

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 381 998**

51 Int. Cl.:  
**A23K 1/16** (2006.01)  
**A23K 1/18** (2006.01)  
**A23L 1/29** (2006.01)  
**A23L 1/30** (2006.01)  
**A61K 31/765** (2006.01)  
**A61K 47/26** (2006.01)  
**A61K 47/10** (2006.01)  
**A61P 31/04** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02789898 .0**  
96 Fecha de presentación: **26.11.2002**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1567117**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **31.08.2005**

54 Título: **Prevención y tratamiento de trastornos eipiteliales mediados por microbios**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**04.06.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**04.06.2012**

73 Titular/es:  
**THE UNIVERSITY OF CHICAGO  
5801 SOUTH ELLIS AVENUE CHICAGO  
ILLINOIS 60637, US**

72 Inventor/es:  
**ALVERDY, John, C., M.D.**

74 Agente/Representante:  
**Ponti Sales, Adelaida**

ES 2 381 998 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

Prevención y tratamiento de trastornos epiteliales mediados por microbios

## 5 CAMPO DE LA INVENCION

[0001] La presente invención se refiere a materiales para prevenir o tratar trastornos epiteliales mediados por microbios, tales como la septicemia de origen intestinal.

## 10 ANTECEDENTES

[0002] Los trastornos epiteliales mediados por microbios, o afecciones anómalas, plantean una amenaza significativa para la salud del hombre y los animales, imponiendo una sobrecarga a los sistemas de salud de todo el mundo. Un ejemplo de dichos trastornos, la septicemia de origen intestinal, es una causa principal de mortalidad entre los organismos, tales como pacientes humanos, que padecen cualquiera de una variedad de enfermedades, trastornos o afecciones, tales como lesiones por quemaduras, enterocolitis neonatal, neutropenia grave, enfermedad inflamatoria del intestino, y rechazo de órgano después de trasplante. Se reconoce desde hace tiempo que el reservorio del tracto intestinal es un foco potencialmente letal de septicemia mediada por bacterias, p. ej., en enfermos críticos, pacientes hospitalizados. La capacidad de los patógenos microbianos tales como las pseudomonas (p. ej. *Pseudomonas aeruginosa*) para alterar la función reguladora de la barrera del epitelio intestinal puede ser una característica definitoria entre los organismos oportunistas capaces de producir septicemia de origen intestinal. En muchas de estas infecciones, se ha identificado la *Pseudomonas aeruginosa* como el patógeno causante. Significativamente, el tracto intestinal ha mostrado ser el sitio principal de colonización de patógenos oportunistas como *P. aeruginosa*.

[0003] Los procedimientos terapéuticos convencionales para prevenir o tratar los trastornos epiteliales mediados por microbios tales como la septicemia de origen intestinal, han tenido un éxito incompleto. Los procedimientos basados en antibióticos se ven comprometidos por la dificultad de diseñar antibióticos para el patógeno intestinal de una forma que no impacte en el resto de la flora intestinal. Además, muchos de los patógenos intestinales, como se ilustra con *P. aeruginosa*, a menudo se hacen resistentes a desafíos de antibióticos, dando como resultado un procedimiento costoso, continuo y con éxito incompleto para la prevención o el tratamiento. También se encuentran problemas en los procedimientos inmunoterapéuticos. En particular, muchos patógenos intestinales tales como *P. aeruginosa*, son inmunoevasivos, haciendo que dichos procedimientos sean mínimamente eficaces.

[0004] Otro procedimiento para prevenir o tratar trastornos tales como la septicemia de origen intestinal es el lavado intestinal. En los últimos años, se ha intentado el lavado intestinal usando disoluciones de polietilenglicol (PEG) con algunas descripciones anecdóticas que sugerían que el PEG puede ser algo prometedor para el tratamiento de la septicemia de origen intestinal entre una variedad de circunstancias clínicas y experimentales. El PEG en estas disoluciones tiene un peso molecular medio de 3.500 daltons y las disoluciones están disponibles en el comercio (p. ej., Golytely). Los mecanismos por los cuales estas disoluciones de PEG de peso molecular relativamente bajo (LMW) proporcionan un beneficio terapéutico en el tratamiento o prevención de la septicemia de origen intestinal, son desconocidos. Típicamente, estas disoluciones se usan para lavar o lavar por barrido el tracto intestinal de organismos en riesgo de desarrollar, o que padecen, septicemia de origen intestinal. Como resultado de administrar estas disoluciones de PEG de LMW en el tracto intestinal, hay un cambio variable en la composición de la flora del intestino tratado, dependiendo del procedimiento de concentración y del peso molecular de los compuestos usados. Por ejemplo, las disoluciones que tienen concentraciones de PEG mayores que aproximadamente 20 % pueden producir una acción microbicida que da como resultado la eliminación de los microorganismos potencialmente protectores en el tracto intestinal de un huésped que ha sufrido una agresión. Además, las disoluciones de PEG de bajo peso molecular pueden perder su eficacia atenuando la capacidad virulenta de determinados organismos, a pesar de conservarlos. Por lo tanto, es necesaria en la técnica una disolución que inhiba la expresión de la virulencia microbiana (las propiedades dañinas de un microbio) a la vez que no mate al microbio o microbios vecinos, proporcionando de esta forma el beneficio de conservar el ecosistema natural de la microflora intestinal. Por ejemplo, la conservación de la composición de la flora natural proporcionaría competencia a los patógenos oportunistas que de otra forma colonizan el intestino.

[0005] Simultáneamente con un cambio en la composición de la flora se produce un cambio en la fisiología del organismo. Estos cambios fisiológicos se pueden seguir ensayando cualquiera de una serie de actividades enzimáticas características, tales como los niveles de lactato deshidrogenasa. Por consiguiente, los tratamientos del intestino con PEG LMW producen cambios significativos en la fisiología de los organismos tratados, con consecuencias a largo plazo impredecibles, y por lo tanto perjudicialmente dañinas, para la salud y el bienestar del organismo tratado. Además, dichos tratamientos provocan reacciones físicamente exigentes en forma de evacuación

intestinal masiva en organismos enfermos críticos tales como pacientes humanos hospitalizados.

**[0006]** Por lo tanto, sigue siendo necesario en la técnica proporcionar una composición eficaz para prevenir, o tratar, un trastorno epitelial mediado por microbios (p. ej., septicemia de origen intestinal) y/o un síntoma asociado con dicho trastorno, junto con procedimientos para lograr dichos beneficios, sin crear el potencial de complicaciones adicionales por la alteración significativa de la fisiología de los organismos tratados.

**[0007]** El documento WO99/08514 describe composiciones que contienen PEG (polietilenglicol), más preferiblemente la molécula basada en PEG lineal con un peso molecular de 20000 daltons. El PEG inhibe la apoptosis, protege, conserva o restaura la función celular, tisular o de órganos.

**[0008]** Las composiciones del documento WO99/08514 se usan en el tratamiento de la perturbación gastrointestinal que puede ser causada por el virus de inmunodeficiencia humana, agentes quimioterapéuticos, radiación y enfermedades infecciosas, tales como la enfermedad inflamatoria del intestino. La perturbación gastrointestinal incluye el daño del revestimiento del intestino, úlceras crónicas graves, colitis y la perturbación del tracto gastrointestinal causada por parásitos, y diarrea por cualquier otra causa. Las composiciones se pueden administrar para afecciones dermatológicas tales como la curación de heridas.

**[0009]** Además, Desai N.P. y col., *Biomaterials* 1992, vol. 13, no. 7, 1992, páginas 417-420 describe películas modificadas por PET con PEG que tiene un peso molecular de 18500 daltons. El PEG reduce la adhesión bacteriana de *S. aureus*, *S. epidermis* y *P. aeruginosa* a los implantes y reduce el riesgo de infecciones asociadas con los implantes.

## RESUMEN DE LA DESCRIPCIÓN

**[0010]** La presente descripción satisface la necesidad de la técnica mencionada anteriormente, proporcionando una composición de polietilenglicol de alto peso molecular (HMW) que proporciona una protección eficaz contra una afección anómala caracterizada por una superficie epitelial en riesgo de desarrollar un trastorno mediado por microbios. Las afecciones anómalas de ejemplo incluyen septicemia de origen intestinal y otros trastornos/enfermedades intestinales asociados con la flora intestinal debidos a patógenos intestinales que incluyen, pero sin limitar, *P. aeruginosa*. El PEG HMW inhibe o previene el contacto de dichos patógenos tales como *P. aeruginosa* con la superficie del epitelio intestinal. Además, el PEG de alto peso molecular suprime la expresión de la virulencia en estos patógenos (p. ej., *P. aeruginosa*), que responden a una variedad de señales que pueden implicar redes de señalización por percepción de quórum. La capacidad de los PEG HMW para obstaculizar en la interfase infecciosa entre el patógeno intestinal y el epitelio intestinal, proporciona un procedimiento alternativo para prevenir o tratar la septicemia de origen intestinal, p. ej., después de agresión catabólica. Es importante que los tratamientos con PEG HMW serían rentables y relativamente sencillos de llevar a cabo en pacientes humanos así como una variedad de otros organismos tales como ganado de importancia agropecuaria (p. ej., vacas, cerdos, ovejas, cabras, caballos, pollos, pavos, patos, gansos, y similares), mascotas y animales de zoológico.

**[0011]** Un aspecto de la descripción proporciona un procedimiento para reducir la probabilidad de mortalidad en un animal con una afección anómala, incluyendo una enfermedad, que comprende una superficie epitelial en riesgo de desarrollar una enfermedad mediada por microbios, seleccionada del grupo que consiste en septicemia de origen intestinal, una lesión por quemadura, enterocolitis necrosante neonatal, neutropenia grave, colitis tóxica, enfermedad inflamatoria del intestino, enteropatía, rechazo de trasplante, pouchitis y enteritis necrótica, que comprende administrar una dosis eficaz de polietilenglicol (PEG) a un animal que lo necesite, en el que el PEG tiene un peso molecular medio de al menos 5.000 daltons.

**[0012]** Los animales adecuados incluyen, pero sin limitar, perro, gato, oveja, cabra, vaca, cerdo y ser humano. En el procedimiento mencionado antes, el PEG preferiblemente tiene un peso molecular medio de al menos 15.000 daltons, y preferiblemente entre 5.000 y 20.000 daltons, o entre 15.000 y 20.000 daltons. También se prefiere el PEG que tiene un peso molecular medio de 6.000, 7.000, 8.000, 9.000, 10.000, 11.000, 12.000, 13.000, 14.000, y de 25.000 daltons. Además, el PEG puede estar en una disolución acuosa que comprende PEG al 5-20 %, y preferiblemente PEG al 10-20 % (p. ej., PEG al 10 %). En una realización del procedimiento, la afección está asociada con la presencia de un organismo de *Pseudomonas aeruginosa* en el intestino y la integridad de la membrana celular de dicha *P. aeruginosa* no está alterada de forma detectable. En otra realización del procedimiento, el patrón de crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* no está alterada de forma detectable.

**[0013]** Otro aspecto de la descripción es un procedimiento para inhibir la septicemia de origen intestinal, que comprende poner en contacto un epitelio de mamífero, tal como un intestino, con polietilenglicol (PEG), en el que el PEG tiene un peso molecular medio de al menos 5.000 daltons, y preferiblemente al menos 15.000 daltons. En una realización de este procedimiento, el intestino de mamífero se pone en contacto con el PEG durante al menos 30

minutos.

5 **[0014]** Otros aspectos de la descripción incluyen un procedimiento para inhibir la expresión de la lectina PA-I/adhesina en un patógeno del epitelio, p. ej., un patógeno intestinal, que comprende administrar una dosis eficaz de polietilenglicol a un animal que lo necesite; un procedimiento para inhibir la activación inducida por el epitelio (p. ej., inducida por el epitelio intestinal) de la lectina PA-I/adhesina, que comprende administrar una dosis eficaz de polietilenglicol a un animal que lo necesite; un procedimiento para inhibir el cambio morfológico inducido por C4-HSL de un patógeno del epitelio (p. ej., un patógeno intestinal), que comprende administrar una dosis eficaz de polietilenglicol a un animal que lo necesite; un procedimiento para reducir la expresión de la virulencia en un patógeno del epitelio (p. ej., un patógeno intestinal), que comprende administrar una dosis eficaz de polietilenglicol a un animal que lo necesite; un procedimiento para reducir o prevenir la interacción de una superficie epitelial con un factor de virulencia microbiano, que comprende administrar una dosis eficaz de polietilenglicol a un animal que lo necesite; un procedimiento para mejorar la patogénesis epitelial (p. ej., intestinal) previniendo la formación de la activación patógena por percepción de quórum, que comprende administrar una dosis eficaz de polietilenglicol a un animal que lo necesite; y un procedimiento para inhibir la interacción entre el epitelio (p. ej., epitelio intestinal) de un vertebrado y una bacteria, tal como *pseudomonas* (p. ej., *Pseudomonas aeruginosa*), que comprende poner en contacto el epitelio con polietilenglicol. En todos estos aspectos de la invención, el PEG tiene un peso molecular medio de al menos 5.000 daltons, y preferiblemente al menos 15.000 daltons.

20 **[0015]** Otro aspecto más de la descripción es un procedimiento para inhibir una reducción inducida por *Pseudomonas aeruginosa* de la resistencia eléctrica transepitelial de una capa epitelial de mamífero, tal como una capa del epitelio intestinal, que comprende poner en contacto la capa de epitelio (intestinal) con polietilenglicol, en el que el PEG tiene un peso molecular medio de al menos 5.000 daltons, y preferiblemente al menos 15.000 daltons. Preferiblemente, el PEG tiene un peso molecular medio de 15.000 a 20.000 daltons. En una realización preferida, la integridad de la membrana del microbio (p. ej., *P. aeruginosa*) no se altera de forma detectable.

30 **[0016]** Otro aspecto más de la descripción es un procedimiento para inhibir la adherencia de una célula bacteriana a un epitelio de mamífero, tal como un intestino de mamífero, que comprende poner en contacto el intestino con polietilenglicol, en el que el polietilenglicol tiene un peso molecular medio de al menos 5.000 daltons, y preferiblemente al menos 15.000 daltons. Con este procedimiento también se prefiere que el PEG tenga un peso molecular medio de 15.000 a 20.000 daltons. El PEG puede ser una disolución acuosa que comprende PEG al 5-20 %, y preferiblemente PEG al 5-10 %. Una célula bacteriana de ejemplo contemplada como sensible a la inhibición de la adherencia por este procedimiento es una *pseudomonas*, tal como *P. aeruginosa*.

35 **[0017]** Otro aspecto de la descripción es un procedimiento para reducir la expresión de lectina PA-I/adhesina en una célula bacteriana que comprende poner en contacto la célula bacteriana con polietilenglicol, en el que el PEG tiene un peso molecular de al menos 5.000 daltons, y preferiblemente 15.000 daltons, y preferiblemente es entre 15.000 daltons y 20.000 daltons. De nuevo, el PEG puede ser una disolución acuosa que comprende PEG al 5-20 %, y preferiblemente PEG al 5-10 %.

40 **[0018]** En otro aspecto, la descripción proporciona un procedimiento para reducir la probabilidad de mortalidad en un animal que presenta un trastorno epitelial mediado por microbios seleccionado del grupo que consiste en septicemia de origen intestinal, una lesión por quemadura, enterocolitis necrosante neonatal (NEC), neutropenia grave, colitis tóxica, enfermedad inflamatoria del intestino, enteropatía (p. ej., en el enfermo crítico), rechazo de trasplante, pouchitis y enteritis necrótica, que comprende administrar una cantidad eficaz de un compuesto (p. ej., PEG) que se adhiere a una célula seleccionada del grupo que consiste en una célula de epitelio intestinal de mamífero y una célula bacteriana intestinal, en el que el compuesto se adhiere a la célula de una forma topográficamente asimétrica, inhibiendo de este modo la interacción de la célula de epitelio intestinal de mamífero y la célula bacteriana. Un compuesto preferido es un tensioactivo. En una realización de este procedimiento, el compuesto es el PEG, que preferiblemente tiene un peso molecular medio de al menos 15.000 daltons. En otra realización de este procedimiento, la inhibición se determina por microscopía de fuerza atómica. En otra realización más de este procedimiento, la célula bacteriana es un patógeno intestinal y no hay una modificación detectable de sus características de crecimiento. En aspectos relacionados, este procedimiento comprende además introducir una cantidad eficaz de dextrano en el intestino del animal y/o introducir una cantidad eficaz de L-glutamina, L-glutamina recubierta con dextrano, inulina recubierta con dextrano, ácido butírico recubierto con dextrano, uno o más fructooligosacáridos, N-acetil-D-galactosamina, manosa recubierta con dextrano y galactosa, lactulosa y tampones de equilibrio y agentes estabilizantes, conocidos en la materia, en el intestino del animal. Cuando se administran juntos como una sola composición, esta administración de una sola disolución de múltiples componentes tratará y preparará el tracto intestinal anticipadamente a una alteración en la flora intestinal y de la función de barrera del intestino, como ocurre después de algunas agresiones de tipo catabólico, quirúrgico y traumático.

