⁶ bacterias cultivadas en crecimiento exponencial; los tubos se dejaron crecer a 37 °C en una rueda. La evaluación se realizó al día siguiente mediante la determinación de la turbiedad de los cultivos. Los cultivos que eran menos turbios que el control positivo libre de transferrina se usaron para un conteo de viabilidad sobre las placas (evaluación de UFC, unidades formadoras de colonias) con el fin de comprobar la capacidad bactericida del compuesto a una concentración determinada (CBM).

La Tabla 1 muestra los resultados de la CIM.

TABLA 1

mg/ml	ApoTF	HoloTf
20	-	+
10	+-	+
5	+-	+
2,5	+	+
1,25	+	+
0,625	+	+
0,312	+	+
0,156	+	+
0,078	+	+
0,039	+	+
Las concentraciones CIM son las siguientes:		

CIM apoTf entre 10 y 20 mg/ml
 CIM holoTf >20 mg/ml

[0044] La Tabla 2 muestra los resultados de la CBM expresada como UFC/ml.

TABLA 2

mg/ml	ApoTF	HoloTf
20	<10	$9,45 \times 10^7$
10	$1,26 \times 10^7$	$1,97 \times 10^8$
5	$1,90 \times 10^7$	$2,00 \times 10^8$
0.039	$1,27 \times 10^8$	$1,79 \times 10^8$
c. pos.	$2,00 \times 10^8$	$2,00 \times 10^8$

Las concentraciones CBM son las siguientes:
 CBM apoTf entre 10 y 20 mg/ml
 CBM holoTf >20 mg/ml

5

[0045] Por lo tanto, se puede afirmar que en el caso de las moléculas de transferrina usadas en *S. aureus* 6538P, la CIM corresponde a la CBM.

REIVINDICACIONES

- 5
1. Soluciones fisiológicas farmacéuticas que comprenden apotransferrina en una concentración comprendida entre 4 y 30 mg/ml para su uso en el tratamiento de infecciones bacterianas como coadyuvantes en terapia con antibióticos.
 2. Composiciones farmacéuticas de acuerdo con la reivindicación 1 que comprenden adicionalmente un agente antibiótico para su uso en el tratamiento de infecciones bacterianas.
 - 10 3. Composiciones farmacéuticas para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-2 para su uso en la reducción de la adhesión y/o invasión de bacterias patógenas.

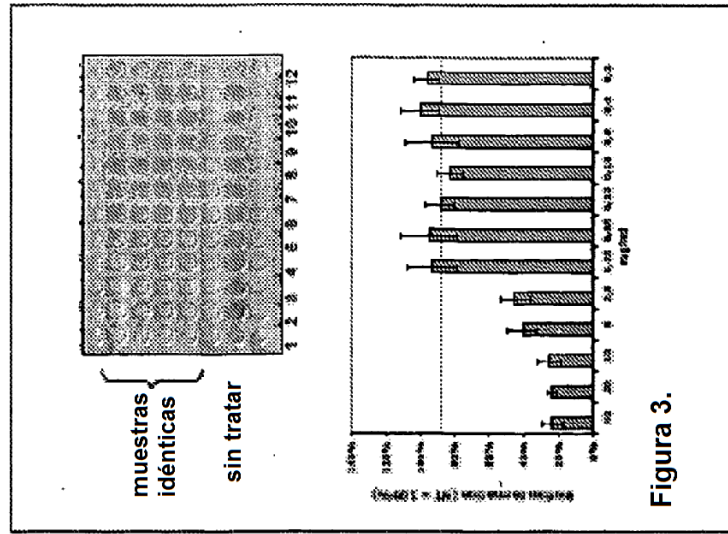


Figura 3.

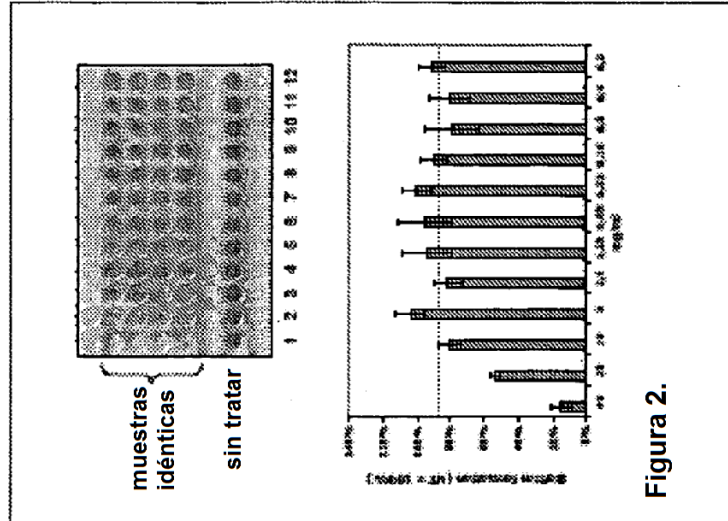


Figura 2.

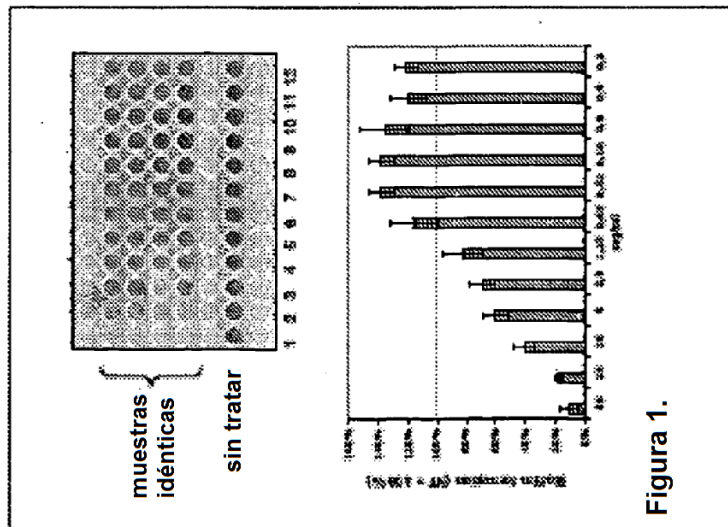


Figura 1.