**[0019]** Otro aspecto de la descripción es un procedimiento para mejorar un síntoma asociado con cualquier

enfermedad o afección que surge de, o es característico de, una afección anómala del epitelio, tal como la septicemia de origen intestinal, que comprende administrar polietilenglicol al intestino, en el que el PEG tiene un peso molecular medio de al menos 5.000 daltons, preferiblemente al menos 15.000 daltons, y preferiblemente entre 15.000 y 20.000 daltons. El PEG puede ser una disolución acuosa que comprende PEG al 5-20 %, y preferiblemente PEG al 5-10 %. La invención comprende mejorar un síntoma asociado con cualquier enfermedad o afección descritas en el presente documento.

**[0020]** Otro aspecto más de la descripción es un procedimiento para prevenir la pérdida de la capacidad de lactancia en un animal que presenta una afección anómala en forma de una superficie epitelial de una glándula mamaria en riesgo de desarrollar un trastorno mediado por microbios que afecta a la producción de leche, que comprende administrar, p. ej., por vía tópica, una dosis eficaz de un polietilenglicol de al menos 5.000 daltons, y preferiblemente al menos 15.000 daltons, en la superficie epitelial de una glándula mamaria. Los animales de ejemplo incluyen mamíferos, tales como ovejas, cabras, vacas, cerdos, caballos y seres humanos. En un aspecto relacionado, la invención proporciona un procedimiento para tratar una pérdida de la capacidad lactante en un animal, caracterizada por un trastorno mediado por microbios de una superficie epitelial de una glándula mamaria que afecta a la producción de leche, que comprende administrar, p. ej., por vía tópica, una dosis eficaz de un polietilenglicol de al menos 5.000 daltons, y preferiblemente, al menos 15.000 daltons, en una glándula mamaria. En otro aspecto relacionado, la invención proporciona un procedimiento para prevenir el desarrollo de un trastorno epitelial mediado por microbios en un animal en edad de lactancia, que comprende administrar una dosis eficaz de un polietilenglicol de al menos 5.000 daltons, y preferiblemente al menos 15.000 daltons, al animal. Los animales adecuados incluyen mamíferos, tales como seres humanos, ganado, mascotas domesticadas y animales de zoológico. En una realización, el PEG se mezcla con cualquier preparación para lactante conocida en la técnica.

**[0021]** Un aspecto relacionado de la descripción es una composición que comprende una preparación para lactante y polietilenglicol (PEG), en la que el PEG tiene un peso molecular medio de al menos 5.000 daltons. De nuevo, se puede usar cualquier preparación para lactante conocida en la materia, incluyendo preparaciones basadas en leche de un mamífero, tal como leche de vaca, leche de cabra y similares, así como preparaciones basadas en leche de soja. La preparación también puede estar enriquecida con cualquier vitamina y/o elemento, incluyendo la fortificación con hierro. El PEG preferiblemente tiene un peso molecular medio de al menos 15.000 daltons, y preferiblemente está presente en el intervalo de 5-20 % tras la reconstitución o hidratación de la preparación para lactantes o de alimentos infantiles. La invención proporciona además un procedimiento para proporcionar nutrición a un animal, preferiblemente en edad de lactancia, que comprende administrar al animal una dosis eficaz de la composición que comprende la preparación para lactantes y PEG.

**[0022]** Otro aspecto más de la descripción es una composición farmacéutica que comprende polietilenglicol de al menos 5.000 daltons y preferiblemente 15.000 daltons de peso molecular medio y un adyuvante, vehículo o diluyente adecuado. En un aspecto relacionado, la composición comprende además un compuesto seleccionado del grupo que consiste en L-glutamina recubierta con dextrano, inulina recubierta con dextrano, ácido butírico recubierto con dextrano, uno o más fructooligosacáridos, N-acetil-D-galactosamina, manosa recubierta con dextrano y galactosa, lactulosa y tampones de equilibrio y agentes estabilizantes, conocidos en la materia.

**[0023]** Un aspecto adicional de la descripción es un kit para el tratamiento terapéutico o la prevención de una afección anómala caracterizada por una superficie epitelial en riesgo de desarrollar un trastorno mediado por microbios, tal como septicemia de origen intestinal, que comprende una de las composiciones descritas antes y un protocolo que describe el uso de la composición en el tratamiento terapéutico o la prevención de la afección anómala. Los protocolos adecuados para incluir en el kit describen uno cualquiera de los procedimientos terapéuticos o preventivos descritos en el presente documento.

**[0024]** Otros aspectos más de la descripción se extraen de los procedimientos para prevenir una afección anómala caracterizada por una superficie epitelial en riesgo de un trastorno mediado por microbios, incluyendo enfermedades. Por ejemplo, la invención comprende un procedimiento para prevenir una enfermedad o una afección anómala que comprende administrar una composición que comprende una dosis eficaz de polietilenglicol (PEG) a un animal, en el que el PEG tiene un peso molecular medio de al menos 5.000 daltons. Una enfermedad o afección anómala adecuadas sensible a los procedimientos de prevención de la invención, se selecciona del grupo que consiste en oído de nadador, otitis media aguda, otitis media crónica, neumonía asociada con respirador, septicemia de origen intestinal, enterocolitis necrosante, diarrea inducida por antibióticos, colitis pseudomembranosa, una enfermedad inflamatoria del intestino, síndrome del intestino irritable, enterocolitis neutropénica, pancreatitis, síndrome de fatiga crónica, síndrome de disbiosis, colitis microscópica, una infección crónica del tracto urinario, una enfermedad de transmisión sexual e infección. Un animal adecuado como un sujeto para dichos procedimientos preventivos se selecciona del grupo que consiste en perro, gato, oveja, cabra, vaca, cerdo, pollo, caballo y ser humano. El PEG preferiblemente tiene un peso molecular medio de al menos 15.000 daltons; también se prefiere el PEG que tiene un peso molecular medio entre 15.000 daltons y 20.000 daltons. Además, el PEG puede ser una

disolución acuosa que comprende PEG al 10-20 %, y preferiblemente PEG al 10 %. La composición que se administra puede comprender además un vehículo seleccionado del grupo que consiste en una disolución líquida, un gel tópico, y una disolución adecuada para la nebulización. Además, la composición puede comprender además un compuesto seleccionado del grupo que consiste en L-glutamina recubierta con dextrano, inulina recubierta con dextrano, ácido butírico recubierto con dextrano, un fructooligosacárido, N-acetil-D-galactosamina, manosa recubierta con dextrano, galactosa y lactulosa. En una realización, la composición comprende PEG, L-glutamina recubierta con dextrano, inulina recubierta con dextrano, ácido butírico recubierto con dextrano, un fructooligosacárido, N-acetil-D-galactosamina, manosa recubierta con dextrano, galactosa y lactulosa.

**[0025]** Otro aspecto más de la descripción es un procedimiento para prevenir la infección en la piel, que comprende la etapa de aplicar una composición que comprende una cantidad eficaz de polietilenglicol (PEG) a un animal, en el que el PEG tiene un peso molecular medio de al menos 5.000 daltons. La composición puede comprender además un vehículo seleccionado del grupo que consiste en una pomada, una crema, un gel y una loción. La invención contempla que un agente causante de la infección se seleccione del grupo que consiste en *Bacillus anthracis*, virus de la viruela, *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroagregativa, (EAEC), *Clostridium difficile*, rotavirus, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacteria cloacae*, *Candida albicans* y *Candida glabrata*.

**[0026]** Otro aspecto de la descripción es un procedimiento para prevenir la infección respiratoria, que comprende la etapa de administrar una cantidad eficaz de polietilenglicol (PEG) a un animal, en el que el PEG tiene un peso molecular medio de al menos 5.000 daltons. Una infección respiratoria susceptible a los procedimientos preventivos de la invención puede surgir por el contacto con un agente infeccioso por cualquier ruta conocida en la materia, incluyendo neumonías asociadas con respiradores (p. ej., neumonía asociada con respirador), agentes infecciosos transmitidos por el aire, agentes infecciosos dispersados en un fluido nebulizado tal como por estornudos, y similares. En algunas realizaciones, el procedimiento previene la infección respiratoria por un agente seleccionado del grupo que consiste en *Bacillus arithracis* y virus de la viruela.

**[0027]** Otro aspecto más de la descripción, es un procedimiento para la irrigación de al menos una parte del tracto urinario con el fin de prevenir una infección crónica del tracto urinario, que comprende la etapa de suministrar a la uretra una cantidad eficaz de una composición que comprende PEG, en el que el PEG tiene un peso molecular medio de al menos 5.000 daltons. En una realización, la composición se administra a una parte del tracto urinario que incluye al menos la vejiga.

**[0028]** Otro aspecto más de la descripción es un procedimiento para prevenir una enfermedad de transmisión sexual que comprende la etapa de aplicar polietilenglicol (PEG) en un preservativo, en el que el PEG tiene un peso molecular medio de al menos 5.000 daltons. Un aspecto relacionado de la invención es un preservativo que comprende al menos un recubrimiento parcial con PEG que tiene un peso molecular medio de al menos 5.000 daltons. Otro aspecto más relacionado es un kit que comprende un preservativo y PEG que tiene un peso molecular medio de al menos 5.000 daltons.

**[0029]** La descripción también comprende un procedimiento para prevenir un trastorno del tracto digestivo que comprende administrar una dosis eficaz de una composición que comprende polietilenglicol (PEG) a un animal que lo necesite, en el que el PEG tiene un peso molecular medio de al menos 5.000 daltons. Los trastornos del tracto digestivo de ejemplo que son susceptibles a los procedimientos preventivos de la invención, se pueden seleccionar del grupo que consiste en enterocolitis necrosante neonatal, diarrea inducida por antibióticos, colitis pseudomembranosa, una enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedad del intestino irritable, enterocolitis neutropénica, pancreatitis, síndrome de disbiosis y colitis microscópica.

**[0030]** Otro aspecto de la descripción es un procedimiento para el seguimiento de la administración de polietilenglicol (PEG) a un animal que lo necesite, que comprende administrar una cantidad eficaz de una composición que comprende PEG marcado, en el que el PEG tiene un peso molecular medio de al menos 5.000 daltons, a un animal que lo necesite, y detectar el PEG marcado, de modo que la cantidad y/o localización del PEG marcado (p. ej., asociado con un microbio) proporciona información útil para evaluar la eficacia de la administración. En una realización del procedimiento de seguimiento, el marcador es un fluoróforo (p. ej., fluoresceína, rodamina, Cy3, Cy5). En otra realización del procedimiento, detectar el PEG marcado comprende la inspección endoscópica. El procedimiento de seguimiento también contempla que el PEG marcado se detecte en una muestra de heces (es decir, el PEG marcado se asocia con un componente tal como un microbio, cuya fuente es una muestra de heces). Además, el procedimiento de seguimiento puede comprender además un segundo marcador específico para un microbio y detectar el segundo marcador. "Específico" como se usa en este contexto significa que el marcador se asocia de forma detectable con al menos un microbio.

**[0031]** Otro aspecto de la descripción es un procedimiento para el seguimiento de la administración de

polietilenglicol (PEG) a un animal que lo necesite, que comprende obtener una muestra de un animal que recibe el polietilenglicol, en el que el PEG tiene un peso molecular medio de al menos 5.000 daltons, poner en contacto la muestra con una célula epitelial, y medir la adherencia de un microbio en la muestra a la célula epitelial, de modo que la cantidad y/o localización del PEG proporcionan información útil para evaluar la eficacia de la administración. La medición se puede llevar a cabo por examen microscópico.

**[0032]** Otro procedimiento de seguimiento de acuerdo con la descripción es un procedimiento para el seguimiento de la administración de polietilenglicol (PEG) a un animal que lo necesite, que comprende obtener una muestra de un animal que recibe el plietilenglicol, en el que el PEG tiene un peso molecular medio de al menos 5.000 daltons, poner en contacto la capa de células epiteliales con la muestra, y medir una resistencia eléctrica transepitelial de la capa de epitelio, de modo que la administración eficaz está indicada por una menor disminución de la resistencia eléctrica transepitelial respecto a un valor de control. El valor de control puede ser interno (es decir, medir la TEER antes de administrar el PEG) o externa (es decir, un valor desarrollado en otros estudios que se usa de forma fiable para la comparación).

**[0033]** Oro procedimiento más de seguimiento de la descripción es un procedimiento para el seguimiento de la administración de polietilenglicol (PEG) a un animal que lo necesite, que comprende obtener una muestra de un animal que recibe el plietilenglicol, en el que el PEG tiene un peso molecular medio de al menos 5.000 daltons, aislar un microbio de la muestra, y medir la hidrofobicidad de la superficie celular del microbio, de modo que la hidrofobicidad de cualquier microbio en la muestra proporciona información útil para evaluar la eficacia de la administración. "Aislado" como se usa en este contexto, significa separado de otros componentes de la muestra (p. ej., materia sólida) suficientemente para permitir las mediciones de hidrofobicidad, como se entendería en la materia.

**[0034]** Un aspecto relacionado de la descripción es un kit para el seguimiento de la administración de polietilenglicol, que comprende un PEG marcado y un protocolo que describe el uso del PEG marcado en el seguimiento de su administración. Los protocolos adecuados incluyen cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento o conocidos en la materia relacionados con la administración, suministro o aplicación de PEG. En algunas realizaciones de este aspecto de la invención, el kit además comprende un marcador libre.

**[0035]** Otro procedimiento más de seguimiento de la descripción es un procedimiento para el seguimiento de la administración de polietilenglicol (PEG) a un animal que lo necesite, que comprende obtener una muestra de un animal que recibe el polietilenglicol, en el que el PEG tiene un peso molecular medio de al menos 5.000 daltons, y detectar la actividad de la lectina PA-I/adhesina en la muestra, de modo que la actividad de la lectina PA-I/adhesina proporciona información útil para evaluar la eficacia de la administración. En una realización de este procedimiento la lectina PA-I/adhesina se detecta por unión a una pareja de unión de la lectina PA-I/adhesina, tal como cualquier forma conocida de un anticuerpo específico dirigido contra lectina PA-I/adhesina o un hidrato de carbono al que se une específicamente la lectina PA-I/adhesina. Un aspecto relacionado de la invención es un kit para el seguimiento de la administración de polietilenglicol (PEG) que comprende una pareja de unión de la lectina PA-I/adhesina y un protocolo que describe el uso de la pareja de unión para detectar la lectina PA-I/adhesina en la muestra. Los protocolos adecuados incluyen cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento o conocidos en la materia relacionados con el uso del PEG.

**[0036]** Otras características y ventajas de la presente descripción se entenderán mejor por referencia a la siguiente descripción detallada, incluyendo los dibujos y los ejemplos.

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

### [0037]

La figura 1 proporciona las tasas de mortalidad las 48 h de ratones a sometidos a laparotomía simulada o hepatectomía quirúrgica de 30 %, seguido de inyección directa de *P. aeruginosa* PA27853 en el intestino ciego. Los ratones se sometieron inmediatamente a una hepatectomía del lóbulo izquierdo isquémica de 30 %, seguido de inyección cecal directa de  $1 \times 10^7$  ufc/ml de PA27853. Cada grupo contenía 7 ratones. Los ratones de control se sometieron a laparotomía simulada seguida de inyección de cantidades iguales de PA27853 en el intestino ciego. Para los ratones en los grupos de PEG, se suspendieron  $1 \times 10^7$  ufc/ml de PA27853 en PEG 3,35 (PEG LMW 3.350) o PEG 15-20 (PEG HMW de 15.000 a 20.000 daltons) antes de la inyección cecal. Las curvas de respuesta a la dosis para PEG 15-20 se ven en el panel b. a. Se determinó un efecto protector estadísticamente significativo del PEG 15-20 por el ensayo exacto de Fischer ( $P < 0,001$ ). b. Se determinó que la concentración protectora mínima de PEG 15-20 era 5 % ( $P < 0,05$ ). c. Cultivos bacterianos cuantitativos de contenido cecal (heces), mucosa cecal lavada, hígado y sangre 24 horas después de hepatectomía quirúrgica de 30 % e inyección cecal directa de  $1 \times 10^7$  ufc/ml de PA27853. El análisis ANOVA de un factor demostró un aumento estadísticamente significativo de los recuentos bacterianos en el contenido cecal, mucosa, hígado y sangre en los ratones después de hepatectomía ( $P <$

0,001). Se observó una disminución significativa ( $P < 0,05$ ) de los recuentos bacterianos del hígado y la sangre para PEG 3350, mientras que PEG 15-20 previno completamente que PA27853 se diseminara al hígado y la sangre de los ratones.

5 La figura 2 muestra el efecto protector de PEG 15-20 frente a la disfunción de la barrera epitelial inducida por PA27853, evaluada por la resistencia eléctrica transepitelial (TEER). a. Los datos representan la media  $\pm$  ETM del % de caída máxima de la TEER respecto a los valores iniciales de cultivos ( $n = 7$ ) por triplicado, observados durante 8 horas de exposición apical a  $1 \times 10^7$  ufc/ml de PA27853. Se demostró una disminución estadísticamente significativa de la TEER (ANOVA de un factor ( $P < 0,001$ )) en células Caco-2 expuestas a PA27853. Se demostró un efecto protector estadísticamente significativo en la caída de la TEER inducida por PA27853 para PEG 15-20 ( $P < 0,001$ ).  
10 b. Imagen de células Caco-2 en presencia de PEG 3,35 y exposición apical a PA27853. Imágenes tomadas después de 4 horas de cocultivo demostraron la pérdida de la integridad de la monocapa con células que flotaban 30-40 micrómetros por encima del andamiaje celular que presentaban adherencia de PA27853 a las membranas celulares.  
15 c. Las células Caco-2 de exposición apical a PA27853 después de 4 horas en presencia de PEG 15-20 no mostraron pruebas de células flotando en ninguno de los planos examinados.

La figura 3 ilustra el efecto inhibitorio de los PEG en la expresión de PA-I en PA27853. a. Análisis de transferencia Western. La exposición de PA27853 a la molécula C4-HSL de señalización por percepción de quórum 1 mM produjo un aumento estadísticamente significativo ( $P < 0,001$ , ANOVA de un factor) en la expresión de la proteína PA-I que era parcialmente inhibida en presencia de PEG 3,35 al 10 % y mucho más inhibida con PEG 15-20 al 10 %. a'. La concentración inhibitoria mínima de PEG 15-20 en la expresión de PA-I inducida por C4-HSL era 5 % ( $P < 0,01$ ). b. La microscopía electrónica de células bacterianas individuales expuestas a C4-HSL en presencia y ausencia de PEG, demostró que C4-HSL producía un cambio morfológico en la forma y la expresión de los pili de *P. aeruginosa*. El efecto morfológico inducido por C4-HSL era eliminado completamente en presencia de PEG 15-20, pero no de PEG 3,35. Se puede ver un efecto de tipo halo alrededor de PA27853 expuesto a PEG 15-20. c. Hibridación Northern. La exposición de PA27853 a C4-HSL 0,1 mM dio como resultado un aumento estadísticamente significativo ( $P < 0,001$ , ANOVA de un factor) de la expresión del ARNm de PA-I que era inhibido en gran medida con PEG 15-20 al 10 %. d. El aumento del ARNm de PA-I inducido por la exposición de 4 horas a células Caco-2 era inhibido en presencia de PEG-15-20, pero no de PEG 3,35 ( $P < 0,001$ , ANOVA de un factor).  
20  
25  
30

La figura 4 muestra el efecto de disoluciones de PEG en la integridad de la membrana bacteriana y los patrones de crecimiento de PA27853. a. El efecto de las dos disoluciones de PEG en la integridad de la membrana bacteriana se evaluó por un procedimiento de tinción que consistía en SYTO9 y yoduro de propidio. Ninguna de las disoluciones de PEG tenía ningún efecto en la permeabilidad de la membrana bacteriana. b. Los patrones de crecimiento de PA27853 aparecían idénticos en las dos disoluciones de PEG con respecto al medio TSB exento de PEG (control).  
35

La figura 5 presenta imágenes de microscopía de fuerza atómica (AFM) de células Caco-2 y células bacterianas expuestas a PEG. a-c. Imágenes de AFM de células Caco-2 en presencia de medio solo (a), medio con PEG 3,35 (b), y medio con PEG 15-20. Se vio que PEG 3,35 formaba una alfombra lisa sobre las células Caco-2 (b), mientras que PEG 15-20 formaba una cubierta topográficamente más definida (c). d-f. Imágenes de AFM de PA27853 en PEG 3,35 y PEG 15-20. El PEG 3,35 formaba una envoltura lisa alrededor de las células bacterianas individuales (e) mientras que el PEG 15-20 no solo envolvía de forma apretada las células individuales (f), sino que también aumentaba el diámetro de polímero/bacteria (g, h), distanciando de este modo las bacterias individuales unas de otras.  
40  
45

La figura 6 muestra el efecto de la disolución de PEG en el patrón de dispersión/aglomeración de PA27853. El patrón de dispersión de las células bacterianas en placas dTC3 se observó directamente con un microscopio invertido de fluorescencia Axiovert 100 TV usando DIC y filtro de fluorescencia de GFP, con 63x aumentos del objetivo. La temperatura se ajustó con un sistema de control de la temperatura por termostato Bioprotechs. Se usaron lámparas de tungsteno (100 V) tanto para el DIC como para la excitación de GFP. Se usó el software de generación de imágenes 3D (Slidebook) de Intelligent Imaging Innovations para generar imágenes del patrón de dispersión de las células bacterianas en el plano Z usando el filtro de GFP. Se vieron células de *P. aeruginosa* planctónicas uniformemente dispersadas en el medio sin células Caco-2 en la imagen de DIC (6a<sub>1</sub>) y reconstrucción del plano Z (6a<sub>2</sub>). En presencia de células Caco-2, las células bacterianas desarrollaron un aspecto aglomerado (6b<sub>1</sub>) y se vieron adherentes a las células Caco-2 (6b<sub>2</sub>). El PEG 3350 al 10 % disminuyó la mortalidad de las bacterias e indujo la formación inmediata de microcolonias bacterianas con forma de hongo (6c<sub>1</sub>) que se adherían al fondo del pocillo (6c<sub>2</sub>). En presencia de células Caco-2, las microcolonias bacterianas estaban del orden de 8 micrómetros por encima del plano de las células epiteliales (6d<sub>1,2</sub>). El PEG 15-20 al 10 % disminuyó mucho la motilidad de las células de *P. aeruginosa*. Sin embargo, durante la primera 0,5-1 hora de incubación en medio que contenía PEG 15-20, las células bacterianas formaron microcolonias con forma de araña que estaban cerca del fondo del pocillo (6e<sub>1,2</sub>). Durante varias horas, las microcolonias con forma de patas de araña ocuparon el espacio/volumen entero del medio (no se muestra). En presencia de células Caco-2, las células de *P. aeruginosa* perdieron la configuración de tipo  
50  
55  
60

araña y se vieron elevadas por encima del plano del epitelio (30-40 micrómetros) (6f<sub>1,2</sub>).

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

5 **[0038]** La presente invención se define en las reivindicaciones que acompañan. La invención proporciona productos que presentan colectivamente procedimientos sencillos y económicos para el tratamiento y/o prevención de una variedad de trastornos epiteliales mediados por microbios, es decir, afecciones anómalas y enfermedades, que aquejan a muchos mamíferos, incluyendo los seres humanos. Mediante la administración de polietilenglicol de HMW a un animal que lo necesite, incluyendo aquellos en riesgo, se puede tratar cualquiera de una serie de afecciones anómalas peligrosas para la salud o potencialmente mortales, es decir, trastornos y enfermedades epiteliales, incluyendo la septicemia de origen intestinal, con un coste mínimo y una práctica mínima de los profesionales. Sin querer estar ligado por la teoría, los beneficios proporcionados por la invención están de acuerdo con el principio de que el trastorno epitelial mediado por microbios se puede prevenir, mejorar o tratar de forma satisfactoria, facilitando un entorno conducente a la supervivencia de dichos microbios. Se facilita la comprensión de la siguiente descripción más detallada de la invención estableciendo inicialmente los siguientes significados para los términos usados en esta descripción.

20 **[0039]** Una “afección anómala” se define de forma amplia para incluir enfermedades de mamíferos, trastornos de mamíferos y cualquier estado anómalo de salud de un mamífero, caracterizado por una superficie epitelial en riesgo de desarrollar un trastorno mediado por microbios. Las afecciones anómalas caracterizadas por una superficie epitelial en riesgo de desarrollar un trastorno mediado por microbios, incluyen afecciones en las que la superficie epitelial ha desarrollado un trastorno mediado por microbios. Las afecciones de ejemplo incluyen enfermedades humanas y trastornos humanos que requieren, o resultan de, la intervención médica, tal como una lesión por quemadura, enterocolitis neonatal, neutropenia grave, enfermedad inflamatoria del intestino, enteropatía (por ejemplo, del enfermo crítico) y rechazo de trasplante (por ejemplo, de órgano).

**[0040]** “Lesión por quemadura” significa el daño a un tejido de mamífero producido por la exposición del tejido al calor, por ejemplo en forma de una llama, vapor, fluido caliente y una superficie caliente.

30 **[0041]** “Neutropenia grave” tiene su significado corriente y habitual de una notable disminución del número de neutrófilos en la circulación.

**[0042]** “Rechazo de trasplante” se refiere a cualquier desarrollo del material trasplantado (p. ej., un órgano) que se reconoce asociado con el rechazo final de ese material por el organismo huésped.

35 **[0043]** “Administrar” tiene su significado corriente y habitual de suministrar por cualquier medio adecuado reconocido en la materia. Las formas de ejemplo de administración incluyen suministro oral, suministro anal, punción directa o inyección, aplicación tópica, y pulverización (p. ej., pulverizador de nebulización), aplicación de gel o fluido en un ojo, oído, nariz, boca, ano o abertura uretral.

40 **[0044]** Una “dosis eficaz” es la cantidad de una sustancia que proporciona un efecto beneficioso en el organismo que recibe la dosis, y puede variar dependiendo del propósito de la administración de la dosis, el tamaño y afección del organismo que recibe la dosis, y otras variables reconocidas en la materia como relevantes para determinar una dosis eficaz. El procedimiento para determinar una dosis eficaz implica procedimientos de optimización rutinarios que son conocidos por el experto en la materia.

**[0045]** Un “animal” tiene su significado convencional de un ser vivo que no es planta y no es protista. Un animal preferido es un mamífero, tal como un ser humano.

50 **[0046]** En el contexto de la presente descripción, “que necesita,” es un estado del organismo, órgano, tejido o célula que podría beneficiarse de la administración de una dosis eficaz a un organismo caracterizado por ese estado. Por ejemplo, un ser humano en riesgo de desarrollar septicemia de origen intestinal, o que presenta un síntoma de la misma, es un organismo que necesita una dosis eficaz de un producto, tal como una composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención.

55 **[0047]** “Peso molecular medio” tiene su significado corriente y habitual de la media aritmética de los pesos moleculares de sus componentes (p. ej., moléculas) de una composición, independientemente de la precisión de la determinación de esa media. Por ejemplo, el polietilenglicol, o PEG, que tiene un peso molecular medio de 3,5 kilodaltons puede contener moléculas de PEG de diferentes pesos moleculares, con la condición de que se determine que la media aritmética de esos pesos moleculares es 3,5 kilodaltons con algún nivel de precisión, que pueda reflejar una estimación de la media aritmética, como se entendería en la materia. De forma análoga, PEG 15-20 significa PEG cuyos pesos moleculares dan una media aritmética entre 15 y 20 kilodaltons, con las condiciones

de la media aritmética dadas antes. Estas moléculas de PEG incluyen, pero sin limitar, polímeros sencillos de PEG. Por ejemplo, se pueden unir una pluralidad de moléculas de PEG relativamente más pequeñas (p. ej., de 7.000 a 10.000 daltons), opcionalmente con una molécula conectora tal como un fenol, en una sola molécula que tiene un peso molecular medio mayor (p. ej., de 15.000 a 20.000 daltons).

5 **[0048]** “Integridad de la membrana celular” significa la ausencia relativa de modificaciones funcionales significativas de una membrana celular como componente funcional de una célula viva, como se entendería en la materia.

10 **[0049]** “Alterado de forma detectable” tiene su significado corriente y habitual de un cambio que se puede percibir usando métodos de detección adecuados en las circunstancias dadas, como se entendería en la materia.

15 **[0050]** “Patrón de crecimiento” se refiere colectivamente a los valores de aquellas propiedades de una célula, o grupo de células (p. ej., una población de células), que se reconoce en la materia como crecimiento celular característico, tal como la generación o el tiempo de duplicación de la célula, el aspecto de la topografía de un grupo de células en desarrollo, y otras variables que se reconoce en la materia que contribuyen al entendimiento del patrón de crecimiento de una célula o un grupo de células.

20 **[0051]** “Inhibir” tiene su significado corriente y habitual de inhibir, reducir o prevenir. Por ejemplo, inhibir el cambio morfológico significa que el cambio morfológico se hace más difícil o se previene completamente.

25 **[0052]** La “expresión de PA-I o lectina PA-I/adhesina” significa la producción o generación de una actividad característica de lectina PA-I/adhesina. Típicamente, la expresión de lectina PA-I/adhesina implica la traducción del ARNm que codifica la lectina PA-I/adhesina para producir un polipéptido de lectina PA-I/adhesina que tiene al menos una actividad característica de lectina PA-I/adhesina. Opcionalmente, la lectina PA-I/adhesina incluye además la transcripción de un ADN que codifica la lectina PA-I/adhesina para producir el ARNm mencionado antes.

30 **[0053]** “Activación inducida por el epitelio” se refiere a un aumento de la actividad de un objetivo dado (p. ej., lectina PA-I/adhesina) mediante la influencia directa o indirecta de una célula epitelial. En el contexto de la presente invención, por ejemplo, la activación de la lectina PA-I/adhesina inducida por el epitelio se refiere a un aumento de la actividad de ese polipéptido que se puede atribuir a la influencia indirecta de un epitelio, puesto de manifiesto por el contacto directo de una célula o células epiteliales con un patógeno intestinal.

35 **[0054]** “Cambio morfológico” tiene su significado corriente y habitual de una alteración de la forma.

**[0055]** “Patógeno intestinal” significa un microbio patógeno capaz de causar, completamente o en parte, septicemia de origen intestinal en un animal tal como un ser humano. Los patógenos intestinales conocidos en la técnica están englobados en esta definición, incluyendo bacilos gram negativos tales como *Pseudomonas* (p. ej., *Pseudomonas aeruginosa*).

40 **[0056]** “Mejorar” significa reducir el grado o la gravedad, de acuerdo con su significado corriente y habitual.

45 **[0057]** “Quórum patógeno” significa la agregación o asociación de un número suficiente de organismos patógenos (p. ej., *P. aeruginosa*) para iniciar o mantener una señal por percepción de quórum, como se conoce en la materia.

**[0058]** “Interacción” tiene su significado corriente y habitual de acción recíproca, tal como la acción recíproca entre dos o más productos biológicos, tales como moléculas, células, y similares.

50 **[0059]** “Resistencia eléctrica transepitelial”, o TEER, tiene el significado que ha adquirido esta frase en la materia, que se refiere a una medición de la resistencia eléctrica a través del tejido epitelial, que no es únicamente útil en la evaluación del estado de las uniones estrechas entre células epiteliales en un tejido epitelial.

**[0060]** “Adherencia” tiene su significado corriente y habitual de asociación física durante un periodo más largo que un periodo de tiempo transitorio.

55 **[0061]** “Topográficamente asimétrico” se refiere a una imagen, mapa u otra representación de la superficie de un objeto tridimensional (p. ej., una célula) que no es simétrico.

60 **[0062]** “Microscopía de fuerza atómica”, conocida también como microscopía de fuerza de barrido, es una técnica para adquirir un mapa topográfico de alta resolución de una sustancia mediante una sonda de micropalanca que cruza la superficie de una muestra en un barrido de trama y usando medios muy sensibles para detectar deflexiones de la sonda, como se entiende en la materia.

[0063] “Composición farmacéutica” significa una formulación de compuestos adecuada para la administración terapéutica, a un animal vivo, tal como un paciente humano. Las composiciones farmacéuticas preferidas de acuerdo con la invención, comprenden una disolución equilibrada en viscosidad, perfil de electrolitos y osmolalidad, que comprende un electrolito, L-glutamina recubierta con dextrano, inulina recubierta con dextrano, lactulosa, D-galactosa, N-acetil-D-galactosamina y PEG al 5-20 % (15.000-20.000).

[0064] “Adyuvantes”, “vehículos” o “diluyentes” tienen todos los significados que estos términos han adquirido en la materia. Un adyuvante es una o más sustancias que sirven para prolongar la inmunogenicidad de un inmunógeno coadministrado. Un vehículo es una o más sustancias que facilitan la manipulación, tal como por traslocación de una sustancia que es transportada. Un diluyente es una o más sustancias que reducen la concentración, o diluyen, una sustancia dada expuesta al diluyente.

[0065] “PEG HMW” se refiere al PEG de peso molecular relativamente alto definido con un peso molecular medio mayor que 3,5 kilodaltons. Preferiblemente, el PEG HMW tiene un peso molecular medio mayor que 5 kilodaltons, y en realizaciones particulares, el PEG HMW tiene un peso molecular medio de al menos 8 kilodaltons, al menos 15 kilodaltons, y entre 15 y 20 kilodaltons.

[0066] Los siguientes ejemplos ilustran aspectos de la descripción. El ejemplo 1 describe la protección frente a la septicemia de origen intestinal proporcionada por el PEG de alto peso molecular a ratones hepatectomizados. El ejemplo 2 describe cómo el PEG HMW previene la adherencia de patógenos a las células del epitelio intestinal. El ejemplo 3 pone de manifiesto cómo el PEG HMW inhibe la expresión de la virulencia patógena en general, y de forma específica la expresión de lectina PA-I/adhesina. El ejemplo 4 muestra que el PEG no afecta al crecimiento o a la integridad de la membrana celular de los patógenos. El ejemplo 5 ilustra la conformación topográfica única de los patógenos recubiertos con PEG HMW usando microscopía de fuerza atómica. El ejemplo 6 describe las interacciones célula-célula afectadas por el PEG HMW. El ejemplo 7 describe procedimientos preventivos usando las composiciones de la invención. El ejemplo 8 (referencia) describe procedimientos para el seguimiento de la administración del PEG HMW, tal como en los procedimientos de tratamiento de la descripción, y los kits correspondientes.

## EJEMPLO 1

### El PEG HMW protege frente a la septicemia de origen intestinal después de hepatectomía de 30 %

[0067] Se anestesiaron ratones Balb/c macho y se sometieron a hepatectomía usando un protocolo convencional. Se llevó a cabo una escisión isquémica de 30 % del hígado a lo largo del lóbulo izquierdo blando. Los ratones de control experimentaron una manipulación del hígado sin hepatectomía. Los grupos experimental y de control contenían cada uno 7 ratones. Se inyectó a todos los ratones un volumen de 200  $\mu$ l de  $10^7$  ufc/ml de *Pseudomonas aeruginosa* PA27853 en la base del intestino ciego mediante punción directa con aguja, diluido en disolución salina, PEG 3,350 o PEG 15-20 (los PEG). Los PEG de peso molecular relativamente bajo están disponibles en el comercio; el PEG 15-20, que tiene un peso molecular medio de 15.000 a 20.000 daltons, es una combinación de PEG 7-8 y PEG 8-10 unidos covalentemente a un anillo de fenol. El PEG 7-8 tiene un peso molecular medio de 7.000 a 8.000 daltons y el PEG 8-10 tiene un peso molecular medio de 8.000 a 10.000 daltons. Un experto en la materia reconocerá que los PEG HMW incluyen compuesto que tienen cualquiera de una variedad de subunidades de PEG, teniendo cada subunidad cualquiera de una variedad de pesos moleculares, unidos entre sí o a una o más moléculas conectoras preferiblemente de forma covalente, que son moléculas relativamente pequeñas que tienen grupos funcionales adecuados para la unión de moléculas de PEG. Los conectores adecuados conservan sustancialmente la actividad biológica del PEG HMW (conservación de suficiente actividad biológica para dar un efecto profiláctico o terapéutico beneficioso como se describe en el presente documento).

[0068] Con el fin de proporcionar una fuente constante de PEG durante las 48 h de duración del experimento, la aguja se dirigió al intestino delgado (íleo) y se inyectó una inyección retrógrada de 1 ml de disolución salina, PEG 3,35 o PEG 15-20 en el intestino proximal. El sitio de la punción se sujetó con una sutura de seda y el intestino ciego se limpió con torunda con alcohol. Los ratones se devolvieron a sus jaulas y se les dio H<sub>2</sub>O solo durante las siguientes 48 horas.

[0069] Las curvas de respuesta a la dosis para el PEG 15-20 se ven en el panel b en la figura 1. a. Se determinó un efecto protector estadísticamente significativo del PEG 15-20 por el ensayo exacto de Fischer ( $P < 0,001$ ). b. Se determinó que la concentración protectora mínima de PEG 15-20 era 5 % ( $P < 0,05$ ). c. Cultivos bacterianos cuantitativos de contenido cecal (heces), mucosa cecal lavada, hígado y sangre 24 horas después de hepatectomía quirúrgica del 30 % e inyección cecal directa de  $1 \times 10^7$  ufc/ml de PA27853. El análisis ANOVA de un factor demostró un aumento estadísticamente significativo de los recuentos bacterianos en el contenido cecal, mucosa,

hígado y sangre en los ratones después de hepatectomía ( $P < 0,001$ ). Se observó una disminución significativa ( $P < 0,05$ ) en los recuentos bacterianos del hígado y la sangre para PEG 3350, mientras que PEG 15-20 previno completamente que PA27853 se diseminara al hígado y la sangre de los ratones.

5 **[0070]** La cepa de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (PA27853) es un aislado clínico no mucóide de un cultivo de sangre. La inyección cecal directa de la cepa PA27853 en ratones sometidos previamente a hepatectomía quirúrgica isquémica de 30 % dio como resultado un estado de septicemia clínica y sin supervivientes a las 48 horas. Los ratones sometidos a laparotomía simulada sin hepatectomía (controles), a los que se inyectó de forma similar *P. aeruginosa*, sobrevivieron completamente sin ningún signo clínico de septicemia (fig. 1a). Para determinar la capacidad de las disoluciones de PEG para prevenir o disminuir la mortalidad en este modelo, se suspendieron 200  $\mu\text{l}$  de PA27853 en una concentración de  $1 \times 10^7$  ufc/ml, en una de dos disoluciones de polietilenglicol al 10 % (p/v) (PEG 3,35 frente a PEG 15-20). Se eligió PEG 3,35 ya que representa el peso molecular de los PEG que han estado disponibles para uso clínico durante los últimos 25 años (Golytely®). En comparación, las disoluciones de PEG de acuerdo con la invención que se usaron tenían pesos moleculares que variaban entre 15-20 kDa. Las cepas suspendidas se introdujeron en el intestino ciego mediante punción directa. El PEG 3,35 no tenía efecto en la mortalidad de los ratones después de hepatectomía, mientras que el PEG 15-20 era completamente protector. De hecho, el PEG 15-20 tenía un efecto protector estadísticamente significativo, determinado por el ensayo exacto de Fisher ( $P < 0,001$ ). Los experimentos de dosis-respuesta demostraron que una disolución al 5 % era la concentración mínima de PEG 15-20 que era completamente protectora ( $P < 0,05$ ; véase la figura 1b), aunque un experto en la materia reconocerá que se espera que las disoluciones de PEG HMW de menos de 5 % proporcionen alguna protección y, por lo tanto, están dentro del alcance de la presente invención. Con respecto a los recuentos bacterianos en los ratones experimentales y de control, el análisis de varianza de un factor (ANOVA) demostró un aumento estadísticamente significativo de los recuentos bacterianos en el contenido cecal, mucosa, hígado y sangre en los ratones después de hepatectomía ( $P < 0,001$ ). Se observó una disminución significativa ( $P < 0,05$ ) en los recuentos bacterianos del hígado y la sangre para PEG 3350, mientras que el PEG 15-20 previno completamente que PA27853 se diseminara al hígado y la sangre de los ratones. El PEG 15-20 inhibió completamente la diseminación intestinal de PA27853 al hígado y el torrente sanguíneo (Fig. 1c). Los datos indican que la acción de las disoluciones de PEG implican mecanismos que no son microbicidas. Dado en concentraciones de PEG no tóxicas para células de mamífero (es decir,  $\leq$  aproximadamente 10 %), no se pudo demostrar efecto en los patrones de crecimiento bacteriano.

**[0071]** El ejemplo demuestra que el PEG HMW reduce la tasa de mortalidad atribuible a la septicemia de origen intestinal en ratones sometidos a intervención quirúrgica en forma de una hepatectomía parcial. Este modelo de ratón indica que la terapia con PEG HMW es útil para reducir la tasa de mortalidad de una especie animal (es decir, reducir la probabilidad de mortalidad en cualquier organismo dado), tal como un mamífero como el hombre, sometido a una agresión fisiológica tal como una cirugía invasiva (p. ej., hepatectomía parcial). Se espera que la terapia con PEG HMW será eficaz para prevenir la muerte o enfermedad grave asociada con la septicemia cuando se implementa después de la agresión fisiológica (p. ej., durante los cuidados posoperatorios). Además, la terapia con PEG HMW se puede usar antes de la agresión fisiológica (p. ej., cuidados preoperatorios), en circunstancias en las que se puede predecir la introducción de agresión, para reducir el riesgo de enfermedad grave o muerte. La terapia con PEG HMW también es útil para mejorar un síntoma asociado con una enfermedad o afección anómala asociada con la septicemia de origen intestinal.

## EJEMPLO 2

### El PEG HMW previene la adherencia de patógenos al epitelio intestinal

**[0072]** Las uniones estrechas son elementos dinámicos del citoesqueleto de las células epiteliales, que tienen una función clave en la función de barrera del tracto intestinal de mamífero. *P. aeruginosa* produce una alteración profunda en la permeabilidad de las uniones estrechas, medido por la resistencia eléctrica transepitelial (TEER) tanto de células Caco-2 como T-84. Las células Caco-2 son células epiteliales de colon humano bien caracterizadas que mantienen una TEER estable en cultivo, y esta línea celular proporciona un modelo in vitro reconocido del comportamiento in vivo de los patógenos intestinales. Para determinar el efecto protector de PEG en la disminución inducida por *P. aeruginosa* PA27853 de la TEER de monocapas de Caco-2 cultivadas, se inocularon apicalmente  $1 \times 10^7$  ufc/ml de PA27853 en dos monocapas de células Caco-2 en presencia de PEG 3,35 al 10 % o PET-15-20 al 10 %. Se midió la TEER de forma seriada durante 8 horas y se registró la caída máxima de la TEER.

**[0073]** Solo el PEG 15-20 protegió significativamente frente a la disminución de la TEER inducida por *P. aeruginosa* (Fig. 2a). Los datos presentados en la fig. 2 representan la media  $\pm$  ETM del % de caída máxima de la TEER respecto a los valores iniciales de cultivos ( $n = 7$ ) por triplicado, observados durante 8 horas de exposición apical a  $1 \times 10^7$  ufc/ml de PA27853. Se puso de manifiesto una disminución estadísticamente significativa de la TEER, demostrada en células Caco-2 expuestas a PA27853, por análisis ANOVA de un factor ( $P < 0,001$ ). Se

demostró un efecto protector estadísticamente significativo en la caída de la TEER inducida por PA27853, para el PEG 15-20 ( $P < 0,001$ ). La figura 2b muestra células Caco-2 en presencia de PEG 3,35 y con exposición apical a PA27853. Después de 4 horas de cocultivo en presencia de PEG 3,35, se observó la alteración de las monocapas de células Caco-2 que presentaban bacterias adherentes en forma focal, con células que flotaban 30-40 micrómetros por encima del andamiaje de la monocapa (fig. 2b). En contraste, la figura 2c, que muestra imágenes de células Caco-2 con exposición apical a PA27853 durante 4 horas en presencia de PEG 15-20 no mostraron pruebas de células flotando en ninguno de los planos examinados. El efecto protector de PEG 15-20 en la integridad de las células Caco-2 se asoció con menos adherencia bacteriana, reflejada por una recuperación 15 veces mayor de bacterias en los líquidos sobrenadantes celulares después de una exposición de 4 horas a  $1 \times 10^6$  ufc/ml de PA27853.

**[0074]** La resistencia de las células del epitelio intestinal humano cultivadas con PEG a los efectos de alteración de la barrera de *P. aeruginosa*, considerado por el mantenimiento de la TEER, ofrecen un procedimiento práctico para estabilizar la función de barrera de uniones estrechas frente a un desafío de invasión de patógenos. Una prueba adicional del valor terapéutico del PEG 15-20 es que la función de transporte epitelial (intercambio de  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , transporte de glucosa) no es afectada por este compuesto.

**[0075]** Por lo tanto, el PEG HMW es relativamente inerte, y tiene un efecto de estabilización en la barrera del epitelio intestinal. La descripción comprende procedimientos de tratamientos de anomalías de la barrera intestinal asociadas con patógenos intestinales tales como *P. aeruginosa*, por administración de PEG HMW a un animal tal como un mamífero y, preferiblemente un ser humano. Una anomalía de la barrera intestinal se puede poner de manifiesto por cualquier técnica de diagnóstico, u otros medios, conocidos en la materia. Sin embargo, no es necesario identificar una anomalía de la barrera intestinal antes del tratamiento con PEG HMW. El bajo coste y el alto grado de seguridad asociados con el tratamiento con PEG HMW hace que este procedimiento sea adecuado tanto para aplicaciones profilácticas, preferiblemente dirigidas a organismos en riesgo, así como para tratamientos aplicados a animales que presentan al menos un síntoma característico de una anomalía de la barrera intestinal. Los tratamientos con PEG HMW mejorarán un síntoma asociado con una anomalía de la barrera intestinal; preferiblemente, los tratamientos reducirán o eliminarán los efectos de la septicemia de origen intestinal de un organismo tratado.

### EJEMPLO 3

#### El PEG HMW inhibe la expresión de virulencia en patógenos

**[0076]** La expresión de la lectina PA-I/adhesina en *P. aeruginosa* PA27853 aumentó en el intestino ciego de ratones después de hepatectomía y tenía una función clave en el efecto letal de *P. aeruginosa* en el intestino de ratón. PA-I funciona como un determinante significativo de la virulencia en el intestino de ratón facilitando la adherencia de PA27853 al epitelio, así como creando un defecto significativo en la barrera para las citotoxinas, exotoxina A y elastasa. La expresión de PA-I en *P. aeruginosa* es regulada por el regulador transcripcional RhIR y su activador cognado C4-HSL. La expresión de PA-I en PA27853 no solo aumentó por la exposición a C4-HSL, sino también por el contacto con células Caco-2, preparaciones de membranas de células Caco-2, y líquidos sobrenadantes de cultivos de células Caco-2.

**[0077]** Se usó la hibridación Northern para analizar la expresión de PA-I a nivel de la transcripción. Se aisló el ARN total de *P. aeruginosa* por el procedimiento de tres detergentes modificado. Las sondas se generaron por PCR usando los cebadores de PA-I: F(ACCCTGGACATTATTGGGTG) (SEQ ID NO: 1), R(CGATGTCATTACCATCGTCG) (SEQ ID NO: 2) y cebadores 16S: F(GGACGGTGAGTAATGCCTA) (SEQ ID NO: 3), R(CGTAAGGGCCATGATGACTT) (SEQ ID NO: 4), y se clonaron en el vector pCR2.1 (Invitrogen, Inc.). Los insertos eran secuencias que se correspondían con la secuencia de PA-I o de 16S. Las sondas específicas de ADNc para PA-I y 16S se radiomarcaron con  $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP. La radiactividad específica se midió mediante un Storm 860 Phosphorimager (Molecular Dynamics, CA), y se calculó el porcentaje relativo de los cambios comparado con el control, basándose en la relación de intensidades de PA-I y 16S. La transferencia Western se usó para el análisis de proteínas PA-I, usando anticuerpos policlonales de conejo dirigidos contra PA-I, purificados por afinidad. Se lavaron 1 millón de células de *P. aeruginosa* con PBS y se calentaron a 100 °C en tampón de lisis (SDS al 4 %, Tris-HCl 50 mM, pH 6,8); se llevaron a cabo ensayos de inmunotransferencia por electrotransferencia de proteínas después de tricina-SDS-PAGE. La lectina PA-I se detectó por el reactivo de ECL (Amersham, NJ).

**[0078]** La exposición de *P. aeruginosa* PA27853 a la molécula de señalización por percepción de quórum C4-HSL dio como resultado un aumento estadísticamente significativo ( $P < 0,001$ , ANOVA de un factor) de la expresión de la proteína PA-I que era parcialmente inhibido en presencia de PEG 3,35 al 10 % e inhibido en mucha mayor extensión por PEG 15-20 al 10 % (Fig. 3). La concentración mínima completamente inhibidora de PEG 15-20 de la expresión de PA-I inducida por C4-HSL era 5 % ( $P < 0,01$ , ANOVA de un factor). El examen con microscopio electrónico de las

células bacterianas individuales expuestas a C4-HSL en presencia y ausencia de PEG, demostró que C4-HSL causaba un cambio morfológico en la forma y la expresión de los pili de *P. aeruginosa* (Fig. 3b). El efecto morfológico inducido por C4-HSL era eliminado completamente en presencia de PEG 15-20, pero no completamente eliminado en presencia de PEG 3,35. Se vio un efecto de tipo halo alrededor de PA27853 expuestas a PEG 15-20 (Fig. 3b). La exposición de PA27853 a C4-HSL 0,1 mM dio como resultado un aumento estadísticamente significativo ( $P < 0,001$ , ANOVA de un factor) de la expresión del ARNm de *PA-I* usando transferencias Northern. La expresión de *PA-I* fue muy inhibida por el PEG 15-20 al 10 %. La figura 3d muestra que el aumento del ARNm de *PA-I* inducido por una exposición de 4 horas a las células Caco-2, era inhibido por el PEG-15-20, pero no por el PEG 3,35 ( $P < 0,001$ , ANOVA de un factor).

**[0079]** Los datos presentados en el presente documento muestran que se observó una atenuación significativa (disminución de 3-4 veces) de la expresión de *PA-I* (proteína y ARNm) en PA27853, inducida por C4-HSL 100  $\mu$ M-1 mM, cuando las bacterias se trataron previamente con PEG 15-20 al 10 %. El efecto no se observó con PEG 3,35 (Fig. 3a). La atenuación de la expresión de *PA-I* inducida por C4-HSL también se observó para PEG 3,35 al 10 %, aunque el grado de atenuación era significativamente menor que con PEG 15-20 al 10 %. La concentración mínima de PEG 15-20 que inhibía la expresión de la proteína *PA-I* inducida por C4-HSL era 5 % (Fig. 3b). La microscopía electrónica de las células bacterianas individuales expuestas a C4-HSL demostró que C4-HSL producía un cambio morfológico en la forma y la expresión del pili de PA27853 (Fig. 3b). El efecto morfológico inducido por C4-HSL era eliminado completamente en presencia de PEG 15-20, pero no con PEG 3,35 (Fig. 3b). La expresión de *PA-I* (ARNm), inducida por 4 horas de exposición a células Caco-2, era inhibida en presencia de PEG 15-20 pero no de PEG 3,35 (Fig. 3b). El efecto protector de la expresión de *PA-I* inducida por células Caco-2 con PEG 15-20 persistía en los experimentos de exposición durante la noche.

**[0080]** PEG HMW también afecta a la expresión de la virulencia de *P. aeruginosa* en respuesta a estímulos conocidos. La atenuación de la expresión de *PA-I* inducida por C4-HSL en PA27853, puede ser un efecto protector principal de PEG 15-20, dado que la señalización por percepción de quórum es un mecanismo bien establecido de expresión de la virulencia para este patógeno. La interferencia inducida por PEG 15-20 con la expresión de *PA-I* inducida por células Caco-2 se espera que sea un aspecto importante del efecto protector de PEG 15-20. Se encontró que PEG 15-20 tenía un efecto protector en animales huésped a través de la atenuación de la expresión de *PA-I* de *P. aeruginosa* (PA27853) en respuesta al contenido cecal (heces) filtrado de ratones, después de hepatectomía de 30 %. La capacidad de PEG 15-20 para proteger a *P. aeruginosa* de factores del huésped que aumentan la expresión de su virulencia, se espera que sea otro mecanismo más por el cual los organismos están protegidos de la septicemia de origen intestinal.

**[0081]** Por consiguiente, la descripción incluye materiales en forma de kits y los correspondientes procedimientos de administración de PEG HMW a un animal para prevenir o tratar una afección caracterizada por la expresión de un factor o determinante de la virulencia por un patógeno intestinal, tal como uno de pseudomonas. Un determinante de la virulencia puede contribuir a la virulencia directa o indirectamente. Un ejemplo de una contribución indirecta es el efecto de la lectina *PA-I/adhesina* de *P. aeruginosa* en la adherencia intestinal del patógeno al epitelio intestinal y/o la generación de un defecto en la barrera para las citotoxinas, exotoxina A y elastasa.

#### EJEMPLO 4

##### El PEG no afecta al crecimiento celular o a la integridad de la membrana celular de los patógenos

**[0082]** Se evaluó el efecto de dos disoluciones de PEG (PEG 3,35 y PEG 15-20) en la integridad de la membrana bacteriana mediante un procedimiento de tinción que consistía en SYTO9 y yoduro de propidio. Ninguna de las disoluciones de PEG tenía ningún efecto en la permeabilidad de la membrana bacteriana (Fig. 4a). La integridad de la membrana se determinó usando un kit de viabilidad de bacterias vivas/muertas L-3152 (Molecular Probes). Las bacterias se cuantificaron y los recuentos se expresaron como ufc/ml mediante cultivo en placa de diluciones de 10 veces de las muestras tomadas en diferentes tiempos de incubación. Las curvas de crecimiento para el crecimiento de *P. aeruginosa* durante la noche en medio TSB que contenía cualquiera de las dos disoluciones de PEG no demostraron efecto inhibitorio por ninguna de las disoluciones de PEG en la cantidad de bacterias (Fig. 4b). De hecho, el patrón de crecimiento en cada uno de los medios que contenía PEG era indistinguible del patrón de crecimiento del medio TSB exento de PEG. Se midió la actividad de una enzima de mantenimiento implicada en el metabolismo energético, la lactato deshidrogenasa (LDH) en diferentes tiempos de medición durante las fases de crecimiento exponencial y estacionaria. La actividad de la LDH se midió en un ensayo enzimático de diaforasa acoplada usando una mezcla de sustratos Cyto Tox 96 (Promega). La concentración de proteínas se determinó usando el ensayo de proteína BCA (Pierce). No se observó cambio en la actividad de la LDH en los líquidos sobrenadantes exentos de células de *P. aeruginosa* desarrollada en presencia de los PEG. Los resultados de este experimento indican que el PEG HMW tiene un efecto insignificante en los patrones de crecimiento bacteriano.

**[0083]** Los procedimientos descritos en el presente documento, y los productos correspondientes (p. ej., kits), proporcionan el beneficio de prevenir o tratar enfermedades o afecciones anómalas asociadas con la septicemia de origen intestinal sin una influencia significativa en la composición de la flora intestinal. Igualmente, los procedimientos y productos descritos en el presente documento se pueden usar para mejorar un síntoma asociado con dichas enfermedades o afecciones anómalas sin cambio significativo de la composición microbiana del intestino. Un experto en la materia reconoce que los procedimientos (y kits) que no alteran significativamente la composición de la flora intestinal son deseables en la medida en que no se espera que dichos procedimientos conduzcan a complicaciones secundarias de salud que surgen de dicha alteración.

## 10 EJEMPLO 5

### **Microscopía de fuerza atómica de patógeno recubierto con PEG**

**[0084]** Se subcultivaron partes alícuotas de 1 % de un cultivo de PA27853 cultivado durante la noche, en caldo de soja triptico (TSB), con o sin PEG HMW al 10 %, durante 4 horas a 37 °C. Se extrajo una gota de cada subcultivo y las células de *P. aeruginosa* PA27853 se lavaron exhaustivamente con PBS, se secaron sobre la placa de mica con soplado de aires durante 10 min, y se generaron las imágenes inmediatamente. La generación de imágenes de las bacterias secas por AFM en el modo de contacto intermitente se llevó a cabo en aire con un microscopio de sonda de barrido Multimode Nanoscope IIIA (MMAFM, Digital Instruments). Las células Caco-2 subconfluentes se trataron con PEG HMW al 10 % durante 4 horas y se lavaron exhaustivamente con PBS. La generación de imágenes por AFM de las células se llevó a cabo en PBS sin usar junta tórica. Para la microscopía electrónica, se inoculó PA27853 en TSB con o sin C4-HSL 1 mM y PEG HMW al 10 % y se incubó durante la noche. Se tiñó una gota de *P. aeruginosa* al 1 % con acetato de uranilo y se lavó con NaCl 0,5 M antes del examen con el microscopio electrónico.

**[0085]** La microscopía de fuerza atómica de las células Caco-2 demostró una superficie no uniforme clásica con microvellosidades de borde en cepillo, mientras que las células Caco-2 expuestas a PEG 3,35 demostraron un aspecto plano liso en la superficie de las células epiteliales (figuras 5a, c). Parecía que el PEG 15-20 alfombraba las células Caco-2 llenando las asimetrías a lo largo de un plano topográficamente definido (fig. 5e), dando una cubierta más compleja topográficamente defina. De manera algo similar, las células PA27853 expuestas a PEG 35,3 demostraron un patrón de recubrimiento liso del polímero en las células bacterianas en un patrón plano difuso (fig. 6d), mientras que parecía que el PEG 15-20 rodeaba y envolvía ajustadamente las bacterias de forma circunferencial en una forma topográficamente más asimétrica. El análisis del corte transversal de la medición de fuerza atómica del diámetro bacteriano en PEG 15-20 demuestra un aumento significativo de la envuelta de bacteria/PEG con la disolución de PEG (fig. 5e, f). En otras palabras, el PEG 3,35 forma una envuelta suave alrededor de las células bacterianas individuales (fig. 5e), mientras que el PEG 15-20 envuelve estrechamente las células individuales (fig. 5f) y aumenta el diámetro del polímero/bacteria (figuras 5g, 5h), distanciando así unas de otras las células de bacterias individuales.

**[0086]** Sin querer estar ligados por la teoría, el PEG HMW puede ejercer su efecto beneficioso por el mero distanciamiento físico de *P. aeruginosa* del epitelio intestinal. Alternativamente, el PEG HMW proporciona beneficios previniendo la formación de una señal de activación patógena por percepción de quórum que surge de la interacción célula-célula de las células patógenas. Otra vez, sin querer estar ligados por la teoría, es posible que el recubrimiento de superficies biológicas con el PEG HMW produzca la pérdida de libertad conformacional de las cadenas de PEG de recubrimiento y la repulsión de las proteínas que se acercan. Las interacciones polar-polar entre el PEG HMW y las células Caco-2 podrían afectar a la elasticidad de las cadenas de PEG, constriñendo algunas cadenas laterales del PEG HMW a una construcción molecular que repele la proteína. Los datos presentados en el presente documento apoyan la conclusión de que las células Caco-2 recubiertas con PEG HMW son más repelentes a *P. aeruginosa* que las células Caco-2 no recubiertas, quizás debido a una pérdida de la "entropía conformacional" como resultado de alguna interacción dinámica del PEG HMW con las células Caco-2.

**[0087]** Los resultados de este experimento establecen que el tratamiento con PEG HMW tiene un efecto en las células tratadas, que afecta notablemente a la topología de la superficie de dichas células. Además, el efecto de la exposición a PEG HMW en dichas células es diferente del efecto que el PEG 3,35 tiene en dichas células. Sin querer estar ligado por la teoría, los resultados descritos en el presente documento proporcionan una correlación física para el efecto notablemente diferente en las células presentado por el PEG HMW con respecto a los PEG de menor peso molecular, como PEG 3,35.

## 60 EJEMPLO 6

### **El PEG HMW afecta a las interacciones célula-célula**

**[0088]** Para observar directamente el efecto de las disoluciones de PEG en la orientación espacial de *P.*

*aeruginosa*, se realizaron experimentos con cepas vivas de *P. aeruginosa* PA27853/EGFP que albergaba el gen *egfp* que codifica la proteína verde fluorescente. Los experimentos se realizaron en presencia y ausencia de células Caco-2. Con el fin de generar las imágenes del efecto de los PEG tanto en las bacterias como en su interacción con el epitelio cultivado, se usaron la microscopía de contraste por interferencia diferencial (DIC) y la generación de imágenes con GFP.

**[0089]** El gen de EGFP que codifica la proteína verde fluorescente se amplificó usando el plásmido pBI-EGFP (Clontech) como molde. Se introdujeron los sitios de restricción *Xba*I y *Pst*I usando los cebadores TCTAGA ACTAGTGGATCCCCGCGGATG (SEQ ID NO: 5) y GCAGACTAGGTGACAAGCTTGATATC (SEQ ID NO: 6). El producto de la PCR se clonó directamente en el vector pCR 2.1 usando un kit de clonación de TA (Invitrogen), seguido de transformación de la construcción pCR2.1/EGFP en *E. coli* DH5a. El gen de EGFP se escindió de esta construcción mediante digestión con *Xba*I y *Pst*I, y el fragmento que contenía el gen escindido se clonó en el vector lanzadera de *E. coli*-*P. aeruginosa* pUCP24, que se había digerido con las mismas enzimas de restricción. La construcción resultante (es decir, pUCP24/EGFP), que contenía el gen de EGFP en el vector lanzadera, se electroporó a 25  $\mu$ F y 2500 V en células electrocompetentes PA27583. Las células que contenían PA27853/EGFP se seleccionaron en placas de LB-agar que contenían gentamicina (Gm) 100  $\mu$ g/ml.

**[0090]** Las células que albergaban PA27853/EGFP se cultivaron durante la noche en LB que contenía Gm 100  $\mu$ g/ml y 1 % del cultivo se usó para inocular LB de nueva aportación que contenía Gm 50  $\mu$ g/ml. Después de 3 horas de crecimiento, se añadió isopropil- $\beta$ -D-galactopiranosido (IPTG) hasta una concentración final de 0,5 mM, y los cultivos se incubaron durante 2 h adicionales. Se mezclaron 100  $\mu$ l de cultivo bacteriano con 1 ml de medio HDMEM (Gibco BRL) tamponado con HEPES que contenía suero bovino fetal al 10 % (HDMEM HF) y PEG HMW al 10 %. Se vertió 1 ml de suspensión bacteriana en una placa dTC3 de 0,15 mm de grosor (Biotech). Las células Caco-2 de 4 días de edad (p10-p30) cultivadas en placas dTC3 de 0,15 mm de grosor (Biotech) en HDMEM HF se lavaron una vez con HDMEM HF con o sin PEG HMW. Se añadió 1 ml de suspensión bacteriana preparada como antes a una placa dTC3 que contenía células Caco-2. Se observó directamente el patrón de dispersión de las células bacterianas en placas dTC3 con el microscopio invertido de fluorescencia Axiovert 100 TV usando DIC y filtros de fluorescencia de GFP, con 63X aumentos del objetivo. La temperatura se ajustó con un sistema de control de la temperatura con termostato Biotech. Se usaron lámparas de tungsteno (100 V) tanto para el DIC como para la excitación de GFP. Se usó el software de generación de imágenes 3D (Slidebook) de Intelligent Imaging Innovations para las imágenes de los patrones de dispersión de las células bacterianas en el plano Z usando el filtro de GFP. Se vieron células de *P. aeruginosa* planctónicas uniformemente dispersas en el medio sin células Caco-2 en una imagen de DIC (fig. 6a<sub>1</sub>) y la reconstrucción del plano Z (fig. 6a<sub>2</sub>). En presencia de células Caco-2, las células bacterianas desarrollaban un aspecto aglomerado (fig. 6a<sub>1</sub>) y se vio que se adherían a las células Caco-2 (fig. 6a<sub>2</sub>). Una disolución de PEG 3350 al 10 % disminuía la motilidad bacteriana e inducía la formación inmediata de microcolonias bacterianas con forma de hongo (fig. 6c<sub>1</sub>) adhiriéndose a la parte inferior del pocillo (fig. 6c<sub>2</sub>). En presencia de células Caco-2, las microcolonias bacterianas estaban aproximadamente 8  $\mu$ m por encima del plano de las células epiteliales (fig. 6d<sub>1,2</sub>). Una disolución de PEG 15-20 al 10 % disminuía la motilidad de las células de *P. aeruginosa*. Sin embargo, durante la primera 0,5-1 hora de incubación en medio que contenía PEG 15-20, las células bacterianas formaban microcolonias con forma de patas de araña (fig. 6e<sub>1,2</sub>). En varias horas, las microcolonias con forma de patas de araña ocupaban el espacio/volumen entero del medio. En presencia de células Caco-2, las células de *P. aeruginosa* perdían la configuración de tipo patas de araña y se vieron elevadas muy por encima del plano del epitelio (30-40  $\mu$ m) (fig. 6f<sub>1,2</sub>).

**[0091]** Para determinar la orientación espacial de las interacciones de célula epitelial-bacteriana en las tres dimensiones, se realizaron las reconstrucciones del plano Z. Las imágenes demostraron que las dos disoluciones de PEG tenían diferentes efectos en el comportamiento de aglomeración de *P. aeruginosa* y afectaban de forma diferente a la orientación espacial de las bacterias dependiendo de la presencia o ausencia de células Caco-2. En experimentos con medio solo, se vio que *P. aeruginosa* presentaba un patrón disperso de forma uniforme (fig. 6a). Sin embargo, las células bacterianas examinadas en presencia de células Caco-2 desarrollaron un aspecto aglomerado y se vieron adyacentes al plano de las células epiteliales en el fondo del pocillo (fig. 6b). Las células bacterianas examinadas en presencia de PEG 3,35 solo formaban agregados aglomerados grandes y permanecían en el fondo del pocillo de cultivo (fig. 6c), mientras que las células bacterianas examinadas con células Caco-2 en medio que contenía PEG 3,35, permanecían suspendidas por encima del plano de las células epiteliales (aproximadamente 8  $\mu$ m), manteniendo su aspecto aglomerado (fig. 6d). Las células bacterianas examinadas en presencia de PEG 15-20 solo presentaron un patrón uniforme de microaglomeración (fig. 6e), mientras que las células bacterianas examinadas en presencia de Caco-2 en medio que contenía PEG 15-20, estaban suspendidas muy por encima del plano del epitelio (-32  $\mu$ m) en formación aglomerada (fig. 6f). En experimentos cronometrados, se observó que la motilidad bacteriana había disminuido por PEG 3,35, y en una extensión incluso mayor, con PEG 15-20.

**[0092]** De forma análoga al experimento descrito en el ejemplo 5, este ejemplo proporciona una correlación física

para el efecto observado de PEG HMW en la interacción célula-célula, de acuerdo con sus actividades profilácticas y terapéuticas beneficiosas descritas en el presente documento. Se espera que el uso de PEG HMW reduzca o elimine las interacciones célula-célula perjudiciales en el intestino (p. ej., entre células epiteliales intestinales y patógenos intestinales como *Pseudomonas*), reduciendo el riesgo de enfermedades y/o afecciones anómalas asociadas con la septicemia de origen intestinal.

## EJEMPLO 7

### Prevención de enfermedades/afecciones anómalas

**[0093]** La descripción también proporciona procedimientos para prevenir una variedad de enfermedades y/o afecciones anómalas en seres humanos y otros animales, en particular otros mamíferos. En estos procedimientos de la descripción, se administra una cantidad eficaz de PEG HMW a un paciente humano o un sujeto animal que lo necesite. El PEG se puede administrar usando un esquema de administración que se determina usando procedimientos de optimización rutinarios conocidos en la materia. Preferiblemente, el PEG tiene un peso molecular medio de 5.000-20.000 daltons, y más preferiblemente entre 10.000-20.000 daltons. Se contempla que se administre PEG HMW al menos al 5 %. El PEG HMW se puede administrar de cualquier forma adecuada, p. ej., como una disolución, como un gel o crema, como una disolución adecuada para la nebulización (p. ej., para usar por inhalación), en una composición farmacéutica que comprende el PEG HMW, y en una disolución isotónica estéril adecuada para inyectar a un animal. La administración se puede lograr por cualquier vía convencional; se contempla en particular que el PEG HMW se administre por vía oral o tópica. En algunos aspectos, la composición de PEG HMW que se administra comprende además un compuesto seleccionado del grupo que consiste en L-glutamina recubierta con dextrano, inulina recubierta con dextrano, ácido butírico recubierto con dextrano, un fructooligosacárido, N-acetil-D-galactosamina, manosa recubierta con dextrano, galactosa y lactulosa. En otro aspecto, la composición de PEG HMW administrada comprende además L-glutamina recubierta con dextrano, inulina recubierta con dextrano, ácido butírico recubierto con dextrano, uno o más fructooligosacáridos, N-acetil-D-galactosamina, manosa recubierta con dextrano, galactosa y lactulosa.

**[0094]** La descripción proporciona procedimientos para prevenir una variedad de enfermedades y afecciones anómalas, tales como oído de nadador, otitis media aguda o crónica, neumonía asociada con respirador, septicemia de origen intestinal, enterocolitis necrosante, diarrea inducida por antibióticos, colitis pseudomembranosa, enfermedades inflamatorias del intestino, síndrome del intestino irritable, enterocolitis neutropénica, pancreatitis, síndrome de fatiga crónica, síndrome de disbiosis, colitis microscópica, infección crónica del tracto urinario, enfermedad de transmisión sexual e infección (p. ej., exposición a un entorno contaminado por un agente de bioterrorismo tal como *Bacillus anthracis*, virus de la viruela, *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroagregativa, (EAEC), *Clostridium difficile*, rotavirus, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacteria cloacae*, *Candida albicans*, *Candida globrata*, y similares). En un aspecto preferido del procedimiento para prevenir la infección crónica del tracto urinario, o para tratar dicha infección, el PEG HMW se suministra en forma de irrigación vesical. Para la prevención de las enfermedades de transmisión sexual, preferiblemente se usa una composición de la invención para lubricar un preservativo. En un aspecto preferido de un procedimiento para prevenir la infección por un agente de bioterrorismo, la composición de acuerdo con la invención se proporciona en forma de un gel o crema, adecuada para la aplicación tópica. Se espera que dicha aplicación tópica sea útil para prevenir una variedad de enfermedades y/o afecciones anómalas asociadas con cualquiera de los agentes de bioterrorismo o asociadas con una variedad de agentes químicos y fisicoquímicos que suponen una amenaza para el hombre o animal en términos de supervivencia, salud o confort. Dichos agentes químicos o fisicoquímicos incluyen aquellos agentes capaces de quemar o dañar la piel de otra forma y que se convierten en inactivos o son poco solubles en las composiciones de la invención.

**[0095]** En un aspecto de los procedimientos de prevención, se anestesian ratones macho Balb/c y se inyecta una disolución acuosa de PEG 15-20 al 5 % en la base del intestino ciego mediante punción directa con aguja. Con el fin de proporcionar una fuente constante de PEG durante las 48 h de duración del experimento, la aguja se dirige al intestino delgado (íleo) y se inyecta 1 ml de PEG 15-20 mediante inyección retrógrada en el intestino proximal. El sitio de la punción se sujeta con una sutura de seda y el intestino ciego se limpia con torunda con alcohol. Los ratones se devuelven a sus jaulas y se les da solo H<sub>2</sub>O. 48 horas más tarde, los ratones se someten a un procedimiento de hepatectomía convencional que implica una escisión isquémica de 30 % del hígado a lo largo del lóbulo izquierda flexible. Los ratones de control experimentan manipulación del hígado sin hepatectomía. Se espera que el tratamiento de prevención que implica la administración de PEG HMW reduzca o elimine la incidencia de la septicemia de origen intestinal asociada con la cirugía en ratones.

**[0096]** Estos procedimientos se pueden aplicar también en la atención preventiva desde mascotas tales como ratones, cobayas, perros y gatos, hasta animales de importancia agropecuaria como ganado, caballos, cabras, ovejas, cerdos, pollos, pavos, patos, gansos, y cualquier otro animal domesticado. Además, estos procedimientos de

prevención se espera que sean aplicables a seres humanos, mejorando la salud y la duración probable de la vida, de muchos pacientes o candidatos en riesgo de desarrollar una enfermedad y/o afección anómala, tal como oído de nadador, otitis media aguda o crónica, neumonía asociada con respirador, septicemia de origen intestinal, enterocolitis necrosante, diarrea inducida por antibióticos, colitis pseudomembranosa, una enfermedad inflamatoria del intestino, síndrome del intestino irritable, enterocolitis neutropénica, pancreatitis, síndrome de fatiga crónica, síndrome de disbiosis, colitis microscópica, infecciones crónicas del tracto urinario, enfermedades de transmisión sexual y agentes infecciosos (p. ej., composiciones de bioterrorismo) que incluyen, pero sin limitar, ántrax y el virus de la viruela. Como se ha indicado antes, los procedimientos de prevención comprenden la administración de una composición que comprende PEG HMW (5-20 kDa) al menos al 5 %, por cualquier vía de administración convencional o conocida, al hombre u otro animal. Preferiblemente, los procedimientos de prevención se ponen en práctica en aquellos individuos que están en riesgo de desarrollar una o más de las enfermedades y/o afecciones anómalas mencionadas antes, pero se contempla que las composiciones y los procedimientos de la invención serán útiles en una función profiláctica o terapéutica para tratar o prevenir ampliamente dichas enfermedades o afecciones anómalas en poblaciones enteras o subpoblaciones del hombre u otros animales.

#### EJEMPLO 8 (REFERENCIA)

##### Procedimientos de seguimiento de la administración de PEG de HMW

**[0097]** La descripción también contempla procedimientos para el seguimiento de la administración del PEG HMW, por ejemplo en un procedimiento de tratamiento. En dichos procedimientos de seguimiento, se administra PEG HMW marcado, solo o combinado con PEG HMW sin marcar, y el marcador se detecta durante el tratamiento en un esquema continuo o intermitente, incluyendo determinaciones de criterios de valoración simples. El término PEG HMW "marcado" significa que se une directa o indirectamente un marcador, o compuesto detectable, al PEG HMW, o que el PEG HMW se une a un compuesto indicador que es capaz de asociar un marcador con el PEG HMW (por supuesto, también se contemplan en la invención los marcadores no unidos a PEG HMW o diseñados para asociarse con el mismo, como se indica a continuación). El PEG HMW se marca usando cualquier marcador detectable conocido en la materia, y el PEG se marca hasta un nivel suficiente para detectarlo. Los expertos en la materia reconocerán que el nivel variará dependiendo del marcador y del procedimiento de detección. Un experto en la materia puede optimizar el grado de marcaje usando procedimientos de optimización rutinarios. El marcador se une químicamente al PEG HMW mediante un enlace covalente o no covalente que es estable cuando se usa, y preferiblemente, en el almacenamiento. Se prefiere el marcador unido covalentemente a PEG HMW. La densidad de unión del marcador se ajusta para conservar sustancialmente la actividad biológica del PEG HMW (conservación de la actividad biológica suficiente para producir un efecto profiláctico o terapéutico beneficioso, como se describe en el presente documento). Esto se logra típicamente ajustando la relación de PEG HMW:marcador, como se conoce en la materia. Dado el tamaño relativo de la molécula media de PEG HMW, se espera que haya una amplia variedad de marcadores adecuados para la unión a PEG HMW con conservación sustancial de su actividad biológica.

**[0098]** Los marcadores contemplados por la descripción son los marcadores conocidos en la materia, que incluyen un radiomarcador, un cromóforo, un fluoróforo, y un indicador (incluyendo una enzima que cataliza la producción de un compuesto detectable y una pareja de unión, tal como un anticuerpo que localiza un compuesto detectable en la proximidad del indicador). Los indicadores enzimáticos de ejemplo incluyen un componente enzimático de un sistema luminiscente y un catalizador de una reacción colorimétrica. Más en particular, las moléculas indicadoras de ejemplo incluyen biotina, avidina, estreptavidina y enzimas (p. ej., peroxidasa de rábano picante, luciferasa, fosfatasas alcalinas, incluyendo fosfatasas alcalinas secretadas (SEAP);  $\beta$ -galactosidasa;  $\beta$ -glucuronidasa; cloranfenicol acetiltransferasa). El uso de dichos indicadores es bien conocido para el experto en la materia, y se describe por ejemplo en la patente de EE.UU. n° 3.817.837, patente de EE.UU. n° 3.850.752, patente de EE.UU. n° 3.996.345, y patente de EE.UU. n° 4.277.437. Los sustratos enzimáticos de ejemplo, que se pueden convertir en compuestos detectables por enzimas indicadoras, incluyen 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido o Xgal, y Bluo-gal. Los sustratos enzimáticos, como compuestos capaces de conversión en compuestos detectables, también pueden ser marcadores en algunas realizaciones, como se entenderá en la materia. Las patentes de EE.UU. que enseñan marcadores y sus usos, incluyen la patente de EE.UU. n° 3.817.837; patente de EE.UU. n° 3.850.752; patente de EE.UU. n° 3.939.350 y patente de EE.UU. n° 3.996.345. Los radiomarcadores de ejemplo son  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{33}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$ , y  $^{125}\text{I}$ ; los fluoróforos de ejemplo son la fluoresceína (FITC), rodamina, Cy3, Cy5, aequorina, y la proteína verde fluorescente. Un marcador preferido es un fluoróforo tal como la fluoresceína.

**[0099]** Los procedimientos de seguimiento de la descripción pueden implicar también más de un marcador. En un aspecto, un marcador sirve para identificar la localización del PEG HMW después o durante el tratamiento, mientras que un segundo un marcador es específico para uno o más microbios, siempre que el marcador se asocie de forma detectable con al menos un microbio. Por ejemplo, un procedimiento de seguimiento puede incluir fluoresceína unida a PEG HMW de una forma que conserve sustancialmente la actividad biológica del PEG HMW, y Xgal o bluo-gal libres (es decir, no unidos) para la detección de actividad de  $\beta$ -galactosidasa específica de procariontas. La

fluoresceína localiza el PEG HMW, mientras que un producto coloreado (azul) indica la presencia de microbios procariotas metabolizadores de lactosa, tales como pseudomonas. La descripción también incluye procedimientos de seguimiento en los que un solo un marcador proporciona esta información (es decir, la localización de PEG HMW y una indicación de la presencia de un microbio).

5  
10  
15  
20  
25  
30

**[00100]** Se puede usar cualquier técnica de detección conocida en la materia en los procedimientos de seguimiento de la descripción. Varios factores influyen en la técnica de detección escogida, incluyendo el tipo de marcador, el biomaterial sometido a seguimiento (p. ej., células epidérmicas de la piel, canal del oído, o intestino; muestras de heces, moco o tejido), el nivel de discriminación deseado, cuando se espera cuantificación, y similares. Las técnicas de detección adecuadas incluyen la inspección visual sencilla a simple vista, la inspección visual con un instrumento tal como un endoscopio, opcionalmente equipado con una fuente de luz adecuada y/o cámara para la grabación, el uso convencional de contadores Geiger, película de rayos X, contadores de centelleo, y similares, y cualquier otra técnica de detección conocida en la materia.

35  
40  
45

**[00101]** Un experto reconocerá que los procedimientos de seguimiento de la descripción son útiles para optimizar los procedimientos de tratamiento. Por ejemplo, se puede usar un procedimiento de seguimiento para optimizar la cantidad y/o concentración de PEG HMW (p. ej., para lograr una viscosidad deseada para una disolución o mezcla de PEG HMW), que se suministra a una célula epitelial, tal como las células epiteliales del canal del oído, para prevenir o tratar el oído de nadador. A modo de ejemplos adicionales, la optimización de los tratamientos del intestino o intestinales de pueden facilitar por inspección endoscópica de un tracto intestinal expuesto a PEG HMW marcado o mediante el seguimiento de muestras de heces.

50  
55  
60

**[00102]** Los procedimientos de seguimiento de la descripción incluyen un ensayo de heces de un microbio capaz de adherirse a una célula del epitelio intestinal, que comprende poner en contacto un microbio y una célula del epitelio intestinal, y detectar la adherencia del microbio a la célula epitelial usando cualquier técnica conocida en la materia. En un aspecto preferido, la célula del epitelio intestinal se inmoviliza en una superficie adecuada, tal como el fondo y/o los laterales de un pocillo de microvaloración. En otro aspecto preferido, se añade un marcador directo, o un marcador indirecto, tal como un indicador capaz de generar un producto detectable antes, o durante, la etapa de detección. Los procedimientos de seguimiento pueden comprender además la adición del marcador libre. Por ejemplo, se añade Bluo-gal libre a una muestra que se sospecha que contiene un microbio procariota metabolizador de lactosa; si está presente, la enzima microbiana  $\beta$ -galactosidasa escindirán Bluo-gal para dar un producto azul detectable.

65  
70  
75  
80  
85

**[00103]** En un aspecto, se fijan células del epitelio intestinal disponibles en el comercio (p. ej., células Caco-2, ATCC HTB 37, y/o células IEC-6, ATCC CRL 1952) a los pocillos de una placa de microvaloración usando una técnica convencional. Se recoge en una muestra de heces y se mezcla con un fluido tal como disolución salina tamponada con fosfato. Se obtiene la fase líquida de la mezcla que contiene los microbios suspendidos (p. ej., por filtración adecuada (es decir, separación de los sólidos gruesos de las bacterias en una suspensión en el fluido), decantación o similares) y se diluye en PBS a 1:100. Se añade Bluo-gal a la suspensión de microbios vivos. La suspensión de microbios se añade a pocillos de microvaloración durante 1 h a 24 °C, seguido de lavado de los pocillos con un fluido adecuado (p. ej., PBS) para separar los microbios no unidos. Los microbios no unidos y/o unidos a las células epiteliales inmovilizadas se detectan, por ejemplo, mediante recuento usando un microscopio de luz polarizada. En aspectos alternativos, se usa un inmunoensayo para detectar la adherencia, con reactivos inmunológicos adecuados que son un anticuerpo monoclonal o policlonal específico del o de los microbios, opcionalmente unido a un marcador tal como un radiomarcador, un fluoróforo o un cromóforo.

90  
95  
100

**[00104]** Un experto en la materia reconocerá que no es necesario inmovilizar ni la célula del epitelio intestinal ni el microbio, aunque dicha inmovilización puede facilitar la detección precisa de microbios que se adhieren a células epiteliales. Por ejemplo, en un aspecto, un microbio de heces inmovilizado se pone en contacto con una célula del epitelio intestinal que no está inmovilizada. Además, un experto reconocerá que se puede usar cualquier fluido adecuado conocido en la materia para obtener la suspensión de microbios, siendo los fluidos preferidos cualquiera de los tampones isotónicos conocidos. Además, como se ha indicado antes, se puede usar cualquier marcador conocido para detectar la adherencia celular.

105  
110  
115

**[00105]** En un aspecto relacionado, la descripción proporciona un kit para ensayar la adherencia de células microbianas, que comprende una célula epitelial y un protocolo para ensayar la adherencia de células microbianas a la célula epitelial. El protocolo describe un procedimiento conocido para detectar un microbio. Un kit preferido incluye una célula del epitelio intestinal. Otros kits de la invención comprenden además un marcador, tal como un fluoróforo o un indicador.

120

**[00106]** Otro procedimiento de seguimiento contemplado por la descripción es un ensayo de hidrofobicidad microbiana. En este procedimiento, se determina la hidrofobicidad relativa o absoluta de una célula microbiana

usando cualquier técnica convencional. Una técnica de ejemplo implica la exposición de cualquier microbio a la cromatografía de interacción hidrófoba, como se conoce en la materia. Ukuku y col., *J. Food Prot.* 65:1093-1099 (2002). Otra técnica de ejemplo es el reparto en líquidos polar:no polar (p. ej., 1-octanol:agua o xileno:agua) de cualquier microbio. Véase Majtan y col., *Folia Microbiol (Praha)* 47:445-449 (2002).

5  
10  
15  
[00107] En un aspecto de un ensayo de hidrofobicidad para el seguimiento de la administración de PEG, se suspende una muestra de heces en tampón de fosfato de sodio 50 mM (pH 7,4) que contiene NaCl 0,15 M. Los microbios en la suspensión se recogen por centrifugación y se vuelven a suspender en el mismo tampón, y se repite el ciclo de centrifugación-resuspensión. Si es factible, los microbios se vuelven a suspender en el mismo tampón hasta una absorbancia de 0,4 a 660 nm, que permitirá el seguimiento por espectrofotometría, sin usar el PEG marcado. La suspensión microbiana se trata con xileno (2,5:1, v/v, Merck), la suspensión se mezcla enérgicamente durante 2 minutos, y la suspensión se deja reposar durante 20 min a temperatura ambiente. Después se determina la presencia de microbios en la fase acuosa, por ejemplo por determinación espectrofotométrica de absorbancia a 660 nm. Se usa un blanco que contiene el tampón de fosfato de sodio para eliminar el ruido de fondo.

[00108] En la obtención de las células microbianas de muestras de heces para usar en estos procedimientos, se prefiere que el PEG HMW sea relativamente insoluble en el fluido usado para obtener la suspensión microbiana y cualquier fluido usado para diluir la suspensión microbiana.

20  
[00109] La descripción proporciona además un kit para llevar a cabo el procedimiento de seguimiento, que comprende un ensayo de la hidrofobicidad microbiana, que comprende una célula del epitelio intestinal y un protocolo que describe la determinación de la hidrofobicidad microbiana. Un kit preferido incluye una célula del epitelio intestinal. Los kits relacionados comprenden además un marcador, tal como un fluoróforo o un indicador.

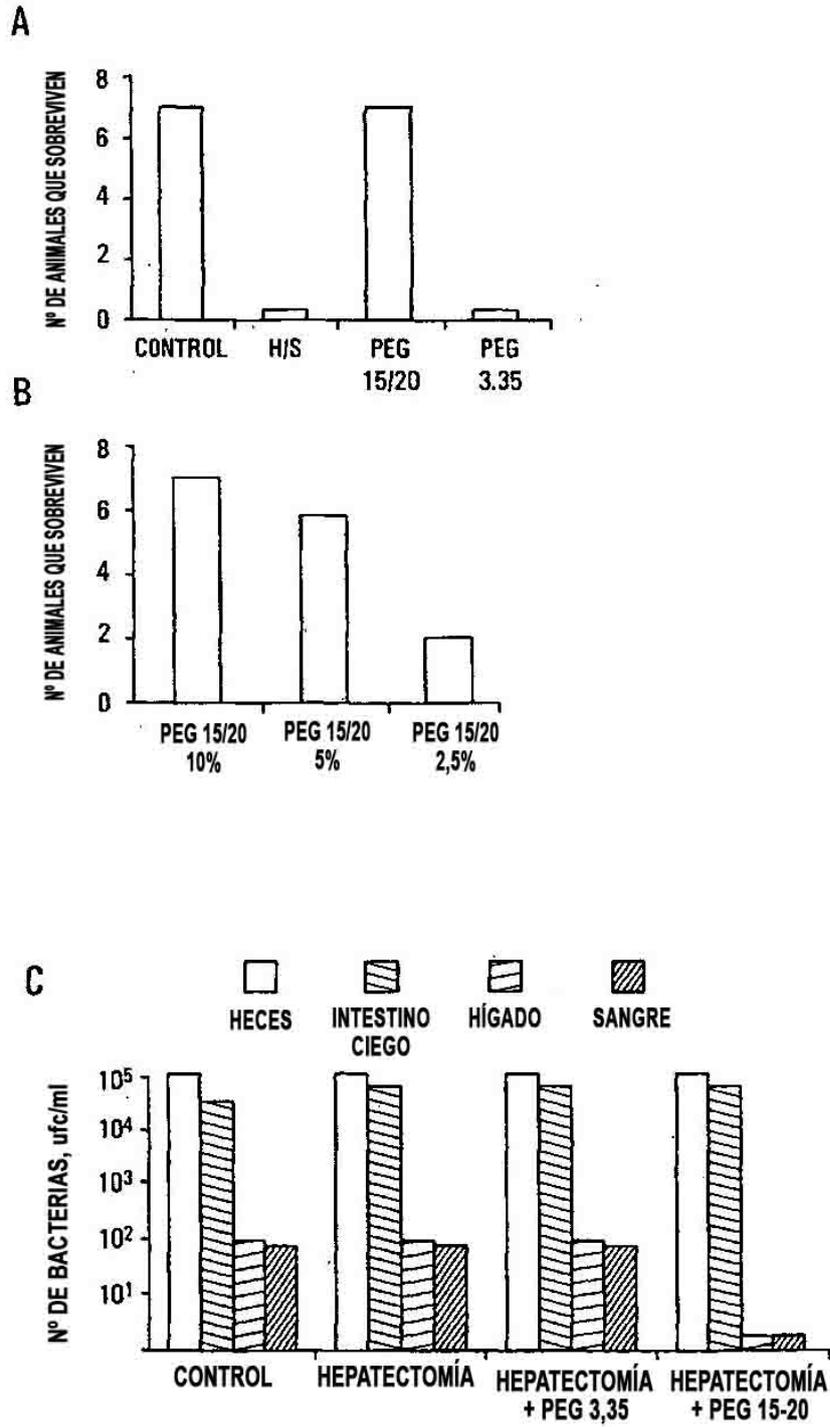
25  
30  
35  
[00110] Además también, la descripción proporciona un procedimiento de seguimiento que comprende obtener una muestra de la flora intestinal y detectar la actividad de la lectina PA-I/adhesina. Se puede usar cualquier técnica conocida en la materia para detectar la actividad de la lectina PA-I/adhesina. Por ejemplo, la lectina PA-I/adhesina se puede detectar usando un anticuerpo (policlonal, monoclonal, fragmento de anticuerpo tal como un fragmento Fab, cadena sencilla, quimera, humanizado o cualquier otra forma de anticuerpo conocida en la materia) que reconoce específicamente la lectina PA-I/adhesina. El inmunoensayo tiene forma de cualquier formato de inmunoensayo conocido en la materia, p. ej., ELISA, Western, inmunoprecipitación, y similares. Alternativamente, se puede detectar la capacidad de unión a un hidrato de carbono de la lectina PA-I/adhesina o se puede medir la actividad de traspasar la barrera del epitelio intestinal de la lectina PA-I/adhesina, p. ej., mediante seguimiento de la resistencia eléctrica transepitelial o TEER de una capa epitelial antes y/o durante la exposición a una muestra. En kits relacionados, la descripción proporciona una pareja de unión de lectina PA-I/adhesina y un protocolo para detectar la actividad de lectina PA-I/adhesina (p. ej., actividad de unión). Otros kits de acuerdo con la descripción incluyen cualquier hidrato de carbono que se sabe que se une a la lectina PA-I/adhesina y un protocolo para detectar la actividad de la lectina PA-I/adhesina (p. ej., actividad de unión).

## REIVINDICACIONES

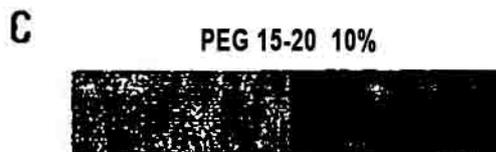
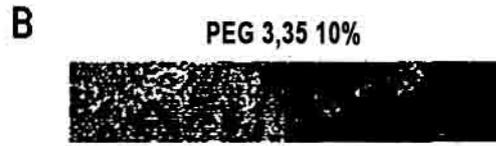
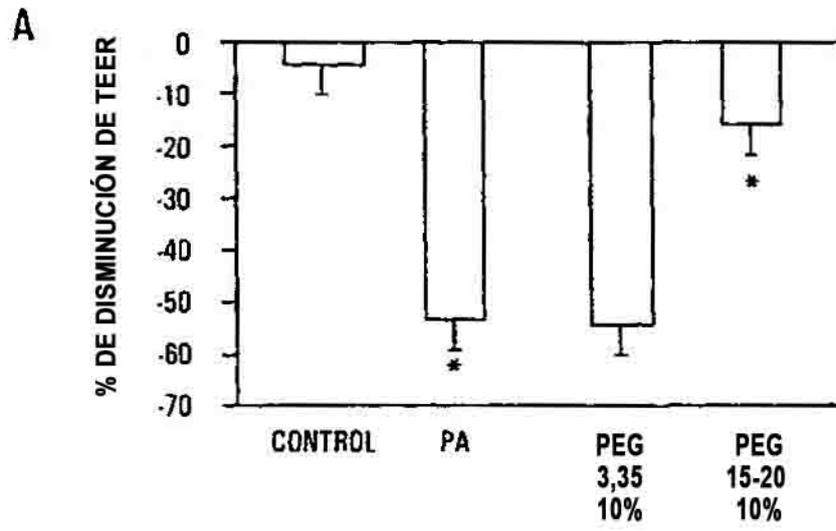
- 5 1. Uso de polietilenglicol (PEG), en el que el PEG tiene un peso molecular medio de al menos 15.000 daltons, en la fabricación de un medicamento para tratar un trastorno de la barrera epitelial inhibiendo la adherencia de una célula bacteriana a un epitelio de mamífero.
- 10 2. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la adherencia de una célula bacteriana a un epitelio de mamífero es sintomático de un trastorno seleccionado del grupo que consiste en septicemia de origen intestinal, una lesión por quemadura, enterocolitis necrosante neonatal, neutropenia grave, colitis tóxica, enfermedad inflamatoria del intestino, enteropatía y pouchitis.
- 15 3. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el animal se selecciona del grupo que consiste en perro, gato, oveja, cabra, vaca, cerdo, pollo, caballo y ser humano.
4. El uso de acuerdo con la reivindicación 3, en el que el animal es un ser humano.
5. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el PEG es una disolución acuosa que comprende PEG al 10-20 %.
- 20 6. El uso de acuerdo con la reivindicación 5, en el que la disolución acuosa comprende PEG al 10 %.
7. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el medicamento es para tratar un trastorno de la barrera epitelial inhibiendo la expresión de la lectina PA-I/adhesina en un patógeno intestinal.
- 25 8. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el medicamento es para tratar un trastorno de la barrera epitelial inhibiendo la activación inducida por el intestino de la lectina PA-I/adhesina.
9. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el medicamento es para tratar un trastorno de la barrera epitelial inhibiendo el cambio morfológico inducido por C4-HSL de un patógeno intestinal.
- 30 10. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el medicamento es para tratar un trastorno de la barrera epitelial reduciendo la expresión de la virulencia en un patógeno intestinal.
- 35 11. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el medicamento es para mejorar la patogénesis intestinal previniendo la formación de la activación patógena por percepción de quórum.
12. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la célula bacteriana es una pseudomonas.
- 40 13. El uso de acuerdo con la reivindicación 12, en el que la pseudomonas es *Pseudomonas aeruginosa*.
14. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el medicamento es para tratar un trastorno de la barrera epitelial reduciendo la expresión de la lectina PA-I/adhesina en una célula bacteriana.
- 45 15. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el PEG se adhiere a una célula del epitelio intestinal o una célula bacteriana de una forma topográficamente asimétrica.
- 50 16. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la célula bacteriana es un patógeno intestinal y no hay modificación detectable de las características de crecimiento del patógeno intestinal.
17. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el medicamento comprende además una cantidad eficaz de un compuesto seleccionado del grupo que consiste en dextrano, L-glutamina recubierta con dextrano e inulina recubierta con dextrano, para introducir en el intestino.
- 55 18. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el medicamento comprende además una cantidad eficaz de L-glutamina, para introducir en el intestino.
19. Un kit para usar en el tratamiento terapéutico o la prevención de la septicemia de origen intestinal, que comprende: (i) una composición farmacéutica que comprende polietilenglicol de peso molecular medio de al menos 15.000 daltons y un adyuvante, vehículo o diluyente adecuado; y (ii) un protocolo que describe el uso de la composición en el tratamiento terapéutico o prevención de la septicemia de origen intestinal.
- 60 20. Uso del polietilenglicol (PEG), en el que el PEG tiene un peso molecular medio de al menos 15.000

daltons, en la fabricación de un medicamento para prevenir la infección respiratoria.

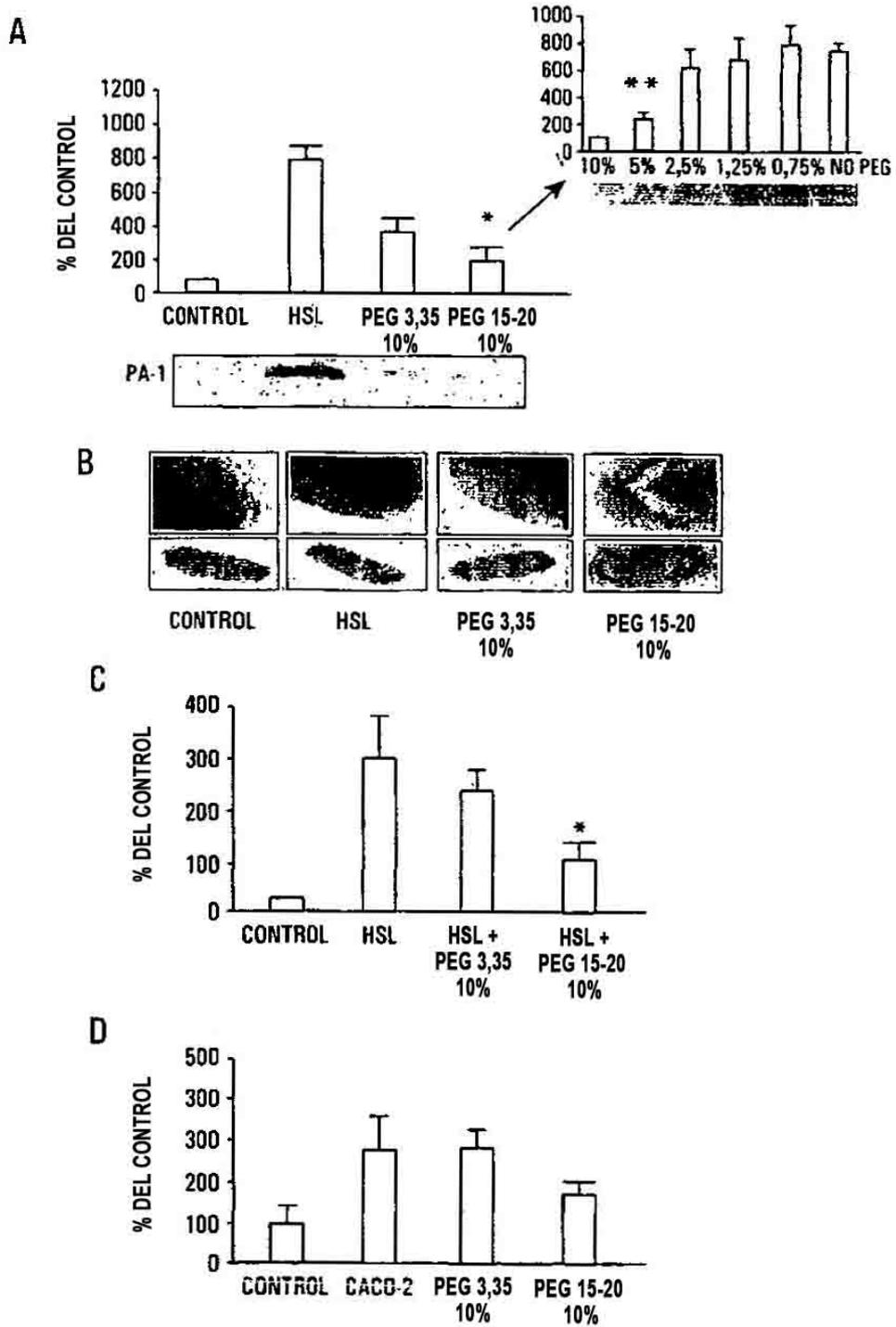
- 5 21. El uso de acuerdo con la reivindicación 20, en el que la infección respiratoria se selecciona del grupo que consiste en neumonía asociada con respirador e infección.
22. Uso de una composición que comprende PEG, en el que el PEG tiene un peso molecular medio de al menos 15.000 daltons, en la fabricación de un medicamento para la irrigación de al menos una parte del tracto urinario con el fin de prevenir una infección crónica del tracto urinario.
- 10 23. El uso de acuerdo con la reivindicación 22, en el que la parte del tracto urinario incluye al menos la vejiga.
24. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el medicamento es para prevenir una enfermedad de transmisión sexual, que comprende la etapa de aplicar polietilenglicol (PEG) a un preservativo.
- 15 25. Un preservativo que comprende al menos un recubrimiento parcial con polietilenglicol (PEG), en el que el PEG tiene un peso molecular medio de al menos 15.000 daltons.
- 20 26. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el medicamento es para prevenir un trastorno del tracto digestivo.
27. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el medicamento es para tratar un trastorno seleccionado del grupo que consiste en enterocolitis necrosante neonatal, diarrea inducida por antibióticos, colitis pseudomembranosa, una enfermedad inflamatoria del intestino, síndrome del intestino irritable, enterocolitis neutropénica, pancreatitis, síndrome de disbiosis, colitis microscópica, oído de nadador, otitis media aguda o crónica, neumonía asociada con respirador, septicemia de origen intestinal, síndrome de fatiga crónica, infección crónica del tracto urinario, enfermedad de transmisión sexual e infección.
- 25 28. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el medicamento es para prevenir la pérdida de la capacidad lactante en un animal que presenta una superficie epitelial de una glándula mamaria en riesgo de desarrollar un trastorno mediado por microbios que afecta a la producción de leche.
- 30 29. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el medicamento es para prevenir el desarrollo de la disfunción de la barrera epitelial en un animal en edad de lactancia.
- 35 30. El uso de acuerdo con la reivindicación 29, en el que el PEG se mezcla con una preparación para lactantes.
- 40 31. Una composición que comprende una preparación para lactantes y polietilenglicol (PEG), en el que el PEG tiene un peso molecular medio de al menos 15.000 daltons.



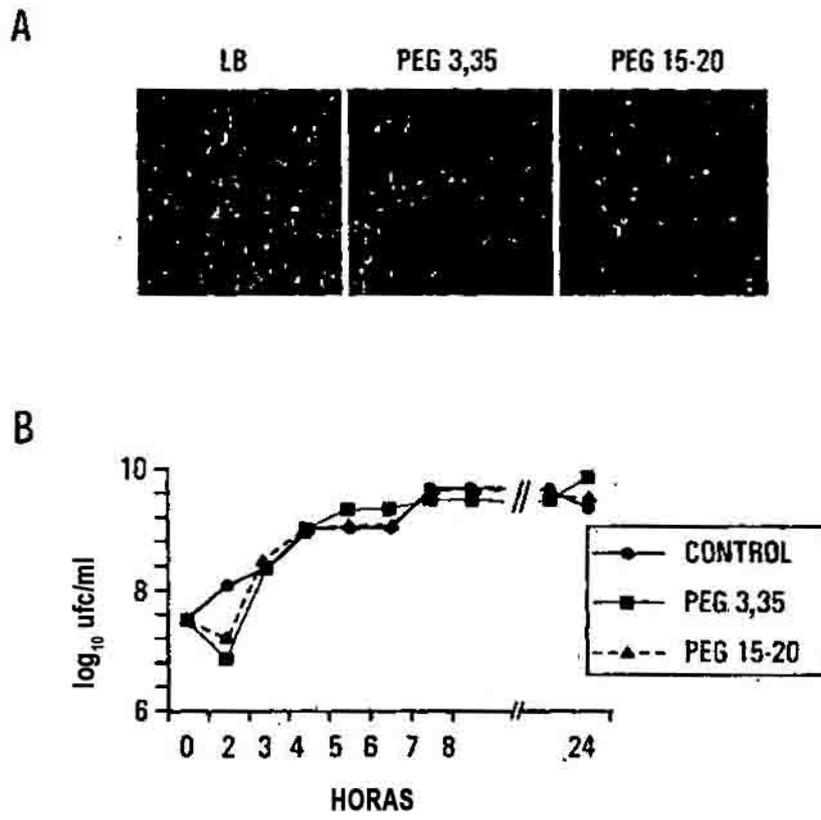
**FIG. 1**



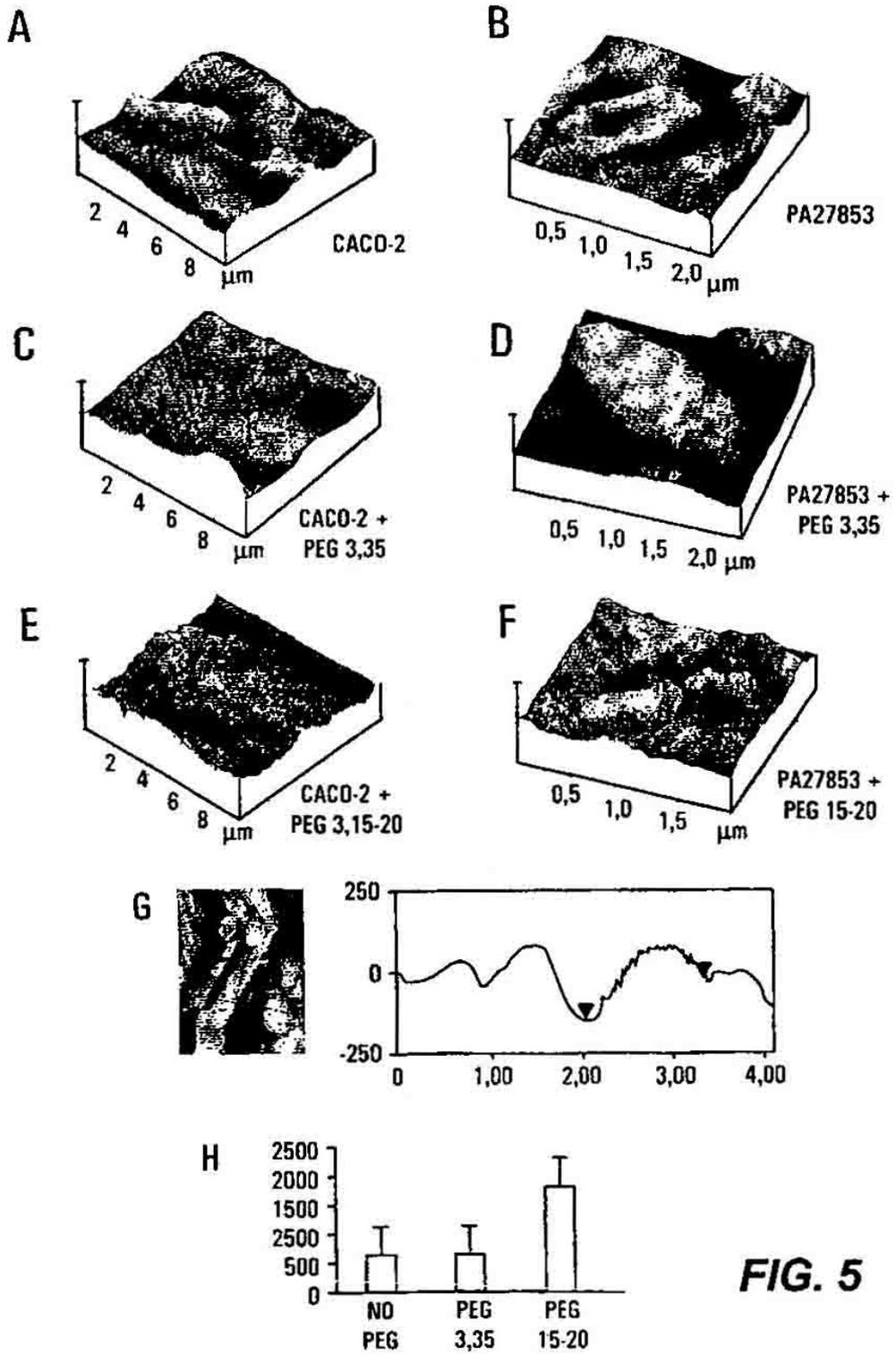
**FIG. 2**



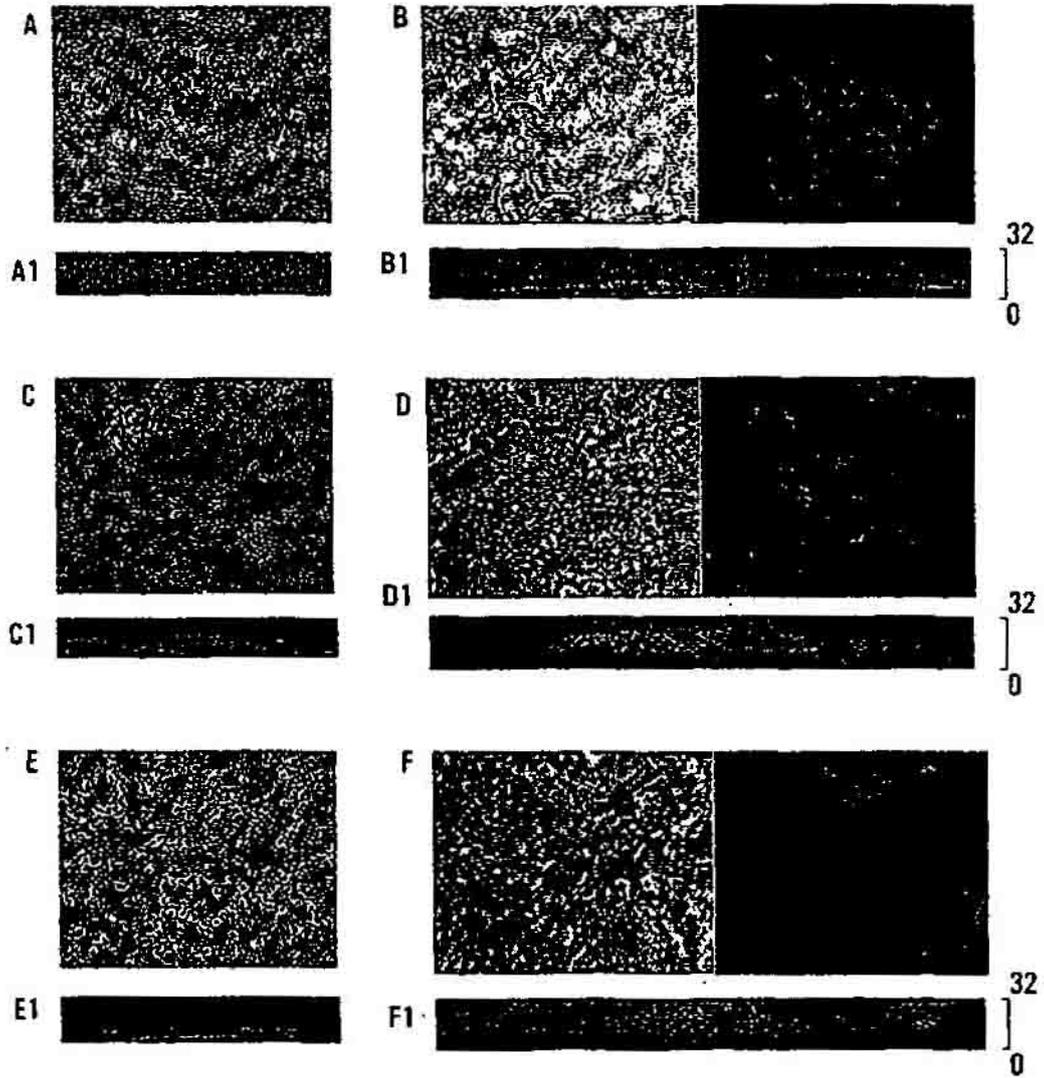
**FIG. 3**



**FIG. 4**



**FIG. 5**



**FIG. 6**